

HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE İZOLASYONUNDA GÜNCEL YÖNTEMLER

CURRENT METHODS IN ISOLATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELL

Nilgün OKŞAK¹ , Dürdane Serap KURUCA² 

¹Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Şanlıurfa, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: N.O. 0000-0002-6058-9414; D.S.K. 0000-0001-7878-9994

Cite this article as: Oksak N, Kuruca DS. Current methods in isolation of hematopoietic stem cell. J Ist Faculty Med 2021;84(3):415-24.
doi: 10.26650/IUITFD.2020.0058

ÖZET

Hematopoetik kök hücreler (HKH) başta kemik iliği (Kİ) olmak üzere çeşitli hematopoetik organlarda, kordon kanında (KK), aferez materyalinde ve periferik kanda çok az sayıda bulunmaktadır (1-100 hücre/ml). Bu hücrelerin saflaştırılarak diyabet, kanser, kalp, nörolojik hastalıklar, kas ve eklem sorunları olan hastalara nakledilmesi fonksiyonu bozulan doku ve organların rejenerasyonunu sağlayacaktır. Kansere hastalarında otolog kök hücrelerin transplantasyonunda en önemli sorun malign hücre kontaminasyonudur. Allojenik transplantasyonda ise hücreler farklı kişilerden alındığı için, alıcıda meydana gelen immün reaksiyonlar ve doku reddi bu alanın en önemli sorunudur. Dolayısıyla transplant materyalinin tümör hücrelerinden ve immün hücrelerden temizlenmesi nakledildiği dokuda uzun süreli ve sağlıklı rejenerasyonu sağlayacaktır. Klinik kullanım için bu hücrelerin saflaştırılmasında uzun yıllar çeşitli teknikler geliştirilmesine rağmen halen uygun ve etkili bir yöntem bulunmamaktadır. Son yıllarda geliştirilen mikroakışkan sistemler (mikroçipler) kolay, ucuz ve yüksek verimli olması nedeni ile araştırılmaktadır. Çeşitli mikrokapiller, mikrosütunlar, mikroporlarla dizayn edilen bu sistemlerde hücrelerin boyut, mekanik esneklik, deformabilite, hücre adezyonu ve elektrik yükleri gibi özelliklerine dayalı saflaştırma yapılmaktadır. Başlangıçta çok az sayıda bulunan dolaşımdaki tümör hücrelerini (DTH) yakalamak amacıyla geliştirilen bu sistemler şimdi çeşitli hücrelerin, mikroveziküllerin ve eksozomların saflaştırılması ve tanısı için kullanılmaktadır. Bu derleme, geleneksel ve gelişmekte olan hematopoetik kök hücre izolasyon yöntemleri ile bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajlarını açıklamayı amaçlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kök hücre izolasyonu, mikroakışkan sistemler

ABSTRACT

Hematopoietic stem cells are the rare cells in various hematopoietic organs which are found in small numbers (1-100 cells/ml). When these cells are transferred to patients suffering from diabetes, cancer, heart diseases, muscle and joint problems, they will help the patients' bodies with the regeneration of impaired tissues. While the most important problem in the transplantation of autologous stem cells is malignant cell contamination in cancer patients, in allogeneic transplantation, it is immune reactions and tissue rejections. Therefore, clearing of the transplant material from tumour cells and immune cells may support the long-term healthy regeneration of the tissue to which they are transplanted. Although various techniques have been developed for the purification of these cells in terms of clinical use over many years, there is still no sufficiently effective method. In recent years, researchers have shown an increased interest in microfluidic systems because they are easy to use, cheap and highly efficient. In these types of systems designed with various microcapillaries, micropillars and micropores; purification is carried out according to the properties of cells such as size, deformability, cell adhesion and electrical charges. This review aims to explain traditional and emerging hematopoietic stem cell isolation methods and their advantages and disadvantages.

Keywords: Stem cell isolation, microfluidic system

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: nilgunoksak@harran.edu.tr

Submitted/Başvuru: 12.05.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 05.06.2020 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 26.07.2020 • **Accepted/Kabul:** 07.09.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 09.03.2021



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

GİRİŞ

Hücrelerin ve biyomoleküllerin davranışları ve özellikleri, doku ve organların fonksiyonları hakkında bize önemli bilgiler sunar. Hücreler ve biyomoleküller üzerindeki detaylı analizler biyolojik çalışmalarda ve klinik tanıda büyük öneme sahiptir (1). Bu analiz basamaklarından biri de hücre izolasyonudur. Hücre izolasyonu, birçok biyolojik ve biyomedikal araştırmalarda, klinik tedavi ve tanıda yaygın olarak kullanılmaktadır. Klinik kullanım açısından terapötik hücre izolasyonu, hastaya zenginleştirilmiş hücre popülasyonlarının verilmesini sağlar. Lökositlerin aferezle ayrıştırılması veya hematopoetik kök hücreler (HKH) immünomagnetik ayırma ile zenginleştirilmesi buna örnektir (2). HKH nakli, kemik iliği (Kİ) hasar görmüş hastalarda kemik iliği fonksiyonunun yeniden yapılandırılması amacıyla intravenöz ya da oral yüksek doz kemoterapi veya radyoterapiyi takiben yapılan uygulamadır. İlk kez 1939'da aplastik anemi tedavisinde uygulanmıştır. 1950'de hematolojik kanserlerin tedavisinde kullanılmaya başlanmış ancak iyi bir sonuç elde edilememiştir. 1968'de insan lökosit antijenlerinin keşfedilmesiyle allojenik-kök hücre nakli ilk kez Minnesota Üniversitesinde başarıyla gerçekleştirilmiştir (3).

Kök hücre uygulamalarındaki ilerlemeler; daha verimli, basitleştirilmiş, kullanıma hazır ve son derece işlevsel kök hücreler elde etmek için birçok doku tipine geniş çapta uygulanabilen kök hücre izolasyon yöntemlerine duyulan ihtiyacı arttırmıştır (4). Bu yöntemler doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında olduğu gibi biyokimya, elektrik mühendisliği, fizik ve malzeme bilimi gibi birçok alanda da kullanılmaktadır (2). Ticari olarak geçerli ve yaygın olarak kullanılmış birçok kök hücre izolasyon teknikleri olmasına rağmen, etkinlikleri ve özgüllükleri hala yetersizdir (4). Aynı zamanda pahalı ve zaman alma, gelişmiş ekipmanlara ve uzman personele ihtiyaç duyma gibi dezavantajları da vardır (5). Bu derleme, geleneksel ve gelişmekte olan hematopoetik kök hücre izolasyon yöntemleri ile bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajlarını açıklamayı amaçlamaktadır.

HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELERİN KLİNİK UYGULAMADAKİ YERİ

Kök hücreler, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen ve insan vücudundaki birçok farklı doku veya organın kendini onarmasını sağlayan benzersiz hücrelerdir (6). Doku, kan ve Kİ'nde bulunan kök hücrelerin rejeneratif potansiyeli kesin olarak belirlenmiştir. Kök hücre çalışmaları, son yıllarda biyolojinin temel sorunlarını incelemek ve hastalıkların tedavisinde yeni seçenekler sunmak üzere en çok araştırmanın yapıldığı bir alandır (4). Kök hücre nakli, lösemi ve lenfoma gibi bazı malign kan hastalıkları, Kİ-yetmezlikleri ile doğumsal kan hastalıklarının tedavisinde sıklıkla başvurulan hayat kurtarıcı yöntemlerden biridir (7). Bu hastalıklara ek olarak diyabette; deri kaybı, otoimmün, nörolojik, eklem ve kas hastalıklarında, kardiyovasküler hastalıklarda, bazı kanser türlerinde de geniş uygulama

alanı bulmaktadır (8-10). Ayrıca iskemi ve reperfüzyon hasarının tedavisinde kök hücrelerin kullanılması ile aşırı inflamasyonun baskılandığı ve hücre hasarının onarıldığı gösterilmiştir (11).

