

ÖZET

HÜCRE GÖÇÜ VE İŞGALİNİ BELİRLEME YÖNTEMİ

1
2
3
4
5
6

Buluş, bir mikroakışkan aygıt (1) kullanarak hücre göçü ve işgalini sürekli veya aralıklı olarak belirleme yöntemi ile ilgilidir.

İSTEMLER

HÜCRE GÖÇÜ VE İŞGALİNİ BELİRLEME YÖNTEMİ

- 1) Hücre göçü ve işgalini belirleme yöntemi olup özelliği;
 - i. Bir mikroakışkan aygıtın (1) orta kanalına (2) matriks (3) yüklenmesi,
 - ii. Aynı mikroakışkan aygıtın (1) test kanalına (4) bir etkenin (5) yüklenmesi,
 - iii. Aynı mikroakışkan aygıtın (1) kontrol kanalına (6) hücrelerin (7) yüklenmesi,
 - iv. Aynı mikroakışkan aygıtın (1) kontrol kanalı (6) üstte olacak şekilde tutularak, hücrelerin (7) kontrol kanalı (6) ve orta kanal (2) arayüzüne çökmelerinin sağlanması ve uygun kültür koşullarında kültürlenmeleri,
 - v. Hücrelerin orta kanalda (2) göçlerinin ve işgallerinin belirlenmesidir.
- 2) İstem 1'deki matriks (3) olup özelliği; matrijel, kolajen, laminin, agaroz, fibrin, puramatriks, alginat, biyouyumlu matriksler veya bunların bir kombinasyonu olmasıdır.
- 3) İstem 1'deki etken (5) olup özelliği; hücreler, hücreli veya hücreless matriks, polimer, kültür ortamı, fizyolojik tampon çözeltisi, hücrelerin koşullandırdığı kültür ortamı, bir veya daha çok biyolojik veya kimyasal molekül veya bunların bir kombinasyonu olmasıdır.
- 4) İstem 1'deki hücreler (7) olup özelliği; hücre hatları, primer kültür hücreleri, biyopsi hücreleri, kök hücreleri veya bunların bir kombinasyonu olmasıdır.
- 5) İstem 1'deki yöntem olup özelliği; orta kanalda (2) hücre göçü ve işgalinin mikroskopi veya spektroskopi ile incelenmesidir.
- 6) İstem 1'deki mikroakışkan aygıt (1) olup özelliği; cam, polidimetilsiloksan (PDMS), polistiren (PS), polimetilmetakrilat (PMMA), sayklic olefin kopolimer (COC) veya bunların bir kombinasyonundan yapılmış olmasıdır.
- 7) İstem 1'deki mikroakışkan aygıt (1) olup özelliği; orta kanalın (2), test kanalı (4) ve kontrol kanalı (6) arasında olmasıdır.
- 8) İstem 1'deki mikroakışkan aygıt (1) olup özelliği; orta kanalın (2), test kanalı (4) ile ve kontrol kanalı (6) ile olan arayüzlerinin birden fazla sütundan (8) oluşmasıdır.
- 9) İstem 1'deki kanallar (2, 4, 6) olup özelliği; her birinin yüklemeler için en az bir deliğinin (9) olmasıdır.
- 10) İstem 1'deki kanallar (2, 4, 6) olup özelliği; 50 mikrometre ve 5 santimetre arasında bir yüksekliğe sahip olmasıdır.

- 1 11) İstem 1'deki kanallar (2, 4, 6) olup özelliği; 50 mikrometre ve 5 santimetre arasında bir
2 geniřliđe sahip olmasdır.
- 3 12) İstem 1'deki kanallar (2, 4, 6) olup özelliği; 500 mikrometre ve 20 santimetre arasında
4 bir uzunluđa sahip olmasdır.
- 5 13) İstem 7'deki sütunlar (8) olup özelliği, en uzun yatay ekseninin 50 mikrometre ve 1
6 santimetre arasında bir uzunluğa sahip olmasdır.
- 7 14) İstem 1'deki mikroakışkan aygıt (1) olup özelliği; üretimi için kullanılan kalıbın UV
8 litografi, üç boyutlu baskılama, metal döküm veya bunların bir kombinasyonu ile
9 oluřturulmasdır.
- 10

TARİFNAME

HÜCRE GÖÇÜ VE İŞGALİNİ BELİRLEME YÖNTEMİ

Buluşun ilgili olduğu teknik saha

Buluş, hücre göçü ve işgalini belirleme yöntemleri ile ilgilidir.

