

Yeni Nesil bir Nanokanal Tasarımı ile Yüksek Verimli ve Hedefe Yönelik Mikroakışkan Hücre Füzyonu Platformlarının Fabrikasyonu

Ali Akpek^{1,2} 

¹ Gebze Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Gebze, Kocaeli

² Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Tuzla, İstanbul

e-posta: aliakpek@gtu.edu.tr

www.dergipark.org.tr/rjbb

Alınış Tarihi: 09/04/2020

Kabul Tarihi: 13/07/2020

Anahtar Kelimeler: Nanokanal Fabrikasyonu, Hücre Füzyonu, Mikroakışkan platform

Özet

Hücre füzyonu organ biyofabrikasyonu çalışmaları için hayati ehemmiyete sahiptir. Hücre füzyonu sayesinde zarar görmüş olan hücreler başka hücrelerle birleştirilerek işe yarar hücrelere dönüştürülebilir ve bozulmuş olan organ fonksiyonları düzeltilebilir. Hücre füzyonu araştırmaları noktasında son derece net bir ihtiyaç bulunsa da, hücre füzyonu teknolojileri hala fazlaca gelişmiş değildir. Bu çalışma yeni nesil bir nanokanal tasarımı sayesinde geliştirilmiş olan bir mikroakışkan hücre füzyonu platformu tasarımı üzerinde durmaktadır. Bu tasarım sayesinde hem hücrelerin daha kolay bir biçimde yönlendirilmesi hem de hücre canlılığına zarar vermeden daha rahat bir biçimde füzyona uğraması planlanmaktadır. Bu amaca ulaşmak için bir nanokanal ve bu nanokanalı ortadan dikey olarak ikiye ayıran birkaç nanometre kalınlığında bir bariyer üretilmiştir. Buna ilaveten bu bariyerin içerisinde belirli aralıklarla nanometre ölçeğinde boşluk yapıları oluşturulmuştur. Oluşturulmuş olan bu iki kanala L929 fare fibroblast hücreleri yerleştirilmiş ve bariyere AC voltaj uygulanmıştır. Bu bariyere voltaj uygulandıkça, oluşan elektriksel alan bariyer üzerindeki boşluklarda yoğunlaşmıştır. Hücreler nanokanallar içerisinde hidrostatik kuvvet ile yönlendirilmiştir. Elektriksel voltaj sayesinde oluşan dielektroforez ise hücreleri boşluklara yönlendirmiştir. Sonuç olarak hücre füzyonu işlemi gerçekleştirilmiş ve L929 fare fibroblast hücrelerinden oluşan füzyon hücreler üretilmiştir.

Fabrication of Target Oriented High Yield Microfluidic Cell Fusion Platforms with a Novel Nanochannel Design

www.dergipark.org.tr/rjbb

Received: 09/04/2020

Accepted: 13/07/2020

Keywords: Nanochannel Fabrication, Cell Fusion, Microfluidic Platform

Abstract

Cell fusion is vitally important for organ biofabrication. It possesses a possibility to be an alternative for restoring organ functions and replacing damaged cells. However, even there is a clear need for cell fusion, the cell fusion techniques are still not too much advanced. The study focuses on the fabrication of a new design microfluidic chip. This chip provides easiness in leading cells to desired pathways and to increase fusion yield without compromising cell viability. In order to achieve this mission, a nanochannel and a thin barrier which is in only few nanometers that divides the nanochannel into two different chambers were fabricated. In addition, this barrier had numerous nanoslit structures embedded onto it. L929 Mouse fibroblast were injected onto those chambers and then AC voltage applied to the channels. As the voltage applied, electric field distribution concentrates among those nanoslit structures. Hydrostatic force is used to manipulate cells into the channels and dielectrophoresis (DEP) was used to lead and keep cells into the nanoslit structures. Finally, cell fusion was initiated and fusants of L929 mouse fibroblast cells were generated.

1. Giriş

Hücre füzyonu son derece önemli bir hücresel işlemdir. Hücre füzyonu sayesinde çok sayıda tek çekirdekli hücre tek bir çok çekirdekli hücreye dönüştürülebilir [1-2].

Bu sayede hasar görmüş hücreler sağlıklı hücrelerle birleştirilerek tamir edilebilir ve bozulmuş olan organ fonksiyonları işler hale getirilebilir [3-4]. Bu durum hücre füzyonunu organ transplantasyonu için kayda değer bir alternatif haline getirmektedir [5]. Buna ek olarak hücre

füzyonu teknolojisi hibridoma üretilmesi konularında ya da somatik hücrelerin yeniden programlanması konularında fayda sağlayabilir [6-7]. Bu teknik sayesinde somatik hücreler embriyonik hücrelere dönüştürülebilir [8]. Bu durum ise sınırlı sayıda elde edebildiğimiz embriyonik hücreler gibi değerli hücreler için ciddi bir avantajdır. Her ne kadar hücre füzyonu konusunda son derece açık bir ihtiyaç ortada olsa da bu konuda gerçekleştirilmiş çalışmalar çok sınırlıdır. Bunun en önemli nedeni hücreleri arzu edildiği biçimde yönlendirmenin zor olması ve hücreleri bir araya getirerek füzyona uğratmanın teknik zorluklarıdır [9].

Füzyon hücreler oluşturmanın literatürde çok sayıda yolu vardır. Ancak elektriksel hücre füzyonunu gerçekleştirmek diğer metotlara nazaran biraz daha önde gelen bir metottur. Elektriksel hücre füzyonunun en önemli avantajı bu hücrelerin normal hücre fonksiyonlarına herhangi bir zarar vermemesidir. Biyolojik veya kimyasal metotlarda bu durum mümkün değildir [10].

Hücre füzyonu basit iki adımda gerçekleştirilir. İlk aşamada hücrelerin birbirlerine yönlendirilmeleri ve temas ettirilmeleri dielektroforez ile gerçekleştirilir. İkinci aşamada ise birbirlerine temas ettirilmiş olan hücrelerin hücre zarları bir akım darbesi ile delinir. Bu delinmiş hücre zarları aracılığı ile hücreler arasında sitoplazmik transfer gerçekleşir ve hücreler füzyona uğramış olur [11].

Son zamanlarda bazı araştırmacılar bu işlemi basitleştirmek ve süratlendirmek için mikroakışkan platformlar oluşturmuşlardır [12-13]. Bu çalışmalarda hidrodinamik kuvvet hücreleri arzu edilen istikametlere yönlendirmek ve neticesinde diğer hücrelerle bir araya getirmek için kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda mikroakışkan kanallarda elektrot düzenekleri kullanıldığı zaman yüksek verimli hücre füzyonunun mümkün olduğu da gösterilmiştir [14-15].