Hematopoez, HKH'den tüm kan hücre tiplerinin oluştuğu hiyerarşik farklılaşma sürecidir. HKH'ler kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir (12). Kök hücre tedavisinde, klinik kullanımda daha çok bu hücreler tercih edilmektedir. HKH'ler mobilize periferik kan (MPK), kordon kanı (KK) ve Kİ'den elde edilmektedir (13). HKH, kemik iliğinde 1:10.000-15.000 iken dolaşan kanda bu oran 1:100.000'dir (14). Heterojen bir süspansiyondan HKH popülasyonlarının izole edilmesi, klinik uygulama ve temel araştırmaların olmazsa olmaz ön koşuludur (4). Uzun yıllardan beri kök hücrelere, izolasyon yöntemleri uygulanmıştır. Kök hücre izolasyon yöntemleri hücrelerin fiziko-kimyasal, biyo-fiziksel ve immün-afinite özellikleri ile tanımlanan prensiplere göre gruplandırılabilir (Tablo 1).

Tablo 1: Kök hücre izolasyon yöntemleri (15)*

Yöntem	Hücresel özellikler
1. Fiziko-kimyasal bazlı izolasyon Santrifügasyon Membran filtrasyonu	Boyut, yoğunluk ve yapışma özelliklerine göre
2. İmmün-afinite bazlı izolasyon FACS MACS Afinite kromatografisi Sulu iki fazlı afinite izolasyonu	Yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeyine göre
3. Biyo-fiziksel bazlı izolasyon(etiketsiz) FFF DEP	Elektriksel, ataletsel/ataletsel olmayan gibi özellikler
4. Mikroakışkan yöntem ile izolasyon	Çeşitli özelliklere göre (fiziksel, afinite, biyolojik vs.)

FACS: Floresansla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma, MACS: Manyetik Boncuklarla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma, FFF: Alan Akışlı Fraksiyon, DEP: Dielektroforez. *Kaynak 15'ten düzenlenmiştir.

KÖK HÜCRE İZOLASYON YÖNTEMLERİ

1. Fiziko-kimyasal bazlı izolasyon yöntemleri

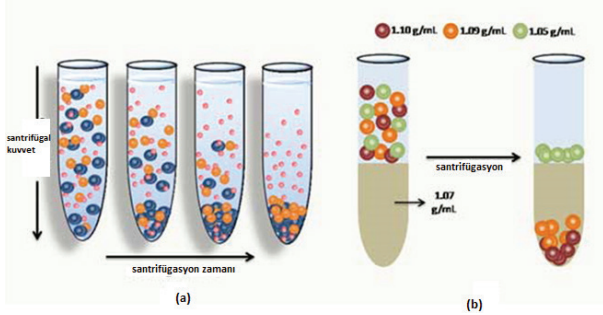
Sedimentasyon tekniği ile hücre fraksiyonlama

Santrifüj ile sedimentasyon, çeşitli tipteki hücrelerin ve hücre parçacıkların izolasyonunda sıkça kullanılmıştır. Bu metod ile heterojen bir hücre karışımı, hücre boyut ve/veya yoğunluğu ile ilişkili çökelmeye dayanan birkaç alt

popülasyona bölünebilir (Şekil 1). Özellikle, polimorfonükleer (PMN) ve mononükleer hücrelerin (MNH) eşzamanlı zenginleştirilmesi için yaygın olarak uygulanmıştır (5). Santrifüjlü bir alanda bir kürenin sedimentasyon (çökeltme) hızı aşağıdaki denklemle bulunur:

$$v = \left(\frac{d^2 (\rho_p - \rho_l)}{18\eta} \right) \times g,$$

Burada v , d , ρ_p , ρ_l , η ve g sırasıyla, sedimentasyon hızı, partikül çapı (hidrodinamik eşdeğer küre), partikül yoğun-



Şekil 1: a) Diferansiyel peletleme; hücreler, temel olarak boyut farklılıklarına göre ayrılır ve hücre ortamı homojen b) Yoğunluk gradyanlı (ör. 1.07 g/ml yoğunluklu Fikol ile) santrifügasyon; hücreler temel olarak yoğunluk ya da boyut farklılıklarına göre ayrılır ve hücre ortamı heterojendir. Kaynak 5'ten düzenlenmiştir.

luğu, sıvı yoğunluğu, ortamın viskozitesi ve merkezkaç kuvvetini ifade etmektedir.

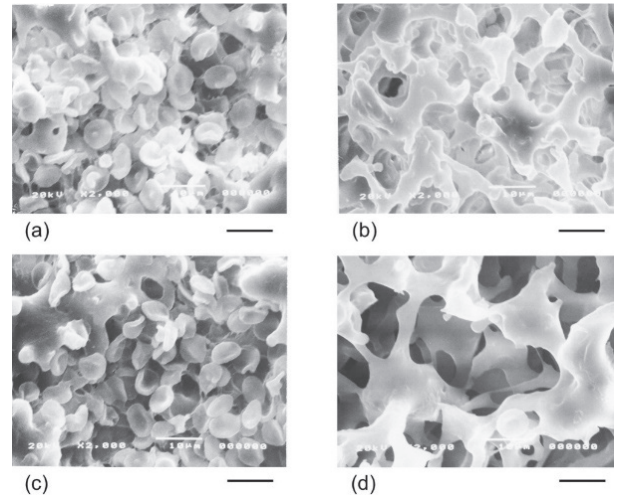
Genel olarak, santrifüj ile sedimentasyon diferansiyel peletleme, yoğunluk gradyanlı santrifügasyon (YGS) ve zıt-aışıklı santrifüjlü yıkama olmak üzere üç ana teknikten oluşur (5, 16). Diferansiyel peletlemede, hücreler temelde boyutlarına göre ayrılır da yoğunluk farklılıkları da bu ayrışmada bir rol oynayabilir. Hücreleri içeren ortam, yoğunluk açısından homojendir. Hücre peletleme, hemen hemen tüm hücre toplama ve yoğunlaştırma işlemlerinde ilk adım olarak kullanılmıştır. Bu teknikte peletlenmiş hücreler ve süspansiyon hücreler olarak iki fraksiyon elde edilir. İlk olarak kök hücrelerin izolasyonu için kullanılan ve daha verimli bir hücre çökeltme yöntemi olan YGS ise, hız-zonal ve izopiknik (eşit yoğunluk) olmak üzere iki alt kategoride incelenebilir. Hız-zonal santrifügasyonda ayrıştırma medyumun yoğunluğu, sedimente olacak hücre/materyalin minimum yoğunluğundan daha düşüktür (5). Santrifügal kuvvet etkisi ile partiküller yukarıda belirtilen özelliklerine bağlı olarak farklı yoğunluktaki solüsyon içerisinde belirli bölgelerde toplanırlar. İzopiknik santrifügasyonda kullanılacak medyumun yoğunluğu ayrıştırılacak hücre/materyalin yoğunluğundan fazladır. Hücre canlılığı, saflığı ve verimi için ayrıştırma medyumunun doğru seçimi, sağlam hücre popülasyonlarının izolasyonunda önemli bir rol oynar. Uy-

gun bir medyumun iki önemli özelliği osmolaritesi ve viskozitesidir. Hayvan hücrelerinin hücre duvarı olmadığı için, canlılık ve yoğunlukları osmolarite dalgalanmalarından oldukça etkilenir. Fikol, sakaroz, sığır serum albümini (BSA), perkol ve iyodin bileşenleri gibi farklı ayrıştırma medyum türleri bugüne kadar sayısız araştırmada kullanılmıştır. Fikol, en yaygın şekilde kullanılan YGS medyumlarından biridir; oldukça hidrofilitiktir ve normal fizyolojik osmolaliteyi aşmadan maksimum 1.2 g/mL yoğunluğa sahip bir yoğunluğu kapsayan %50'ye kadar konsantrasyonları hazırlamak için kullanılabilir (5). Periferik kan MNH'lerin rutin olarak ayrılmasında, Ficoll-Paque™ (yoğunluk: 1.077 g/mL) yaygın olarak kullanılmaktadır (4, 5).