Tekniğin bilinen durumu

Mikroakışkan teknolojisi, kesin uzamsal ve zamansal kontrol, yüksek-çıkıtlı analiz, düşük üretim masrafları ve taşınabilirlik sağlamaktadır. Kullanılan malzeme ve atık hacimleri pikolitre kadar düşük olabilir. Bilinmeyen veya toksik malzemelerden küçük hacimlerin kullanılması güvenli deneysel çalışmayı sağlamaktadır. Ayrıca, mikroakışkan teknolojisi, fizyolojik mikroçevreleri taklit edebilmenin yollarını sağlayabilir. Bu özellik, hücreleri hem sağlık hem hastalık durumlarında daha gerçekçi çalışabilmemize ve ilaç, ajan testi yaklaşımlarını iyileştirmemize yardımcı olabilir. Hayvan testlerinin azaltılmasına da yardımcı olabilir.

Hücre göçü ve işgali en yaygın şekilde Boyden Chamber olarak adlandırılan yöntem ile incelenmektedir. Fakat bu yöntem son-nokta (end-point) yöntemidir. Hücre göçü ve işgalinin sürekli incelenmesine olanak vermez. Kullanılan düzende belli delik büyüklüklerine sahip zarlar vardır. Farklı hücrelere göre bu delik büyüklüklerinin seçilmesi gerekmektedir. Ayrıca zar kullanılması fizyolojik bir ortam sağlanmasını olumsuz etkilemektedir.

Hücrelerin kemotaktik yönelimleri için mikroakışkan aygıt tabanlı aygıtlar ve yöntemler mevcuttur. Fakat Boyden Chamber yöntemini taklit edebilen, ondan daha kullanışlı olan, fizyolojik ortamı daha iyi taklit edebilen ve daha çok veri elde edilmesini sağlayabilecek mikroakışkan tabanlı bir yöntem mevcut değildir.

Buluşun çözümünü amaçladığı teknik problemler

Buluşun amacı, bir mikroakışkan aygıt kullanarak hücre göçü ve işgalini zaman içinde aralıklı veya sürekli inceleyebilmektir.

Belirtilen özellikleri olan yöntem basamakları aşağıdaki şekilde gösterilmektedir.

Çizimler gerekmedikçe ölçekli değildir.

1

2 Şekillerin açıklaması

3 Şekil 1: Yöntem basamakları.

4 a) Mikroakışkan aygıtın (1) üstten görünümü.

5 b) Orta kanala (2) matriks (3) yüklenir.

6 c) Test kanalına (4) etken (5) yüklenir.

7 d) Kontrol kanalına (6) hücreler (7) yüklenir.

8 e) Mikroakışkan aygıt (1) dik tutularak hücrelerin (7) orta kanal (2) ve kontrol kanalı (6)

9 arayüzüne çökmeleri sağlanır.

10 f) Uygun kültür koşullarında tutulan düzenekte hücre göçü ve işgali belirlenir.

11

12 Şekillerdeki referansların açıklanması

13 1. Mikroakışkan aygıt

14 2. Orta kanal

15 3. Matriks

16 4. Test kanalı

17 5. Etken

18 6. Kontrol kanalı

19 7. Hücre

20 8. Sütun

21 9. Delik

22

23 Buluşun açıklaması

24 Buluş, hücre göçünü ve işgalini belirleme yöntemidir. Bu yöntem, mikroakışkan aygıtın (1) orta
25 kanalına (2) matriks (3) eklenmesi, mikroakışkan aygıtın (1) test kanalına (4) bir etkenin (5)
26 eklenmesi, mikroakışkan aygıtın (1) kontrol kanalına (6) hücrelerin (7) eklenmesi,
27 mikroakışkan aygıtın (1) kontrol kanalı (6) üstte kalacak şekilde, uygun kültür koşullarında
28 tutularak, hücrelerin (7) test kanalı (4) ve orta kanal (2) arayüzüne çökmelerinin ve
29 kültürlenmelerinin sağlanması, hücrelerin (7) matriks kanalında göçlerinin ve işgallerinin
30 belirlenmesi aşamalarından oluşur.

31

32 Orta kanala yüklenen matriks (3), matrijel, kolajen, laminin, agaroz, poliakrilamid, biyouyumlu
33 matriksler, puramatriks, alginat, fibrin veya bunların bir kombinasyonundan oluşabilir. Matriks
34 (3) çeşidine göre gerekirse yüklemenden sonra polimerleşmesi için gerekli ortam sağlanır.

1 Örneğin matrijel soğuk halde orta kanala (2) yüklenir sonra mikroakışkan aygıt (1) 37 C de
2 tutularak matrijelin polimerleşmesi sağlanır. Puramatriks ise tuzlu çözeltide hızla polimerleşir,
3 bu yüzden tuzlu çözeltiliye eklendiği anda orta kanala (2) yüklendiğinde polimerleşmesi
4 tamamlanabilir.

5

6 Etken (5), hücreler, hücreli veya hücretsiz matriks, polimer, kültür ortamı, fizyolojik tampon
7 çözeltisi, hücrelerin koşullandırdığı kültür ortamı, bir veya daha çok biyolojik veya kimyasal
8 molekül veya bunların bir kombinasyonu olabilir. Kontrol kanalındaki hücreler (7) ile etken (5)
9 olarak kullanılan hücreler aynı veya farklı olabilir.