Bu çalışmalar önemlidir ve yüksek verimli mikroakışkan hücre füzyonu platformu oluşturma açısından önemli basamaklardır ancak bu çalışmalarda temel sorun hala çözülememiştir. Birincisi farklı yarıçaplarda hücreler füzyona uğratılmak istendiği zaman füzyonun başarılı olma oranı çok düşüktür. Genel olarak hücrenin çapı, hücre zarını delmek için gerekli olan akım darbesinin gücü ile doğru orantılıdır. Büyük bir hücre için daha güçlü bir akım darbesi verildiğinde bu küçük çapa sahip olan hücrede çok ciddi bir darbeye neden olabilmekte ve hücre içinde sitoplazmik transfer oluşturmak yerine hücrenin ölmesine neden olmaktadır [11]. Bu durumda nihayetinde ciddi oranda hücre ölümlerine ve düşük füzyon oranlarına neden olmaktadır. İkinci sorun ise hücrelerin birebir eşleştirilmesi ve füzyona uğratılması meselesidir [12]. Hücre füzyonu büyük oranlarda gerçekleştirildiği zaman istenmeyen füzyon hücrelerde ortaya çıkabilmektedir. Hedeflenmediği halde aynı türden farklı hücreler ya da ikiden fazla hücrenin bir araya gelip füzyona uğraması mümkün olabilmektedir [16]. İşte bu çalışmanın amacı bu iki sorunu çözmektir.

Bu çalışmada ortaya konulan tasarımda oluşturulacak olan nanokanalların ortasına bir bariyer konmuş ve belirli aralıklarla bu bariyer yapısında boşluklar oluşturulmuştur. Bu bariyere elektriksel akım verildiğinde boşluklar sebebiyle akım darbesinin vereceği etkinin hücrenin çapı ile herhangi bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Bu durumunda

farklı hücrelerin birbirleri ile füzyona uğratılabilmesi açısından bir avantaj yarattığı anlamına gelmektedir. Bu sayede yüksek füzyon oranı ve minimum hücre ölümü elde edilmiştir.

Gerçekleştirilen bu tasarım sayesinde hidrodinamik kuvvet ve dielektroforez vasıtasıyla arzu edilen hücrelerin arzu edildiği gibi arzu edilen noktalara yönlendirilebilmesinin mümkün olduğu anlaşılmıştır. Bu durumun hedefe yönelik ve planlanmış füzyon hücreleri oluşturmak adına bir avantaj olduğu anlamına geldiği düşünülmektedir. Bu sayede istenmeyen ya da planlanmamış füzyon hücrelerin oluşturulmasına engel olunmuştur. Bunun hücre füzyonu çalışmaları için kayda değer bir adım olduğu düşünülmektedir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Yöntem

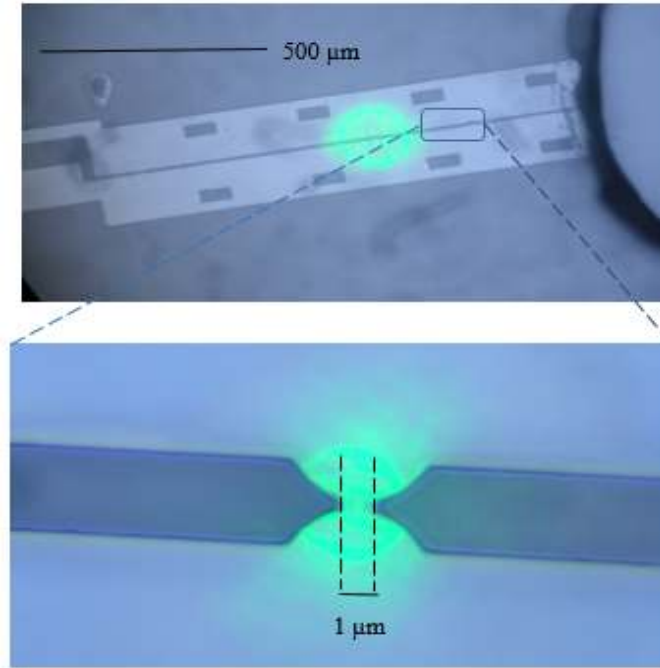
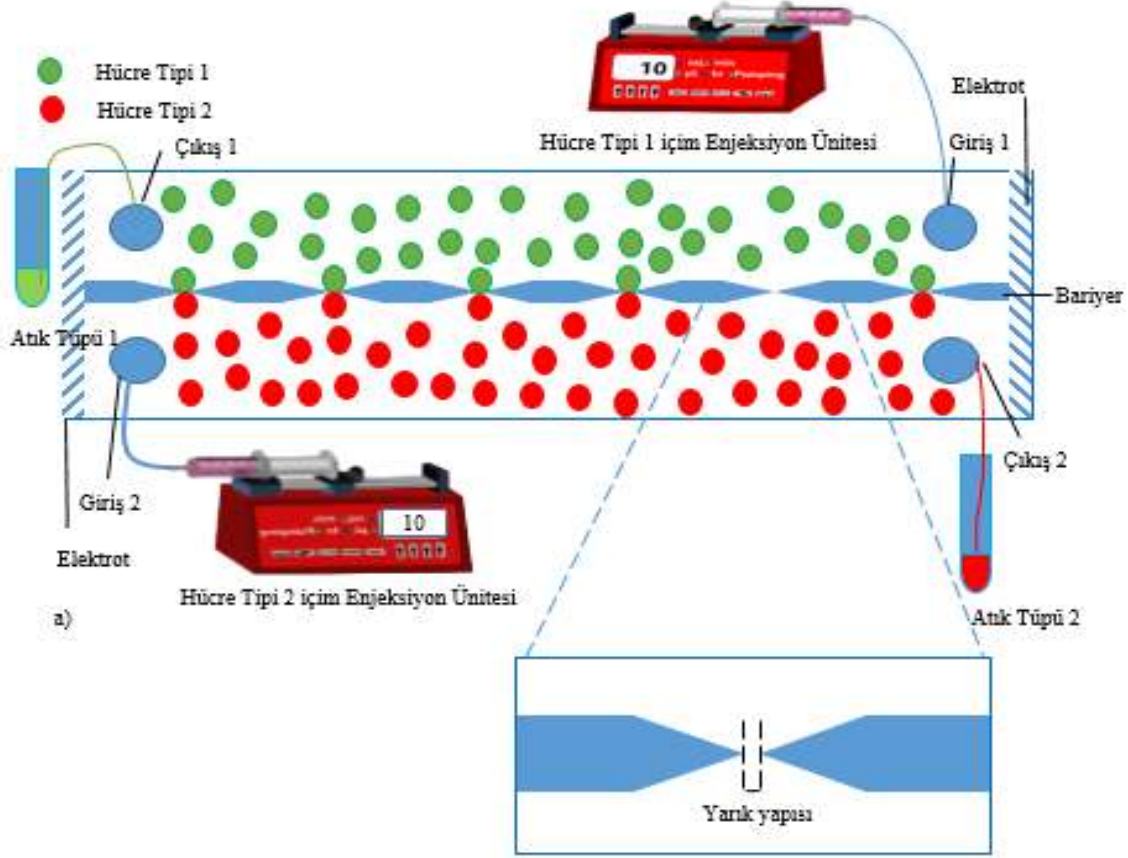
Tasarlanmış olan mikroakışkan hücre füzyonu platformu Şekil 1a'da gösterilmiştir. Üretim süreçlerine yönelik teknik çizimler Şekil 2'de sunulmuştur. Bu platformda iki adet nanokanal ve iki adet giriş yapısı vardır. Çalışma kapsamında nanokanal olarak ifade edilen yapı hücrelerin içerisinde hareket ettikleri kanal yapısıdır. Hücrelerin bir araya toplandıkları yerler boşluk ya da yarık olarak isimlendirilmiştir. Bu iki giriş noktasında iki farklı hücre tipi verilebilir. Bu çalışma kapsamında sadece bir adet hücre tipi kullanılmıştır. Ancak hücreler aynı tip hücreler olmakla birlikte özdeş değillerdir. Bütün hücreler 10µm ile 30µm arasında farklı farklı boyutlardadır. Bu zaten alınan görüntülerden de anlaşılabilir. İki nanokanalın ortasında bir bariyer yapısı mevcuttur. Şekil 1b'de üretilmiş olan mikroakışkan platform üzerinde bulunan bariyer üstündeki yarık yapıları gösterilmiştir. Bariyere voltaj verildiği zaman, oluşan elektriksel alan bariyerde bulunan boşluklarda yoğunlaşmaktadır. Bu sayede dielektroforez oluşmakta ve hücrelerin hedeflenmiş olan boşluklara yönlendirilmesi temin edilmektedir. Sonrasında da bir akım darbesi verilerek birbirleri ile temas etmiş olan hücrelerin zarlarında boşluklar oluşturulmakta ve hücreler arası sitoplazmik transfer temin edilerek füzyona uğramış hücrelerin oluşması temin edilmektedir.