Zıt-aışıklı santrifüjlü yıkama, hücreleri boyut ve yoğunluğuna göre ayırır. Bu yöntem kaldırma kuvveti prensibine dayanır ve işlemler kapalı sistemde gerçekleşir. 1970'lerden beri özellikle beyaz kan ve kök hücrelerin toplanmasında ve plazmaferezde kullanılmaktadır. Konik santrifüj haznesindeki hücre, dışa doğru santrifügal kuvvete ve içe doğru akışkan kuvvete maruz bırakılır (16). Hücreler santrifügal bir kuvvete maruz bırakılırken, seçilen bir ortamda sürekli olarak merkezci bir yönde akar. Yıkama bölmesinde, her hücre, sedimentasyon hızının sıvının akış hızı ile tam olarak dengelendiği bir bölgeye göç etme eğilimindedir. Haznenin geometrisi (konik) bir uçtan diğer uca farklı akış hızları gradyanı ürettiğinden, süspansiyonda çok çeşitli sedimentasyon hızına sahip hücreler tutulabilir. Yıkama sıvısının akış hızını adım adım artırarak veya rotor hızını azaltarak, homojen boyuttaki hücrelerin ardışık popülasyonları haznedenden elde edilebilir (17).

Membran filtrasyonu

Hücre izolasyonu; sadece hücrenin boyutuna ve membran por boyutuna göre gerçekleşmez, aynı zamanda ayrıştırma membranına hücre yapışmasının diferansiyel yo-



Şekil 2: PU membranların SEM görüntüleri. (a,b) kan permeasyondan sonra ortalama gözenek çapı: 5.2 µm; (c,d) ortalama gözenek çapı: 12 µm. Kaynak 18'den düzenlenmiştir.

ğunluğuna da bağlı olabilir. Hızlı, basit bir yöntemdir ve filtrasyon işlemi sırasında sterilite kolayca korunabilir (15).

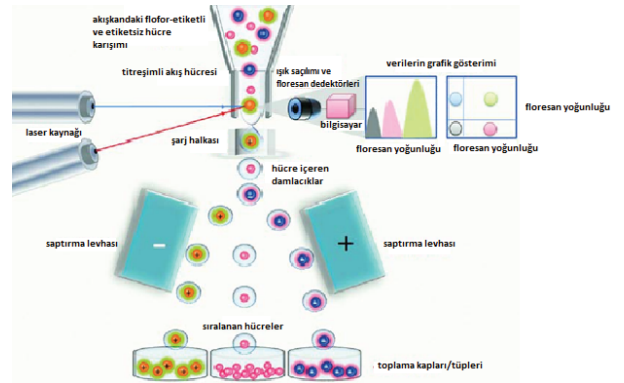
Şekil 2'de taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenen HKK (CD34(+)) hücreler izolasyonunda kullanılan PU (poliüretan) membranlar gösterilmektedir. Yukarıdaki şekilde PU membranlarından kan hücrelerinin geçirilmesinde, HKK'nin (CD34(+)) hücreler süzülme (permeasyon) hızının en düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum CD34(+) hücrelerinin kırmızı kan hücrelerinden (eritrosit, trombositler, T ve B hücreleri) daha yapışkan özelliğe sahip olduğunu düşündürmüştür. Kordon kanından veya kemik iliğinden ilkel HKK ve progenitor hücrelerin izolasyonunda membran filtrasyonunun MACS veya FACS yöntemlerinden daha etkili olduğu söylenilmektedir (18). Membran filtrasyonları, kan transfüzyonu esnasında AIDS ve hepatit C gibi viral enfeksiyonları önleyen lökositleri ayrıştırmak için de kullanılır (19). Bu teknikle kan hücrelerinin dışında, Fatanat ve arkadaşları sıçan beyin dokusundan nadir oligodendrosit progenitor hücreleri başarıyla izole etmişlerdir (20). Burada 5 µm çapında membran porlar kullanılarak %99'dan fazla verim elde edilmiştir.

İyi bir performans için membran filtrelerin dikkatli tasarlanması önemlidir. Hücre izolasyonu verimini, doğruluğunu ve hassasiyetini en üst düzeye çıkarmak için, membranların doğru ve düzgün gözenek/por geometrisine sahip olması ve termal ve mekanik olarak kararlı olması gerekir. Gözenek/por çapının doğru seçimi, hedef hücreleri ayırmak için çok önemli tasarım parametresidir. Temel olarak basit bir yöntem olmasına rağmen, gözenek/porların tıkanması ya da hücrelerin parçalanması gibi dezavantajları da mevcuttur (21).

2. İmmüno-afinite bazlı izolasyon yöntemi

Floresansla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma (FACS)

FACS, bir akış sitometrisi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen etkili bir hücre ayırma yöntemidir. Akış sitometride hücreler boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüller açısından tanımlanır. Bu amaçla, hedeflenen hücre önce floresan madde (flofor) ile işaretli bir antikor kullanılarak işaretlenir; ardından hücre süspansiyonu, akış sitometriden geçirilir. FACS da flofor konjuge antikorun varlığına ve yoğunluğuna göre hücreleri sıralar (21). FACS ile hücre izolasyonunda, flofor ile konjuge antikorlar hücre yüzeyi antijenlerine bağlanır ve lazer ışınıyla uyarıldıklarından (ekstra enerji yüklenmiş olduğundan) floresan ışığı yayarlar (2). Heterojen süspansiyondaki etiketlenen hücreler merkezi kanaldan hava basıncı ile sıvı içinden tek sıra halinde lazer ışını boyunca kanaldan geçirilir. Paralel yayılan ışın hücre büyüklüğü (forward scatter channel, FSC çizgisi), dikey açı ile yayılan ışın hücrelerin granüler içerikleri ve iç yapısı (side scatter channel, SSC çizgisi) hakkında bilgi verir (Şekil 3). Bu fiziksel parametreler; tek başına granüler PMN hücreler, MNH'ler ve kırmızı kan hücreleri (RBC) belirgin bir şekilde tanımlayabilir (22).



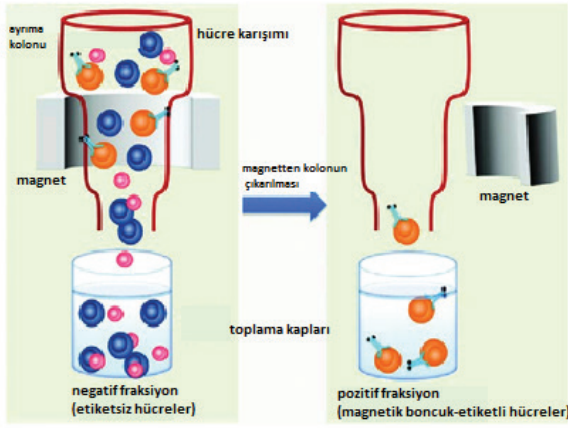
Şekil 3: Etiketlenmiş (yükü) ve etiketlenmemiş hücreler içeren sıvının lazer ışınlarından geçirilmesi ile hücre sıralama, Kaynak 5'ten düzenlenmiştir.