2.2. Materyal

Füzyon deneyleri için L929 fare fibroblast hatları kullanılmıştır. Boyutları genel olarak 10µm ile 30 µm arasındadır. Hücreler DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içerisinde kültür edilmiştir. DMEM yapısı 10% fetal sığır serumu ve penicillin-streptomycin ile desteklenmiştir. Monomoleküler tabaka hücre yoğunluğu %90'a ulaşınca değiştirilmiştir. Hücre füzyonu için tampon çözelti olması amacıyla da 0.5 mM Ca asetat, 1 mM Mg asetat, 0.5 mg/ml sığır serum albumin, karıştırılarak kullanılmıştır. Polydimethylsiloxane (PDMS), SU8 fotorezist, ve hücre için boyar madde (calcein-acetoxymethylester) deneyler esnasında kullanılmıştır. Bir CCDC kamera içeren bir ters mikroskop (IX-71, Olympus, Tokyo, Japan) deneyleri görüntülemek için kullanılmıştır.

Kullanılan objektif lensi UPlanApo 10X/0.4 Ph1 ve UPlanApo 40X/0.85 ∞ /0.11–0.23. Hücrelerin takip edilmesi için özel olarak herhangi bir boyar madde kullanılmamıştır. Bu düzenek hücreleri takip etmek için yeterli olmuştur. Sadece bir deneyde füzyon sonuçlarını daha net görüntüleyebilmek adına calcein kullanılmıştır (Dojindo Molecular Technologies, calcein-

acetoxymethylester, Kumamoto, Japan). Programlanabilir bir fonksiyon jeneratörü ihtiyaç duyulan elektriksel alanı oluşturabilmek için kullanılmıştır. Yüksek hızlı ve çift kutuplu bir yükselteç (WF 1974, NF Electronics, Kanagawa, Japan) aracılığı ile hücre füzyonu için gerekli olan akım darbesi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. a) Mikroakışkan hücre füzyonu platformu, b) Bariyer üstündeki yarık yapılar

2.3. Mikroakışkan Platform Üretimi

Mikroakışkan platform üretimi üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Kalıp hazırlanması, kalıbın düzenlenmesi ve PDMS dökümünün gerçekleştirilmesi. Kalıp bir spin kaplama cihazı aracılığı ile üretilmiştir. SU8 fotorezist silikon bir wafer üzerine yerleştirilmiş ve $50 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$ olacak şekilde kalınlığı ayarlanmıştır. Sonrasında sırasıyla 75°C 'de 5 dakika ve 100°C 'de 7 dakika hafifçe ısıtılmıştır. Sonrasında hazırlanan kalıp UV ışınlarına maruz bırakılmıştır. Nihayetinde SU8 fotorezist kalıbı bir kere daha 75°C 'de 3 dakika ve 100°C 'de 5 dakika olacak şekilde ısıtılmıştır. Şekil 2'de bu süreç açıklanmıştır. Yarık yapılarının çapı $1 \mu\text{m}$ olarak ayarlanmıştır. Nano boyutun sınırlarına dayandığı için bu tasarım bir nano mimari çalışması olarak değerlendirilmiştir.