FACS, kök hücre biyolojisinde ve immünolojide geniş uygulama alanına sahiptir. İlk olarak lenfositlerin karakterizasyonu ve sıralanması için kullanılmıştır (HIV izlenmesi için CD4(+) T hücresi) (23). FACS; kök hücre, nadir hücre (<= %0,1), MNH ve PMN hücre, lenfosit, trombosit, dolaşımdaki fetal hücre, sperm hücre gibi birçok hücrenin saflaştırılmasında tercih edilen bir yöntemdir (24-27).

Manyetik Boncuklarla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma (MACS)

Manyetik boncuklarla aktifleştirilmiş hücre saflaştırılması, genellikle hücreleri izole etmek için manyetik boncuk ile konjuge antikorların kullanıldığı bir yöntemdir. Basit bir izolasyon ile 10-45 dakikada 2×10^{10} hücre saflaştırılabilir ve hedef hücre 100 kat zenginleştirilebilir (5). Hücreleri etiketlemek ve ayırmak için, birçok tipte manyetik mikro boncuklar ve nano boncuklar geliştirilmiştir. MACS yönteminde, hücreler manyetik boncuklarla etiketlendikten sonra bir mıknatıs ile, işaretli hücreler tüp çeperinde tutularak istenmeyen hücreler atılır (2). MACS'ta hücrelerin zenginleştirilmesi, pozitif veya negatif işaretleme yoluyla gerçekleştirilir. Pozitif işaretleme, hedef hücreler doğrudan manyetik boncukla konjuge antikor ile etiketlenir ve daha sonra bu hücreler toplanır; negatifte ise, manyetik boncukla etiketlenmiş hücreler atılır ve etiketlenmeyen hücreler toplanır (16). Şekil 4'de manyetik boncuklarla aktifleştirilmiş, pozitif ve negatif işaretleme ile hücre ayırma yöntemi gösterilmektedir.

MACS uygulamasının başarılı örnekleri arasında hastalarda, kemik iliği transplantasyonu yerine insan KK'dan veya MPK'dan izole edilen nadir progenitor hücrelerin kullanılmasıdır (28). MACS ile sitotoksik T hücreler elimine edilerek, kemik iliği naklinde greft-versus host hastalığı (GVHH) gelişme riski azaltılır. Kritik ekstremitte iskemisinin tedavisi için planlanan Faz I klinik çalışmada, MACS ile saflaştırılmış otolog CD34 (+) hücreler ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir (29). Ayrıca KK veya Kİ'den, MACS ile entegre, yoğunluk gradyanlı santrifüjasyon kullanılarak CD34 (+) hematopo-

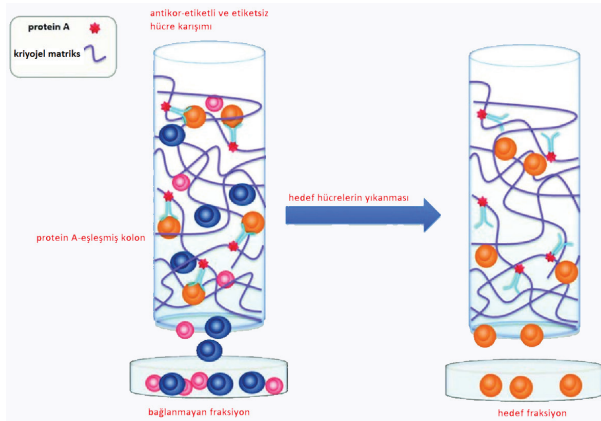


Şekil 4: Manyetik boncuklarla aktifleştirilmiş hücre ayırmanın görünümü, Kaynak 5'ten düzenlenmiştir.

etik kök hücreler veya progenitör hücreler hemato-onkolojik hastalıkların tedavisi için izole edilmiştir (30).

Afinite kromatografisi

Hedef biyomolekül ile spesifik ve geri dönüşümlü olarak kompleks oluşturabilen ligandın, çözünmeyen bir destek materyali (matris) üzerine immobilize edilmesine dayalı güçlü bir ayırma yöntemidir. Hedef olmayan biyomolekül afinite matris kolonundan ayrılır (5). Daha sonra hedef



Şekil 5: Hücre afinite kromatografisi. Antikor-etiketli ve etiketlenmemiş hücrelerin, protein A eşleşmiş kolona yüklenmesi, Kaynak 5'ten düzenlenmiştir.

biyomolekül pH'sı değiştirilerek veya bir tuz çözeltisi eklenerek iyonik gücünü değiştirerek kolondan ayrılır (31) (Şekil 5).

Bu yöntem protein, enzim, karbonhidrat, vitamin gibi pek çok molekülün ayrılmasında, antijen ve antikor saflaştırılmasında ve hücre izolasyonunda kullanılmaktadır (5, 32). Hücre izolasyonu için en yaygın olarak kullanılan spesifik ligand, protein A'dır (PrA). Hücrelerin kolondan geçişi sı-

rasında, daha önce hedef hücrelere eklenmiş olan spesifik IgG, Fc bölgesinden PrA'ya bağlanır. PrA kolonu hücre izolasyon etkinliğini artırır ve her hücre tipi için spesifik bir kolonun hazırlanma ihtiyacını ortadan kaldırır (5). Ligandın uygun seçilmesi ve kolon matrisinin hidrofilik, büyük gözenekli, sert (rigid), kimyasallara karşı stabilite gibi özelliklere sahip olması izolasyonda başarıyı artırmaktadır (33). Literatürde afinite kromatografi yöntemiyle CD34 (+) hücrelerin izole edildiği bildirilmektedir (5).

Sulu iki fazlı sistemler

Sulu iki fazlı sistemler (SİFS), biyolojik ürünlerin ve hücrelerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir sıvı-sıvı fraksiyonlama yöntemidir. SİFS, polimer-polimer veya polimer-tuz şeklinde sınıflandırılır. Çoğunlukla polimer olarak polietilen glikol (PEG) ve dekstran; tuz olarak fosfatlar, sülfatlar ve sitratlar kullanılmaktadır. Sulu çok fazlı sistemler, suda çözünen polimerin çeşitli kombinasyonlarının karıştırılması takiben "faz" ayrışmasıyla oluşur. Sistemin fazları yoğunluklarına göre üst üste dizilirler ve birbirine komşu her iki fazın arasında yoğunluk-adımı olarak hareket edebilen bir interfaz bulunur. Bu interfaz, nesnelere yakalayabilecek bir bariyer görevi görür (15).

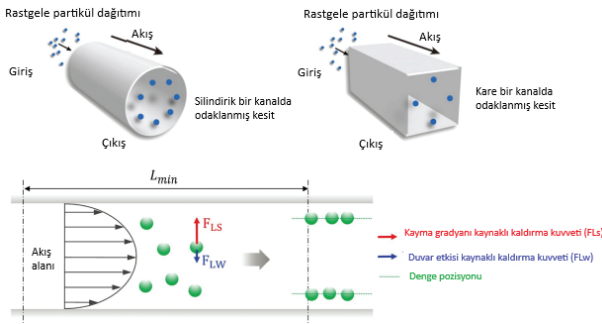
Moleküllerin ya da hücrelerin afinite iki fazdan birinde hidrofobik, boyut ve net yüzey yükü gibi özelliklere göre tanımlanır. Ayrıca özgün SİFS stratejileri ile antikor-bağlı polimerler kullanılarak hücreler izole edilir. Bu yöntem ile ilk defa CD34 antijeni ekspresyon eden akut miyeloid lösemi hücreleri elde edilmiştir. (15). İmmüno-afinite sulu iki fazlı sistem ile insan kordon kanından CD34 (+) hücreler %95 geri kazanım ile saflaştırılmıştır (34). Bu ayrıştırma yöntemi ile HKH saflaştırmasının kolaylaşacağı umut edilmektedir.