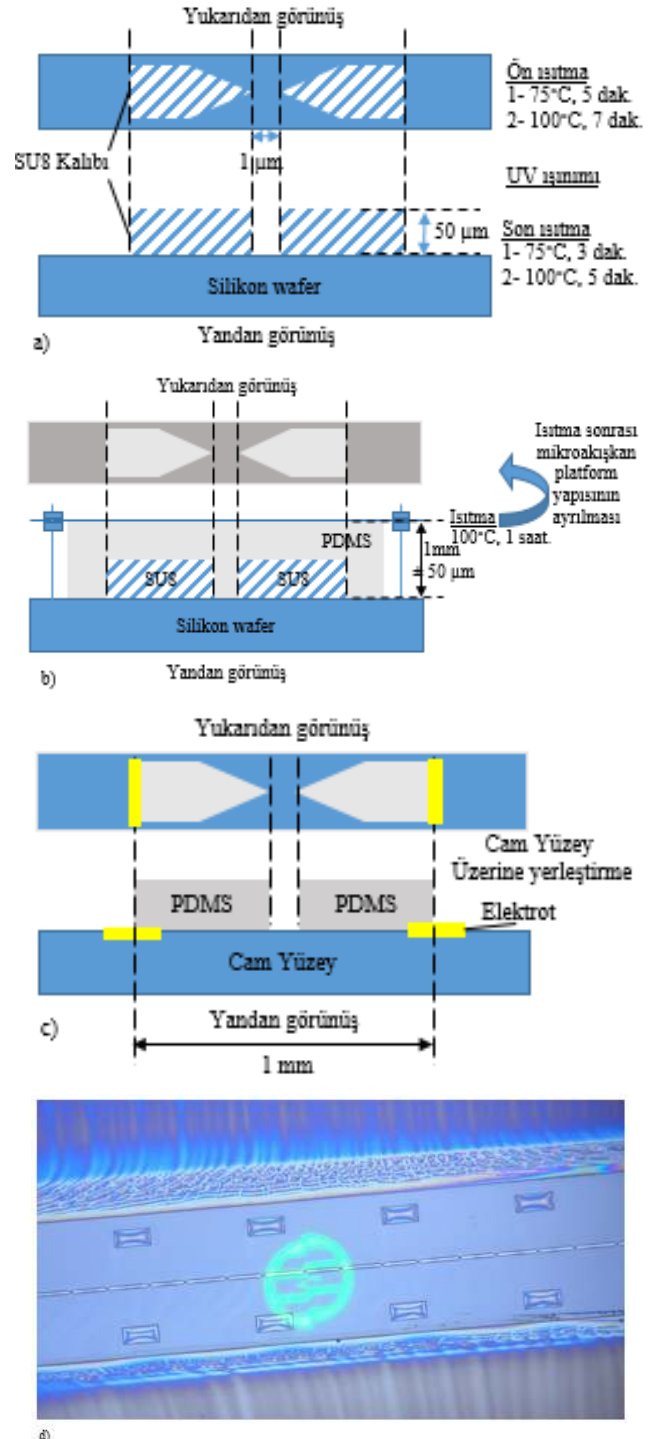
Yarığın bir mikronun altında olması amaçlanmıştır ki sitoplazma geçişi sonrasında füzyona uğrayan hücreler yarığı tıkayabilsin ve çok daha sağlıklı bir hücre füzyonu gerçekleştirebilsin. Eğer yarık daha büyük olsaydı, bu durumda hücre duvarı sadece azıcık delinmekle kalmayacak, tamamen parçalanacaktı. Burada yarık çapı çok küçük tutulduğu için hücre duvarı delindikten sonra oluşan yarıktan sitoplazma geçişi sağlanmış ve sonrasında akım darbesi kesildikten sonra yarık çok küçük olduğu için hücre duvarı kendisini onarabilmiştir. Ancak bu olduğu zaman da hücreler yeni şekli ile tek bir hücre olarak şekilde birbirleri ile kaynaşmıştır. Buna da hücre füzyonu denmektedir.

Çalışma kapsamında hücreler arasında çekirdek geçişi amaçlanmamıştır. Bu çalışmada amaç bu değildir. Bu sebeple çekirdeğin geçemeyeceği bir büyüklük olan $1 \mu\text{m}$ genişlik yarık genişliği olarak bırakılmıştır. Eğer yarık genişliği daha büyük olsaydı, bu durumda hücre duvarı çok büyük delineceği için hücre her zaman hayatta kalamayacaktı. Bu hücre füzyonu çalışmalarında füzyon verimliliğinin düşmesinin en önemli nedenidir. Bu çalışmada ise tek tek hedeflenen bütün hücrelerin füzyona uğraması ve hedefe yönelik yüksek hücre füzyonu oranı hedeflenmiştir. Çalışmanın bu açıdan orijinal ve referans değerinde olduğu düşünülmektedir.

PDMS 1g kütleme ajanı ve 15g prepolimerin karıştırılması sonucu üretilmiştir. Ortaya çıkan PDMS 1 saat boyunca desikatör aracılığı ile gazdan arındırılmıştır. PDMS hazırlanan SU8 fotorezist kalıbına dökülmeden önce bir lam dört adet vida aracılığı ile SU8 fotorezist kalıbının üzerine yerleştirilmiştir. Bu vidaların kalınlığı 1 mm olarak ayarlanmıştır. Bu sayede PDMS döküldüğü zaman kalınlığının en fazla 1 mm olması temin edilmiştir. SU8 fotorezist üzerine yerleştirilen PDMS bir ısıtıcı aracılığı ile 100°C 'de 1 saat boyunca ısıtılmıştır. Sonrasında mikroakışkan platform haline gelmiş olan sertleşmiş PDMS sistemden ayrıştırılmıştır. Son olarak alüminyum elektrodların bağlandığı bir lam üretilmiş ve mikroakışkan hücre füzyonu platformu bu lamın üzerine yerleştirilmiştir. Elektrodların birbirinden uzaklığı 1 mm olarak belirlenmiştir. Bu durum Şekil 2c'de gösterilmiştir. Mikroakışkan hücre füzyonu platformunun son hali ise Şekil 2d'de gösterilmiştir.

2.4. Hücrelerin Yönlendirilmesi

Hücreler sisteme hazırlanan bir enjeksiyon ünitesi yardımıyla giriş yapmaktadır. Hücreler füzyon için hazırlanan tampon çözeltinin içerisine yerleştirilmiş ve toplam olarak 5 ml olacak biçimde hazırlanmıştır. Bu 5 ml lik hücre süspansiyonu $2500 \mu\text{l}$ 'lik iki bölüme ayrılmış ve sonrasında iki enjeksiyon ünitesi yardımıyla iki farklı kanaldan sisteme giriş yapmışlardır. Hücreleri içeren hücre süspansiyonu kanalları tamamıyla doldurduktan sonra daha fazla besleme gerçekleştirilmemiştir. Şekil 3'te gösterildiği



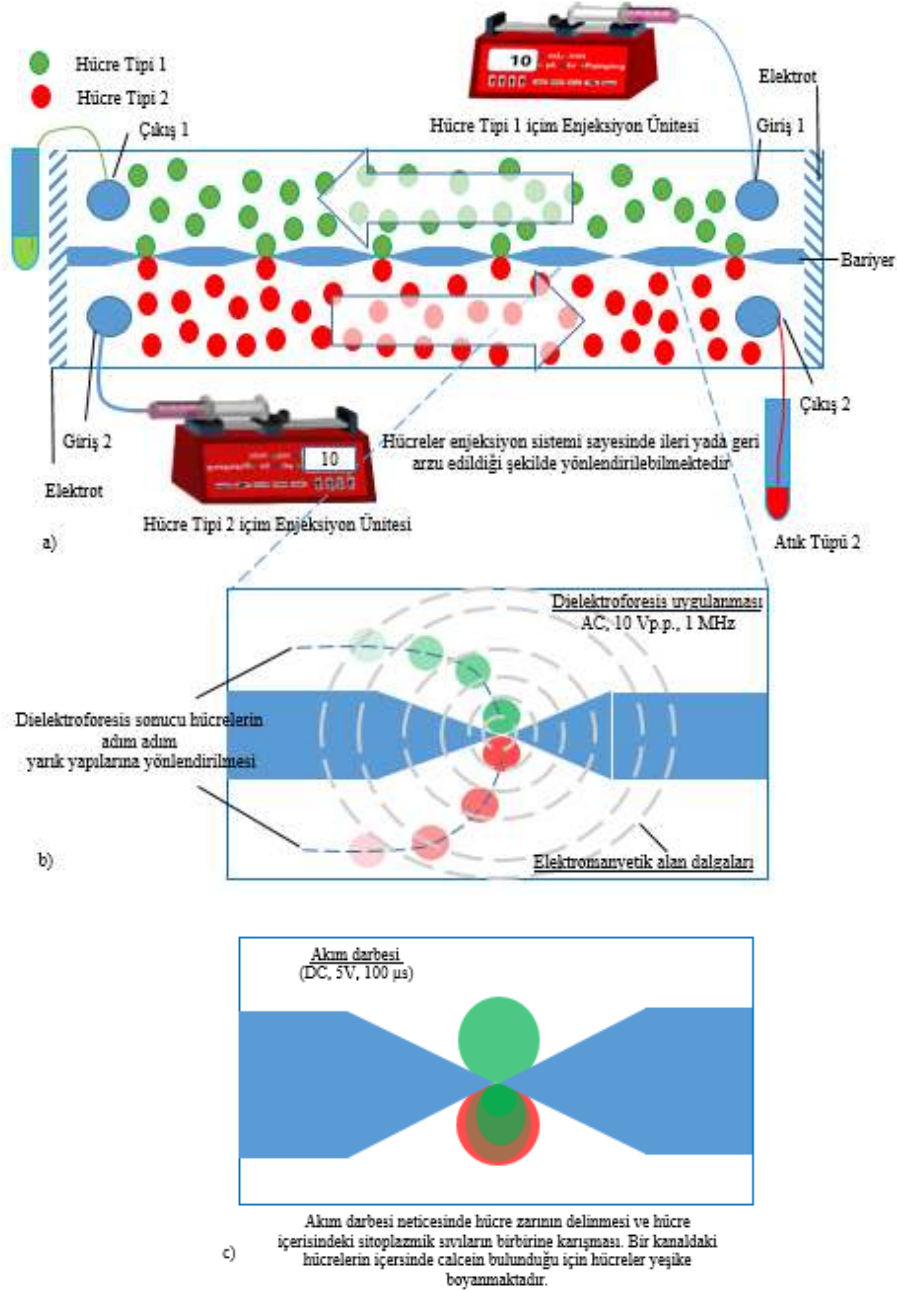
Şekil 2. a) SU8 kalıbının hazırlanması, b) PDMS yapısının SU8 kalıbının üzerine yerleştirilmesi ve sonrasında ayrılması, c) PDMS yapısının elektrot bulunan cam tabakaya yerleştirilmesi d) Mikroakışkan hücre füzyonu platformunun son hali

gibi sistem bir defa hücre süspansiyonu ile doldurulduktan sonra hücreler enjeksiyon ünitesi kontrol edilerek hidrostatik basınç sayesinde ileri ya da geri olacak şekilde arzu edildiği biçimde ve arzu edildiği süratte kontrol edilebilirler. Bu düzenek sayesinde hücrelerin yönlendirilmesi konusunda tam bir hakimiyet tesis edilmiştir.

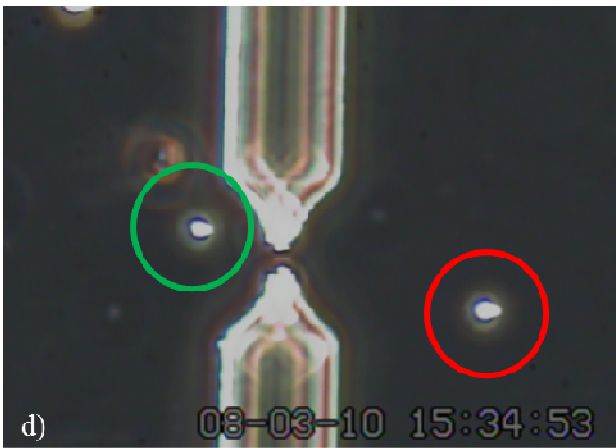
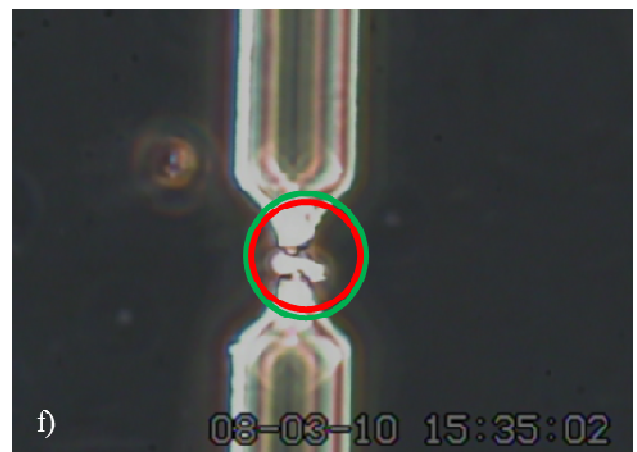
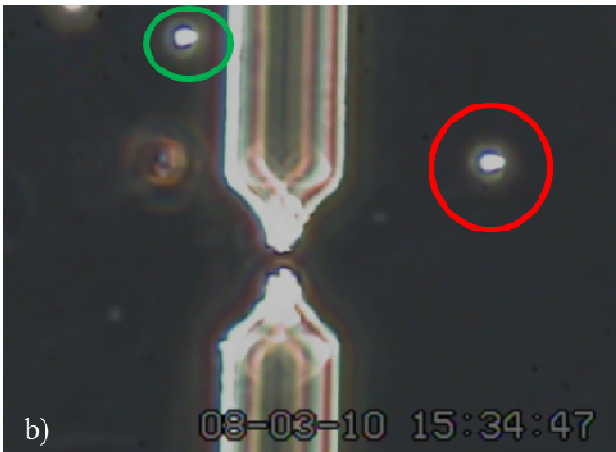
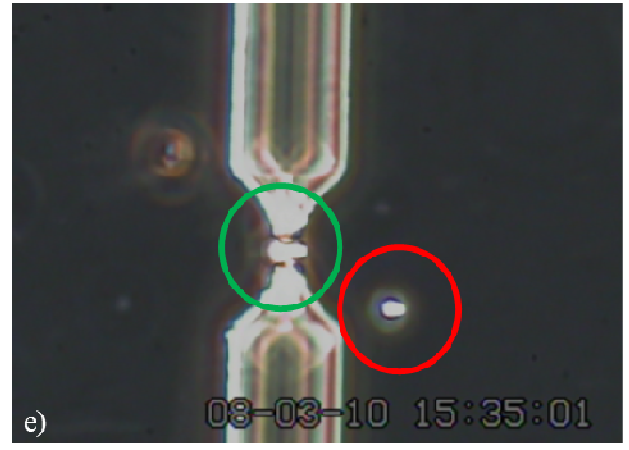
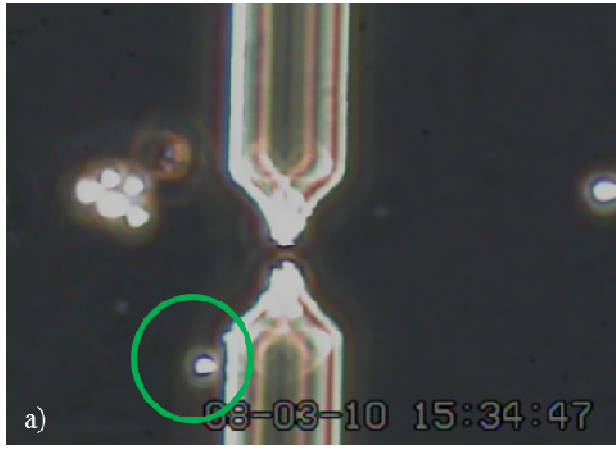
Sonrasında elektriksel alan uygulanmış (AC, 10 Vp.p., 1 MHz) ve hücreler arzu edilen boşluklara dielektroforez yardımıyla yönlendirilmiştir. Nihayetinde hedeflenmiş olan hücrelerin bir araya geldiğinden emin olunduktan sonra elektrostatik alan sona erdirilmiş ve akım darbesi (DC, 5V, 100 μ s) verilerek hücrelerin birbirleri ile füzyona uğraması temin edilmiştir. Sonrasında hücrelere on dakika