3. Biyo-fiziksel bazlı etiketsiz izolasyon yöntemleri

Alan Akışlı Fraksiyon (FFF)

Kök hücrelerin etiketlenmesini gerektirmeyen verimli bir hücre ayırma yöntemidir. FFF'de hücreler, farklı zaman aralıklarında kollektörlere boyut ve morfolojiye göre hareket eden ataletsel veya ataletsel olmayan kuvvetlere maruz bırakılır (4).

Doğrusal kanallarda molekül/parçacıklara sürüklenme ve kaldırma kuvvetleri olmak üzere iki kuvvet etki etmektedir. Sürüklenme kuvveti, parçacığa akış yönünde etki ederek parçacığın hızlanmasını; kaldırma kuvveti ise, akışa dik bir ekseninde parçacığa etki ederek parçacığın ayrışmasını sağlayan kuvvetlerdir. Doğrusal kanallarda bir parçacığa direkt etki eden kuvvetler; 1-kayma gradyanı kaynaklı kaldırma kuvveti, 2-duvar etkisi kaynaklı kaldırma kuvvetleri olarak tanımlanır. Eğrisel kanallarda ise parçacığa direkt etki etmeyen kuvvetler bulunmaktadır (35). Ataletsel kuvvet ile düz kanallarda kayma gradyanı kaynaklı kaldırma kuvveti ve duvar etkisi kaynaklı kaldırma kuvvetlerinin denge pozisyonu, hücrelerin boyutsal olarak farklı noktalara odaklanmasını ve dolayısıyla ayrıştırmanın etkin bir şekilde yapılmasını



Şekil 6: Düz bir kanalda atalet göçü, Kaynak 36'dan düzenlenmiştir.

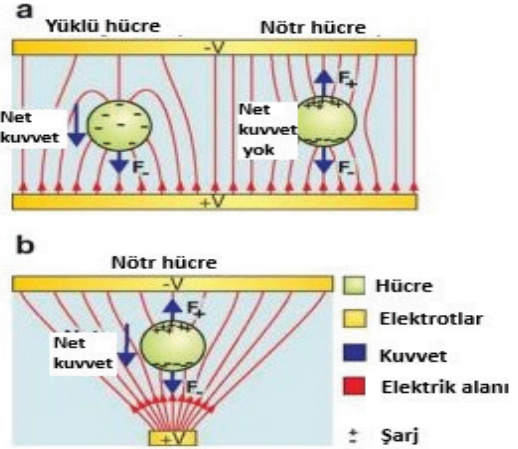
sağlar (Şekil 6) (36). FFF odaklı ayrıştırmada söz konusu olan alandaki akış yerçekimsel, santrifügal, elektriksel veya manyetiksel kuvvetlerin etkisiyle olabilir (36).

Bu yöntemdeki ayrışma, hücrelerin kütle, yük, boyut, yoğunluk, şekil ve rijidite gibi biyofiziksel özelliklerine göre gerçekleşir. FFF, boş bir kılcal kanal içinde, hareketli fazın laminer akışının ve akışa dik olarak uygulanan bir alanın kombine hareketi ile elde edilir. En basit varyantı, yerçekimi alanını kullanan yerçekimsel FFF'dir (15). Yerçekimsel FFF yöntemiyle, fetal membrandan ve amniyonik membrandan elde edilen epitelyal hücrelerden insan mezenterik kök hücrelerin, aferez ürünü kandan insan hematopoetik kök hücrelerin izole edildiği bildirilmiştir (37, 38).

Dielektroforez (DEP)

DEP, değişken (non-uniform) bir elektrik alanına yerleştirildiğinde dielektrik partikül/hücre üzerinde bir kuvvetin indüklenmesi prensibine dayalı yöntemdir. Hücreler yüksüzdür, ancak değişken alanda polarize edilir. Polarize hücreler, DEP kuvveti olarak adlandırılan translasyonel kuvvete maruz kalırlar. Bu kuvvet, hücreyi maksimum alan kuvveti bölgesine doğru çeken (pozitif DEP) ya da bu bölgeden iten (negatif DEP) kuvvettir. Hücreler tarafından elde edilen polarizasyon, hücresel iletkenliğe ve geçirgenliğe, sıvının doğal polarizasyonuna ve ayrıca uygulanan elektrik alanının büyüklüğüne ve frekansına bağlıdır. Elektrik alan gradyanını ve hücreler üzerinde indüklenen kuvveti arttırmak için, hücre karışımına sıklıkla serbest elektrolitli sıvı çözeltiler eklenir (21). DEP ile ayrıştırılan ilk kök hücreler periferik kan veya Kİ'nden elde edilen CD34 (+) HKK'dir (39). Etiketsiz olmanın yanı sıra DEP, izolasyon sırasında hücreleri doğrudan konsantre etmek için de kullanılabilir. Bununla birlikte, hücre büyüklüğü ve dielektroforetik potansiyel farkı, kök hücreleri kök olmayan hücrelerden ayırmak için genellikle yeterli değildir ve DEP ile saflaştırılmış kök hücreler genellikle istenmeyen hücreler tarafından kontamine olur (4). Şekil 7'de elektroforez ve DEP ile yönlendirilen hücreler gösterilmektedir.

Pozitif veya negatif DEP kuvveti; kullanılan elektrotların şekillerinden (silindirik, halka, üçgen vs.), elektrotlar arasındaki mesafeden ve elektrotların diziliminden (eğik



Şekil 7: (a) Elektroforez: yüklü ve nötr hücre (b) DEP: düzgün olmayan bir elektrik alanında nötr bir hücre, Kaynak 40'tan düzenlenmiştir.

veya düzlemsel) etkilendir. Elektrotlar altın, karbon veya silikondan yapılabilir. Yeterli DEP kuvvetleri üretmek için yüksek elektriksel alanlara ihtiyaç vardır, ancak bu durum hücreler üzerinde membran stresi yaratabilir ve hücre ölümlüne yol açabilir (21).

Mikroakışkan sistemler ile izolasyon yöntemi

Geleneksel hücre izolasyon yöntemleri; yüksek sağlamlık, doğruluk ve verim özelliklerinden dolayı endüstriyel ve laboratuvar ortamlarında birçok yarar sağlamaktadır. Bununla birlikte, büyük ölçekli örnek hacimlerine olan ihtiyaç, yüksek reaktif tüketimi, örneklerin çapraz kontaminasyonu ve pahalı ekipman maliyeti gibi bazı dezavantajlar kullanımı engellemektedir. Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için mikroakışkan sistemler (Çip-Üstü-Laboratuvar, ÇÜL) geliştirilmektedir. (21). Tablo 2'de bazı geleneksel kök hücre izolasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları verilmektedir.