boyunca müdahale edilmemiştir. Şekil 4'de bu durum gösterilmiştir.

Hücrelerin nanokanal içerisinde toplandıkları gözlemlenebilir. Ancak tasarlanan bariyer içerisindeki yarıklar yapıları çok küçük olduğu için birden fazla hücrenin yarık üzerinde bulunabilmesi pratik olarak çok zayıf bir ihtimaldir. Gözlemlendiği kadarıyla da böyle bir durum mevcut değildir. Bu bağlamda bu kümelenmelerin yarık civarında toplanmış olmasının bir anlamı yoktur. Bunun deney sonuçlarına bir tesiri olmamıştır.



Şekil 3. a) Üretilen mikroakışkan hücre füzyonu platformunun hücre süspansiyonu ile doldurulduktan sonra enjeksiyon ünitesi kontrol edilerek hücrelerin ileri ya da geri hareket etmelerinin temin edilmesi, b) AC voltaj verilerek hücrelerin dielektroforez ile boşluk yapılarına doğru yönlendirilmeleri, elektromanyetik dalgalar boşluklarda yoğunlaşmaktadır, c) Bir araya gelen hücrelere DC voltaj verilmesi, hücre zarlarının delinmesi ve hücreler arası sitoplazmik sıvıların birbirine karışması



Şekil 4. a, b, c) Bir enjeksiyon ünitesi yardımıyla hidrostatik kuvvet ortaya çıkartılması ve hücrelerin ileri veya geri yönlendirilmesi, d, e, f) Dielektroforez yardımıyla hücrelerin boşluk yapılarına doğru yönlendirilmeleri

3. Bulgular

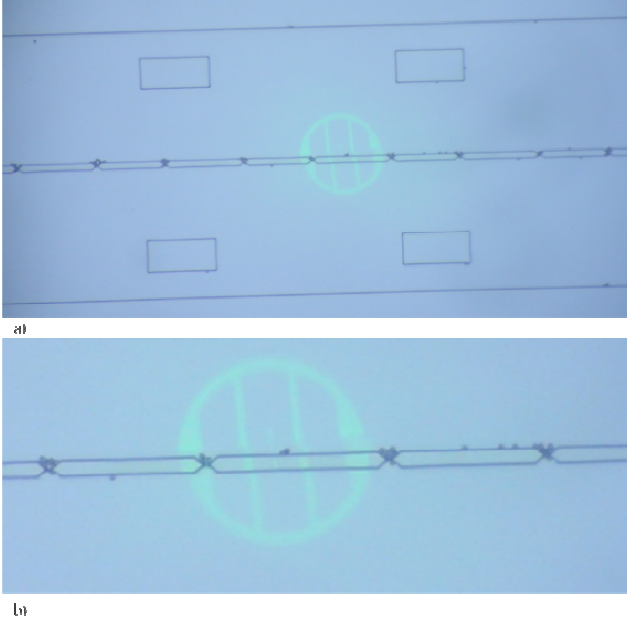
3.1. Hücre Füzyonunun Başarı Oranı

Hücrelerin birbirleri ile füzyona uğramalarındaki başarı oranı doğrudan doğruya mikroskop altında gerçekleştirilen gözlemlerden elde edilmiştir. Şekil 5 deney sonucunda birbirleri ile eşleşen hücreleri göstermektedir. Deney sonucunda hedeflenen hücrelerin %100 oranında yönlendirilerek birbirleri ile eşleştiği gözlemlenmiştir. Eşleştirilen hücrelerin de %95 oranında füzyona uğradıkları belirlenmiştir. Bu füzyon kabiliyeti benzer çalışmalarla kıyaslandığı zaman çok yüksektir.

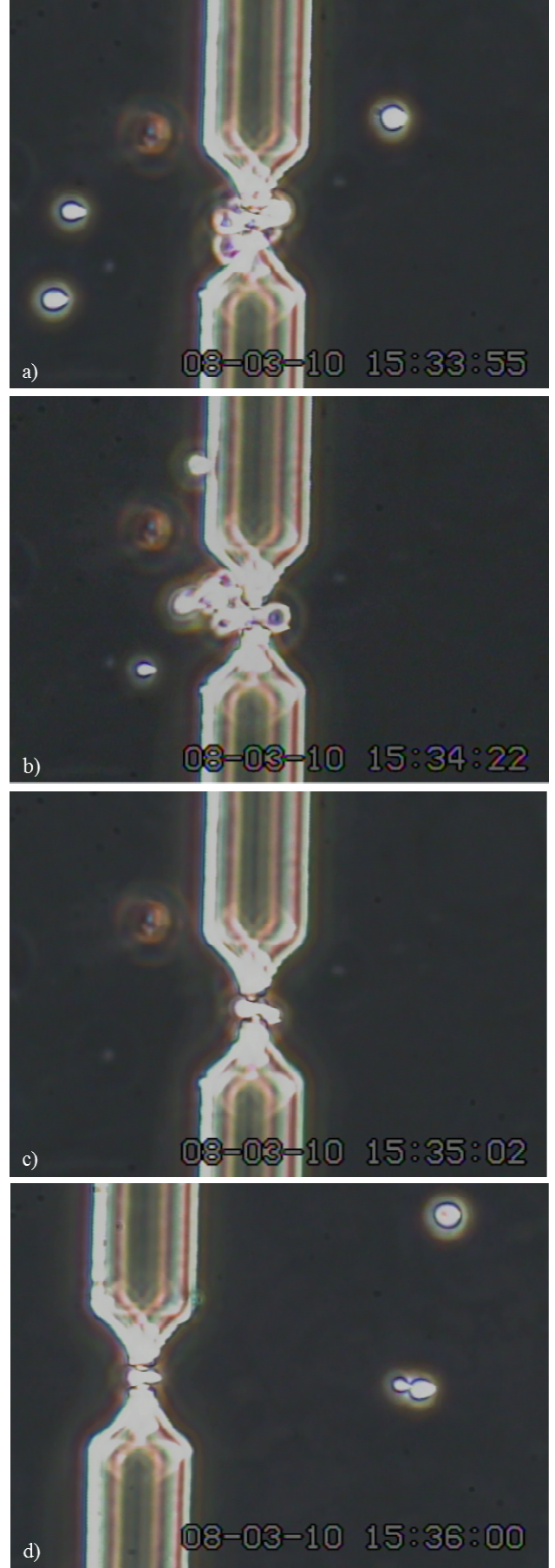
3.2. Füzyon

Deneyin başlangıcında enjeksiyon ünitelerinden bir tanesine calcein eklenmiştir. Bu sayede hücrelerde calcein ile boyanmıştır. Diğer enjeksiyon ünitesindeki hücrelere ise herhangi bir boyar madde ilave edilmemiştir. Hücre füzyonu neticesinde hücrelerin içerisindeki sitoplazmik materyal iki hücreye de dağıldığı için hücrelerin ikisi de calcein ile boyanmıştır. Hücrelerin calcein ile boyanması hücre füzyonunun başarısını göstermektedir. Şekil 6 füzyona uğrayan hücreleri göstermektedir. Şekil 7 füzyon sonrası bütünleşmiş bir hücreyi göstermektedir. İki hücrede de calcein boyar maddeden kaynaklı olan yeşil renk

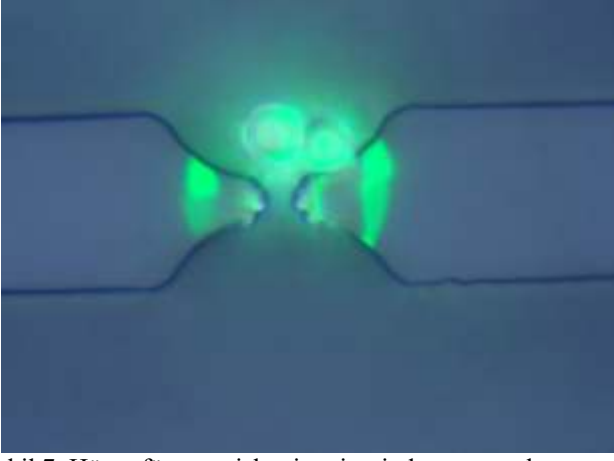
görülebilmektedir. Çalışma neticesinde hedeflenmiş olan hücreler arzu edildiği gibi bir araya getirilmiş ve arzu edildiği gibi füzyona uğramıştır. Çalışma sonrasında füzyona uğramış hücreler on dakika bekletilmiştir. Sonrasında ise PDMS Mikroakışkan hücre füzyonu platformu elektrotlardan ayrılmıştır. Boşluklarda birikmiş olan füzyona uğramış hücreler bu esnada birbirleri ile iyice kaynaştıkları için hareketsiz biçimde kalmaktadırlar. Bu nedenle hücrelerin PDMS platformun hareketi neticesinde dağılması ya da yer değiştirmesi oldukça az bir olasılıktır. Hücreler arasında oluşmuş olan boyun yapısının yeteri kadar sert olduğu kanaatine varılmıştır. Bu platform sonrasında bir petri tabağına yerleştirilmiş ve hücre besisi ortamı içerisinde füzyona uğramış hücrelerin çoğalması temin edilmiştir. Çalışmanın bu kısmı bir Sınıf II biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiş ve steril koşullar temin edilmiştir. Sonrasında hücreler 37°C ve 1 atm basınç altında %20 CO₂ inkübatör kabin içerisine yerleştirilmiştir. Çalışmanın amacı hücrelerin kendi aralarında füzyona uğrama oranlarını arttırmak olduğu için hücre kültürü içerisindeki hücrelerin canlılık testleri gerçekleştirilmemiştir.



Şekil 5.a) Platform üzerinde bir araya gelmiş hücreler, b) yakından görünüş



Şekil 6. a, b, c, d) Platformun boşluklarında toplanmış füzyona uğrayan hücre yapıları



Şekil 7. Hücre füzyonu işlemi neticesinde ortaya çıkmış yeni füzyon hücre

4. Sonuç

Projenin amacı yeni nesil nanomimari ile yüksek verimli ve hedefe yönelik mikroakışkan hücre füzyonu platformu üretmektir. Bu amacı gerçekleştirmek için hidrostatik kuvvet ve dielektroforez teknolojilerinden faydalanılmış ve özel tasarlanmış bir bariyer yapısı sayesinde birbirlerinden farklı çaplarda da olsalar hücrelerin birbirleri ile başarılı bir biçimde füzyona uğramaları temin edilmiştir. Yine ortaya konulan tasarım sayesinde hedeflenmiş olan hücreler istenildiği gibi manipüle edilebilmiş ve istenilen noktada istenilen başka bir hücre ile füzyona uğraması temin edilebilmiştir. Bu özellikle istenmeyen füzyon hücrelerinin önüne geçilebilmesi adına önemli bir başarıdır. Çalışmanın çözmek istediği iki temel sorundan bir tanesi budur. Bu kapsamda %100 oranın da arzu edilen hücrelerin istenen yarığa yönlendirilmesi mümkün olmuş, %95 oranında da yarıklarda toplanmış olan bu hücrelerin füzyona uğraması temin edilmiştir. Bu ölçüde bir kontrol benzeri çalışmalarda gösterilememiştir.