Mikroakışkanlara dayanan mikromanipülasyon teknikleri ile tanı ve tedavi için çeşitli hücreler izole edilebilir. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, mikroakışkan cihazlar, yüksek verim ve hassasiyet gibi özelliklere sahiptir (5). Bu sistemler basit, hızlı ve yüksek oranda saflaştırılmış hücreler elde etmek için tasarlanan yöntemler olarak ortaya çıkmıştır. Numune enjeksiyonu, akış ve toplama işlemlerinin tamamı tek bir çip üzerinde gerçekleşmektedir. Hücre saflaştırılmasında mikroakışkan sistemler son on yılda oldukça etkin bir araştırma alanı olmuştur. Bu sistemler, konsantre numunelerde nadir hücrelerin izolasyonunda yüksek verim elde edilmesi, düşük kimyasal tüketimi, ucuz olma, entegrasyon kolaylığı, tekrarlanabilme ve daha yüksek kök hücre geri kazanımı özellikleri nedeni ile kullanılmaktadır (4). Çeşitli mikrokapiller, mikrosütunlar, mikroporlarla dizayn edilen bu sistemlerde hücrelerin boyut, mekanik esneklik, de-

Tablo 2: Geleneksel hücre izolasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları (5)

Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
Santrifüjlü sedimentasyon	<ul style="list-style-type: none">· Basit, hızlı, ucuz bir yöntemdir.· Birden fazla hücre tipi aynı anda izole edilebilir.· Spesifik bir işaretleyiciye ihtiyaç yoktur.· Steril koşullar altında hücre ayrımı gerçekleştirilir.· İşlem tekrarı ile yüksek saflık sağlayabilir.	<ul style="list-style-type: none">· Saflaştırılmış hücre oranı düşüktür.· Yüksek hıza bağlı olarak hücrelere zarar verebilir.· Prosedür uzun bir süre devam ederse tüm hücreler peletlenebilir.
Floresansla aktifleştirilmiş hücre ayırma	<ul style="list-style-type: none">· Hızlı, yüksek saflıkta, yüksek verimle, yüzey veya hücre içi proteinlere dayalı izolasyon yapabilir.· Birden fazla hücre tipi aynı anda izole edilebilir.· Farklı belirteç ekspresyon seviyelerine sahip hücreler, izole edilebilir.· Çoklu parametre analizinde gerekli olan örnek ve reaktif miktarı azalmıştır.· MACS ile karşılaştırıldığında daha verimli bir izolasyon tekniği olarak görülebilir.	<ul style="list-style-type: none">· Pahalıdır.· Uzman personele ihtiyaç vardır.· Homojen bir süspansiyon hazırlamak kritik bir önkoşuldur.· Nadir hücrelerin izolasyonu gerekiyorsa, ön zenginleştirme yöntemleri gerekebilir.· Aseptik koşul oluşturmak zordur, antibiyotik kullanımı gerekir.· Cihaz kullanımından önce her seferde dekontaminasyon işlemi gereklidir.· Hidrodinamik basınç stresi hücre canlılığını etkileyebilir.
Manyetik boncuklarla aktifleştirilmiş hücre ayırma	<ul style="list-style-type: none">· Basit, hızlı, nisbeten ucuz bir yöntemdir.· Yüksek saflıkta ve verimde izolasyon sağlanır.· Nadir hücre popülasyonunun izolasyonunda etkindir.· Sterilite ve geri kazanma kapasitesi yüksektir.· Canlılık ve fenotip büyük ölçüde etkilenmez.· Biyolojide kullanılan tekniklere uyumludur.· Pozitif seçimde yüksek oranda saf hücreler elde edilebilir (saflık: %95-99; verim: %60-99).· Gen ekspresyon profilinin belirlenmesinde ve sinyal iletim deneylerinde faydalıdır.	<ul style="list-style-type: none">· FACS ile karşılaştırıldığında daha düşük saflık ve verim elde edilir.· Hücreler tek seferde sadece bir işaretleyici ile etiketlenebilir.· Yüzey belirteçleri sınırlıdır, istenen hücre yüzeyi antijenleri için spesifik antikor bulunamayabilir.· Antikoron hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması, hücre içi sinyalleşmeyi istenmeyen şekilde etkileyebilir.· Manyetik boncuk yoğunluğunun çok yüksek olduğu durumlarda, hücre büyümesine ve bağlanması engel olabilir.
Hücre afinite kromatografisi	<ul style="list-style-type: none">· Basit, ucuz ve yüksek saflıkta izolasyon sağlar.· Sadece küçük bir sütuna ihtiyaç duyan, en ucuz ve en basit hücre ayırma tekniklerinden biridir.· Kolayca optimize edilebilir.	<ul style="list-style-type: none">· Hücrelerin kolon materyaline bağlanması ve spesifik olmayan etkileşimler akışı azaltabilir.· Sonraki yıkama (elüzyon) işlemleri, hücrelere zarar verebilir.

formabilite, adezyon ve elektrik yükleri gibi özelliklerine dayalı saflaştırma yapılmaktadır (21).

Mikrofiltrasyon, ataletsel yöntem, DEP, akustoforez, FACS, MACS, membran filtrasyonu, sulu iki fazlı sistem veya bunların kombinasyonları ile yapılan izolasyonla farklı hücre ve partiküller ayrılabilir (5, 21, 36). Başlangıçta çok az sayıda bulunan DTH'leri yakalamak amacıyla geliştirilen bu sistemler şimdi çeşitli hücrelerin, mikroveziküllerin ve eksozomların saflaştırılması ve tanısı için kullanılmaktadır (41). Bu stratejiler ayrıca saf HKK'leri ayırıp geri kazanabilmektedir (42)

Mikroakışkan sistemlerden izole edilen hücreler genellikle etiketsizdir ve canlıdır. Bununla birlikte, mikroa-

kışkanlar tamamen dezavantajlardan yoksun değildir. Örneğin, mikroakışkan sistemlerde küçük ölçekli numunelerle çalışmak klinik kullanıma uygun olmayabilir ve biyolojik protokolleri ve sistemlerin ölçeklendirilmesini değiştirmek zor olabilir. Ek olarak, mikrobileşenlerin tasarımı, mikrokanallardaki sıvıların performansını modelleyebilen yazılımların geliştirilmesini gerektirir. Diğer yandan, farklı hücrelerin analizi, hücrelerin kesin olarak tanımlanması ve verilerin yorumlanması için karmaşık ve pahalı optik sistemlerin tasarlanmasını gerektirir (5). Tablo 3'de bazı geleneksel yöntemler ile geliştirilen mikroakışkan sistemler ve izole edilmiş hücre türleri verilmiştir.

Tablo 3: Geleneksel izolasyon yöntemleri ile geliştirilen mikroakışkan cihazlar (21)

Yöntem	µFACS	µMACS	µDEP	µAtaletsel ayrıştırma (boyut)	µSantrifüj ve PFF (boyut ve yoğunluk)	µAkustofrez (yoğunluk ve sıkıştırılabilirlik)
Özellik	Floresan bağlı antikor	Kalıcı mıknatıs Elektromıknatıs Kendinden montajlı mıknatıs	Polarizasyon (dielektroforetik kuvvet)	Ataletsel kuvvet Dean kuvvet	Santrifügasyon PFF	Ses dalgası (akustik kuvvet)
Hücre	Makrofaj E. Coli Fibroblast	Lökositler DTH Kök hücreler Sitokin salgılayan hücreler MCF-7 hücre hattı HIV/AIDS ile ilgili epitoplara E. Coli CD4(+) lenfositler	DTH RBC Trombosit Lökosit Patojenler PC3 hücre hattı Sperm hücresi MG-63 hücre hattı NIH-3T3 hücre hattı	RBC DTH Sıtmayla enfekte hücreler Virüs Aerosoller HPET Plazma CHO HeLa hücre	DTH Lökosit Tam kan hücre Plazma ekstraksiyonu	Apoptotik hücre Prostat kanseri hücre İnsan trombosit Lökosit

µ: Mikroakışkan sistem/cihaz, MCF-7: Meme kanseri hücre hattı, PC3: Prostat kanseri hücre hattı, MG-63: Fare osteosarkom hücre hattı, NIH-3T3: Fare fibroblast hücre hattı, RBC: Kırmızı kan hücre, DTH: Dolaşımdaki tümör hücre, HPET: İnsan Prostat Epitelial tümör hücre, CHO: Çin Hamsteri Yumurtalığı hücre hattı, PFF: Sıkıştırılmış akış fraksiyonlama

Tabloda belirtilen µFACS sistemlerinin düşük verime sahip olduğu; akustik kuvvet ve dielektroforetik kuvvet gibi diğer kuvvetler tarafından çalıştırılan mikro-sistemlerin 10-100 kat daha fazla verime sahip olduğu bildirilmiştir.

SONUÇ

HKH kaynaklarından elde edilen kök hücrelerin hematopoetik rejenerasyonu sağlayabilmesi için kg başına belli bir sayıda olması (en az $3,5 \times 10^8$ MNH/kg ya da $2-6 \times 10^6$ CD34 (+) hücre/kg) ve ağırlıklı olarak pluripotent potansiyelli kök hücreler olması gerekir (43). KK ve Kİ'nden HKH edilmesinde ve kullanımında hala bazı sorunlar vardır. KK'nda bulunan kök hücre sayısı yetişkinlerde sayısal olarak yetersizdir. Bu nedenle KK nerdeyse sadece çocuklarda kullanılabilir (44). Kİ anestezi altında genellikle arka iliak kanattan toplanmaktadır. Birçok hasta için Kİ aspirasyonu rahatsızlık vermenin yanı sıra endişe uyandırıcı invazif bir uygulamadır (45). Ayrıca kanser hastalarında otolog Kİ kullanımında, her ne kadar Kİ remisyonunda toplansa da, tümör kontaminasyonu riski yüksektir. Otolog kök hücre nakline aday hastaların önemli bir kısmında kemik iliğinin malign hücrelerle tutulmuş olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle son yıllarda otolog kemik iliği transplantasyonunun (KİT) yerini bugün periferik kök hücre transplantasyonu (PKHT) almıştır. Her ne kadar otolog PKHT'de tümör kontaminasyonu otolog KİT'den daha azsa olsa da aferez ürünlerinin önemli ölçüde tümör hücreleri içerdiği gösterilmiştir. Evre IV meme kanserli olgularda bu oran %20, evre II yüksek riskli olgularda %11 olarak bulunmuştur (46). Bu kontaminasyon Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalı hastalarda %30 ve %5, nöroblas-

tomlu olgularda ise %15'dir (47, 48). Tümör kontaminasyonunu azaltmak ve CD34 (+) HKH'leri izole etmek amacıyla piyasada çeşitli cihazlar bulunmaktadır. CD34 (+) hücreler immünoadsorbsiyon, immünomanyetik ve akım sitometri yöntemleri ile değişik performanslarda izole edilebilmektedir. Akım sitometri tekniği yüksek oranda tümör hücre depleksiyonu yapmasına karşın, büyük hacimli işlemler için pratik olmadığından (sterilizasyon açısından) çok sınırlı kullanılmaktadır (49). Ayrıca CD34 antijeninin birçok malign tümörde bulunması nedeniyle bu antijene göre yapılan seleksiyonun tümör kontaminasyonunu elimine etmediğini göstermektedir.

Periferik kök hücre transplantasyonunda karşılaşılan bir diğer problem, nadir ama çoğu zaman ölümlü sonuçlanabilen bir komplikasyon olan Greft-versus host hastalığının oluşma riskinin olmasıdır. GVHH'yi engellemek için transfüze edilen bileşendeki immünojenik yönden aktif hücrelerin (T lenfositleri) çoğalmasını önlemek gerekir ve bunun için gama ışınlatma (irradiyasyon) yapılır. Irradiyasyon işlemi de plazma potasyum düzeyini banka kanını iki katına çıkararak hiperpotaseminin ve kardiyovasküler rahatsızlıkların oluşmasına neden olabilmektedir (50). Kök hücre araştırmaları ve tedavilerindeki bu engeller nedeniyle kolay uygulanabilir, düşük maliyetli, hızlı ve yüksek verimlilikle rejeneratif potansiyeli yüksek kök hücre elde edilmesini sağlayacak, kök hücre izolasyon yöntemlerine olan ihtiyacın artmasına yol açmıştır. Günümüzde mikroakışkan sistemlerin (ÇÜL) bu ihtiyacı karşılayacağı ve yukarıda bahsedilen kısıtlamaların üstesinden gelebileceği tahmin edilmektedir.

Açıklama: Derlemedeki resimler alıntı yapılan kaynaklarından Türkçeye çevirilerek hazırlanmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- N.O., D.S.K.; Veri Analizi/Yorumlama- N.O., D.S.K.; Yazı Taslağı- N.O., D.S.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- N.O., D.S.K.; Son Onay ve Sorumluluk- N.O., D.S.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Acknowledgement: The images in this review were reproduced from the cited references with Turkish translation.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- N.O., D.S.K.; Data Analysis/Interpretation- N.O., D.S.K.; Drafting Manuscript- N.O., D.S.K.; Critical Revision of Manuscript- N.O., D.S.K.; Final Approval and Accountability- N.O., D.S.K.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Gou Y, Jia Y, Wang P, Sun C. Progress of inertial microfluidics in principle and application. *Sensors (Basel)* 2018;18(6):1762. [CrossRef]
- Tomlinson MJ, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham K. Cell separation: Terminology and practical considerations. *Journal of Tissue Engineering* 2012; 3(1):1-14.
- Metin S, Dere H. Hematopoetik kök hücre nakli ve güncel beslenme yaklaşımları. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2017;26(1):22-31. [CrossRef]
- Zhu B, Murthy SK. Stem cell separation technologies. *Curr Opin Chem Eng.* 2014;2(1):3-7. [CrossRef]
- Rahmanian N, Bozorgmehr M, Torabi M, Akbari A, Zarnani AH. Cell separation: Potentials and pitfalls. *Prep Biochem Biotechnol* 2017;47(1):38-51. [CrossRef]
- Kenry, Leed WC, Loh KP, Li CT. When stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine. *Biomaterials* 2018;155:236-50. [CrossRef]
- Erdem-Kuruca S, Celik DD, Demirel G, Ozerkan D. Characterization and isolation of very small embryonic-like (VSEL) stem cells obtained from human peripheral blood. *Stem Cell Rev Rep* 2019;15(5):730-42. [CrossRef]
- Chhabra P, Brayman KL. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope. *Stem Cells Transl Med* 2013;2(5):328-36. [CrossRef]
- Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka, G. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (adscs), comparison with mesenchymal stem cells (mscs). *Int J Mol Sci* 2019;20(10):2523. [CrossRef]
- Zhang CL, Huang T, Wu BL, He WX, Liu D. Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Oncotarget* 2017;8(43):75756-66. [CrossRef]
- Almendros I, Carreras A, Montserrat JM, Gozal D, Navajas D, Farre R. Potential role of adult stem cells in obstructive sleep apnea. *Front Neurol* 2012;3:112. [CrossRef]
- Yo M, Sakaue-Sawano A, Noda S, Miyawaki A, Miyoshi H. Fucci-guided purification of hematopoietic stem cells with high repopulating activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;30;457(1):7-11. [CrossRef]
- Ng AP, Alexander WS. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discovery* 2017;3:17002. [CrossRef]
- Sargin D. Kök hücre ve kök hücre tedavisi. XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu; 10-14 Ekim 2003; İstanbul, 2003. p. 49-61.
- Diogo MM, Silva CL, Cabral JMS. Chapter 7: Separation technologies for stem cell bioprocessing. In: Mohamed Al-Rubeai, Mariam Naciri, editors. *Stem Cells and Cell Therapy*. Dordrecht: Springer; 2014. p. 157-181. [CrossRef]
- Hoeve MA, De Sousa, PA, Willoughby NA. Chapter: 5. Challenges of scale-up of cell separation and purification techniques: 5.3.3.1. Centrifugal Counterflow Elutriation (CCE). In: Connon Che J, editor. *Bioprocessing for Cell-Based Therapies*. UK: John Wiley & Sons; 2017. p. 138-140.
- Bachère E, Chagot D, Henri Grizel H. Cell Separation by centrifugal elutriation. *American Fisheries Society Special Publication* 1988;18:281-5.
- Higuchi A, Lizuka A, Gomei Y, Miyazaki T, Sakurai M, Matsuoka Y, et al. Separation of CD34+ cells from human peripheral blood through polyurethane foaming membranes. *J Biomed Mater Res A* 2006;78(3):491-9. [CrossRef]
- Muller-Steinhardt M, Hennig H, Kirchner H, Schlenke P. Prestorage WBC filtration of RBC units with soft-shell filters: Filtration performance and impact on RBCs during storage for 42 days. *Transfusion* 2002;42(2):153-8. [CrossRef]
- Fatanat T, Li K, Veres T, Tabrizian M. Separation of rare oligodendrocyte progenitor cells from brain using a high-throughput multilayer thermoplastic-based micro fluidic device. *Biomaterials* 2013;34(22):5588-93. [CrossRef]
- Yousuff CM, Wei-Ho ET, Ismail Hussain K, Hamid NHB. Microfluidic platform for cell isolation and manipulation based on cell properties. *Micromachines* 2017; 8 (15): 1-26. [CrossRef]
- Actor JK, Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology. Second Edition. Elsevier Inc.; 2012. p. 71-9. [CrossRef]
- Prince H, Arens L, Kleinman S. CD4 and CD8 Subsets Defined by Dual-color Cytofluorometry which Distinguish Symptomatic from Asymptomatic Blood Donors Seropositive for Human Immunodeficiency Virus. *Diagn. Clin. Immunol* 1986;5(4):188-93.
- Johnson KW, Dooner M, Quesenberry PJ. Fluorescence activated cell sorting: A window on the stem cell. *Curr Pharm Biotechnol* 2007;8(3):133-9. [CrossRef]
- Will B, Steidl U. Multi-parameter fluorescence-activated cell sorting and analysis of stem and progenitor cells in myeloid malignancies. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23(3):391-401. [CrossRef]
- Curtis MG, Walker B, Denny TN. Flow cytometric methods for prenatal and neonatal diagnosis. *J Immuno Methods* 2011;363(2):198-209. [CrossRef]