Çözülmesi amaçlanan bir diğer temel sorunda farklı boyutlardaki hücrelerin füzyona uğramasındaki başarı oranını yükseltmektir. Çalışma kapsamında farklı hücre tipleri kullanılmamakla birlikte kullanılan hücreler geneli itibari ile 10 mikron ile 30 mikron arasındadır. Bu hücrelerin farklı farklı ölçeklerde olduğu Şekil 4, Şekil 6 ve Şekil 7'de rahatlıkla görülebilir. Bu açıdan füzyona maruz bırakılan %100 ölçeğinde yönlendirilebilen ve %95 oranında füzyona uğrayabilen hücrelerin hemen hepsi birbirinden farklı yarıçaplara sahiptir. Aynı hücre tipinde olmakla birlikte özdeş değildir.

Bunun ötesinde mikroakışkan hücre füzyonu platformunun tasarımı ve çalışmanın yöntemide tamamen çalışmaya özgü olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bütün biyolojik ve kimyasal ajanların oranları ve bütün elektriksel değerler optimize edilmiştir. Bu amaçla çalışma defalarca tekrar edilmiş ve en ideal değerler keşfedilmeye çalışılmıştır. Netice itibari ile bu çalışmada belirtilmiş olan akım değerleri ve nanomimari tasarımları keşfedilmiştir. Bu sebeplerle çalışmanın alanında özgün olduğu ve yenilik getirdiği düşünülmektedir. Hücre füzyonu tekniği özellikle hücre mühendisliği çalışmalarında gittikçe artan bir öneme sahiptir. Bu durumunda çalışmanın önemini daha da

arttırdığı düşünülmektedir. Bunun ötesinde çalışmanın ayrıca Türkiye'de alanında öncü olarak gerçekleştirilen biyomedikal ve biyomühendislik çalışmalarını da güçlendireceği ön görülmektedir [17-26].

5. Kaynaklar

- [1] Ahkong QF., Fisher D., Tampion W., Lucy JA. (1975). Mechanisms of cell fusion. *Nature*, 253 (5488), 194.
- [2] Zimmermann U., Vienken J. (1982). Electric field-induced cell-to-cell fusion. *Journal of Membrane Biology*, 67 (1), 165-182.
- [3] Vassilopoulos G., Wang PR., Russell DW. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 422 (6934), 901.
- [4] Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz DM., Nakano Y., Scott EW. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416 (6880), 542.
- [5] Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M., Grompe M. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 422 (6934), 897.
- [6] Carroll WL., Mendel E., Levy S. (1988). Hybridoma fusion cell lines contain an aberrant kappa transcript. *Molecular immunology*, 25 (10), 991-995.
- [7] Cowan CA., Atienza J., Melton DA., Eggen K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309 (5739), 1369-1373.
- [8] Tachibana M., Amato P., Sparman M., Gutierrez NM., Tippner-Hedges R., Ma H., Masterson K. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 153 (6), 1228-1238.
- [9] Köhler G., Milstein C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European journal of immunology*, 6 (7), 511-519.
- [10] Chang DC. (1989). Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field. *Biophysical journal*, 56 (4), 641-652.
- [11] Zimmermann U. (1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 105, 175-256.
- [12] Skelley A., M., Kirak O., Suh H., Jaenisch R., Voldman J. (2009). Microfluidic control of cell pairing and fusion. *Nature methods*, 6(2), 147.
- [13] Wang J., Lu C. (2006). Microfluidic cell fusion under continuous direct current voltage. *Applied Physics Letters*, 89(23), 234102.
- [14] Hu N., Yang J., Yin ZQ., Ai Y., Qian S., Svir IB., Zheng XL. (2011). A high-throughput dielectrophoresis-based cell electrofusion microfluidic device. *Electrophoresis*, 32(18), 2488-2495.
- [15] Hu N., Yang J., Qian S., Joo SW., Zheng X. (2011). A cell electrofusion microfluidic device integrated with 3D thin-film microelectrode arrays. *Biomicrofluidics*, 5(3), 034121.
- [16] Kirschbaum M., Guernth-Marschner CR., Cherré S., de Pablo Peña A., Jaeger MS., Kroczeck RA. Duschl C. (2012). Highly controlled electrofusion of individually selected cells in dielectrophoretic field cages. *Lab on a Chip*, 12(3), 443-450.

- [17] Akpek A. (2019). Development of a heart assist device as a vibrational viscometer that estimates blood viscosity. *Journal of the Faculty of Engineering & Architecture of Gazi University*, 34 (1), 235-246.
- [18] Akpek A. (2018). Analysis of biocompatibility characteristics of stereolithography applied three dimensional (3D) bioprinted artificial heart valves, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University* 33(3), 929-938.
- [19] Çiftçioğlu, Ç., Koçak, O., Akpek, A. (2015). Remote control of centrifuge and injection systems via MATLAB and ARDUINO. *Medical Technologies National Conference (TIPTEKNO) (1-4)*. IEEE.
- [20] Akpek, A. (2016). Effect of non-uniform temperature field in viscosity measurement. *Journal of Visualization*, 19(2), 291-299.
- [21] Bulut, S., Özçınar, A., Çiftçioğlu, Ç., Akpek, A. (2015). A new algorithm for segmentation and fracture detection in X-ray images. *Medical Technologies National Conference (TIPTEKNO) (1-4)*. IEEE.
- [22] Akpek, A., Youn, C., Kagawa, T. (2013). Temperature measurement control problem of vibrational viscometers considering heat generation and heat transfer effect of oscillators. *9th Asian Control Conference (ASCC) (1-6)*. IEEE.
- [23] Koçak, O., Kurtuldu, H., Akpek, A., Koçoğlu, A., Eroğul, O. (2016). A medical waste management model for public private partnership hospitals. *Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO) (1-4)*. IEEE.
- [24] Altinsu, B., Koçak, O., & Akpek, A. (2016). Design and analysis of an autoclave simulation using MATLAB/Simulink. *Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO) (1-4)*. IEEE.
- [25] Akpek, A. (2017). Effect of Ambient Temperature Variations on Particle Dimensions in Ultrasonic Nebulizers during Cold Vaporization. *Advances in Science, Technology and Engineering Systems Journal*, 2(3), 946-950.
- [26] Ugar, T., Kogak, O., Akpek, A. (2016). New concept design of an insulin pen for visually impaired or blind diabetus mellitus patients. *Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO) (1-4)*. IEEE.