27. Garner DL, Evans KM, Seidel GE. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. *Methods Mol Biol* 2013;927:279-95. [\[CrossRef\]](#)
28. Mahmoud TMS. Selection of non-apoptotic, DNA intact spermatozoa. Groningen: University of Groningen. 2009.
29. Rodrigues GMC, Fernandes TG, Rodrigues CAV, Diogo MM, Cabral JMS. Chapter 9- enrichment and separation technologies for stem cell-based therapies; 9.2.1 Adult stem cells. In: Cabral JMS, Cláudia Lobato da Silva, Chase LG, Diogo MM, editors. *Stem Cell Manufacturing*. Elsevier; 2016. p. 199-213. [\[CrossRef\]](#)
30. Fernandes TG, Diogo MM, Cabral JMS. Stem cell separation. *Stem Cell Bioprocessing For Cellular Therapy, Diagnostics and Drug Development*. Woodhead Publishing Series in Biomedicine; 2013. p. 115-41. [\[CrossRef\]](#)
31. Firer MA. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2001;49(1-3):433-42. [\[CrossRef\]](#)
32. Hage DS, Cazes, J, editors. *Handbook of Affinity Chromatography*. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Pres; 2005. p. 856. [\[CrossRef\]](#)
33. Hage DS, Clarke W. Affinity chromatography: In: Cazes J, editör. *Encyclopedia of Chromatography*. New York: Marcel Dekker; 2004. p. 40-3.
34. Sousa AF, Andrade PZ, Pirzagska RM, Galhoz TM, Azevedo AM, Silva CL, et al. A novel method for human hematopoietic stem/progenitor cell isolation from umbilical cord blood based on immunoaffinity aqueous two-phase partitioning. *Biotechnol Lett* 2011;33(12):2373-7. [\[CrossRef\]](#)
35. Yılmaz M. Design and fabrication of low cost passive microfluidic systems for particle separation. Istanbul: Istanbul Technical University, 2012.
36. Kim GY, Han JI, Park JK. Inertial microfluidics-based cell sorting. *BioChip Journal* 2018;12(4):257-67. [\[CrossRef\]](#)
37. Roda B, Lanzoni G, Alviano F, Zattoni A, Costa R, Di Carlo A, et al. A novel stem cell tag-less sorting method. *Stem Cell Rev* 2009;5(4):420-7. [\[CrossRef\]](#)
38. Roda B, Reschiglian P, Alviano F, Lanzoni G, Bagnara GP, Ricci F, et al. Gravitational field-flow fractionation of human hemopoietic stem cells. *J Chromatogr A* 2009;1216(52):9081-7. [\[CrossRef\]](#)
39. Talary MS, Mills KI, Hoy T, Burnett AK, Pethig R. Dielectrophoretic separation and enrichment of CD34+ cell subpopulation from bone marrow and peripheral blood stem cells. *Medical and Biological Engineering and Computing* 1995; 33 (2), p. 235-7. [\[CrossRef\]](#)
40. Voldman, J. Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8:425-54. [\[CrossRef\]](#)
41. Gwak H, Kim J, Kashefi-Kheyraadi L, Kwak B, Kyung-A Hyun, Hyo-Il Jung. Progress in circulating tumor cell research using microfluidic devices. *micromachines* 2018;9(7):353. [\[CrossRef\]](#)
42. Lecault V, Vaninsberghe M, Sekulovic S, Knapp DJ, Wohrer S, Bowden W, et al. High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays. *Nat Methods* 2011;8(7):581-6. [\[CrossRef\]](#)
43. Perutelli P, Catellani S, Scarso L, Cornaglia-Ferraris P, Dini G. Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery. *Vox Sanguinis* 1999;76(4):237-40. [\[CrossRef\]](#)
44. Rocha V, Gluckman E. Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Grup. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(1S):34-41. [\[CrossRef\]](#)
45. Trewhitt KG. Bone marrow aspiration and biopsy: Collection and interpretation. *Oncol Nurs Forum* 2001;28(9):1409-17.
46. Franklin WA, Shpall EJ, Archer P, Johnston CS, Garza-Williams S, Hami L, et al. Immunocytochemical detection of breast cancer cells in marrow and peripheral blood of patients undergoing high dose chemotherapy with autologous stem cell support, *Breast Cancer Res Treat* 1996;41(1):1-13. [\[CrossRef\]](#)
47. Sharp JG, Kessinger MA, Vaughan WP, Mann SL, Crouse DA, Dicke KA, et al. Detection and clinical significance of minimal tumor cell contamination of peripheral stem cell harvests. *Int Cell Cloning* 1992;10(1):92-4. [\[CrossRef\]](#)
48. Moss TJ. Sensitive detection of metastatic tumor cells in bone marrow. *Prog Clin Biol Res*. 1994;389:567-77.
49. Nieto Y, Shpall EJ. CD34+ blood stem cell transplantation. In: Reiffers J, Goldman J, Armitage JO (eds). *Blood Stem Cell Transplantation*. London: Martin Dunitz Ltd.; 1998. p. 187-201.
50. Ertuğrul-Örücü N, Yenicesu İ. Bölüm-II: Transfüzyon Merkezi. Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama, Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi, Türkiye 2008 Ulusal IPA (Katılım Öncesi Mali Yardım) Programı: 2016. URL: https://www.kanver.org/Upload/Dosya/ulusal_kan_rehberi. Erişim Tarihi: 07.06.2019.