10

11 Hücreler (7) hücre hatları, primer kültür hücreleri, biyopsi hücreleri, kök hücreleri veya
12 bunların bir kombinasyonu olabilirler. Örneğin kanserli veya normal hücre hatları kullanılabilir,
13 hastalardan alınan tümör biyopsileri kullanılabilir.

14

15 Hücreler (7) orta kanal (2) ve kontrol kanalı (6) arayüzüne yerleştikten sonra mikroakışkan
16 aygıt (1) uygun kültür koşullarında dik tutulmaya devam edilebilir veya yatay olarak da
17 tutulabilir.

18

19 Örnek bir uygulamada, orta kanala (2) matrijel yüklenir. Matrijel polimerleştikten sonra, hücre
20 göçü ve işgalini arttırdığı tahmin edilen bir etken (5), örneğin bir büyüme faktörü, test kanalına
21 (4) eklenir. Ardından hücreler (7) örneğin kanser hücreleri, kontrol kanalına (6) eklenir.
22 Mikroakışkan aygıt (1) dik ve kontrol kanalı (6) yukarıda kalacak şekilde kültür ortamında
23 tutularak, kanserli hücrelerin kontrol kanalı (6) ve orta kanal (2) arayüzüne çökmeleri ve
24 kültürlenmeleri sağlanır. Zaman içinde sürekli veya aralıklı olarak kanser hücrelerinin orta
25 kanalda (2) göçleri ve işgalleri incelenebilir. Eğer büyüme faktörü beklenildiği gibi etkili ise,
26 büyüme faktörü olmadanki koşula göre hücreler daha çok göç ve işgal göstereceklerdir.

27

28 Hücre göçü ve işgali mikroskopi veya spektroskopi ile incelenebilir.

29

30 Hücreler (7) floresan sinyal verecek şekilde genetik olarak değiştirilebilir veya kimyasal
31 boyalarla boyanabilir. Hücreler floresan sinyal vermedikleri durumlarda standart ışık
32 mikroskobu teknikleri ile de incelenebilir.

33

1 Hücre göçü ve işgali orta kanala geçen hücreler (7) sayılarak, hücrelerin (7) orta kanalda (2)
2 ilerledikleri mesafeler bir veya daha çok zaman noktasında ölçülerek, hücrelerin (7) orta
3 kanaldaki (2) şekilleri, hızları, yönlenme kararlılıkları ölçülerek belirlenebilir.

4
5 Orta kanala (2) hücrelerce parçalandığı zaman floresan sinyalinde artma veya azalma gösteren
6 bir matriks (3) yüklenebilir. Böylece hücrelerin (7) matriksi (3) parçalamaları incelenebilir.

7
8 Orta kanala (2) geçen hücreler (7) mikroakışkan aygıt (1) tan çıkarılarak polimeraz zincir
9 reaksiyonu, ELISA gibi aygıt dışı incelemeler için de kullanılabilir. Orta kanala (2) geçen
10 hücreler (7) içinde buldukları matriks (5) ile birlikte veya ayrı olarak sabitlenip kesitleri
11 alınarak, elektron mikroskobu, histolojik boyama gibi aygıt dışı incelemeler için de
12 kullanılabilir.

13
14 Bu yöntem için kullanılan mikroakışkan aygıt (1), cam, polidimetilsiloksan (PDMS), polistiren
15 (PS), polimetilmetakrilat (PMMA), saykik olefin kopolimer (COC) veya bunların bir
16 kombinasyonundan oluşabilir. Mikroakışkan aygıtın (1) üretimi için kullanılacak kalıplar, UV
17 litografi, üç boyutlu baskılama, metal döküm veya bunların bir kombinasyonundan oluşan
18 yöntem ile yapılabilir.

19
20 Hücre göçü ve işgalini belirleme yöntemi için kullanılan mikroakışkan aygıtta (1) orta kanal (2),
21 test kanalı (4) ve kontrol kanalı (6) arasındadır. Kanallar (2, 4, 6) birbirlerinden birden fazla
22 sütun (8) ile ayrılırlar. Böylece hücreler (7) ve örneğin difüzyon ile yer değiştirebilen diğer
23 etkenler (5) kanallar (2, 4, 6) arası geçiş yapabilir.

24 Kanallar (2, 4, 6) 50 mikrometre ile 1 santimetre arasında bir yükseklikte ve genişlikte
25 olabilirler. Kanallar (2, 4, 6) 500 mikrometre ile 20 santimetre arasında bir uzunlukta olabilirler.
26 Sütunların (8) yatay kesitleri üçgen, yamuk, daire, elips gibi farklı şekillerde olabilirler.
27 Sütunların (8) yatay en uzun eksenini 50 mikrometre ile 1 santimetre arasında bir uzunlukta
28 olabilir.

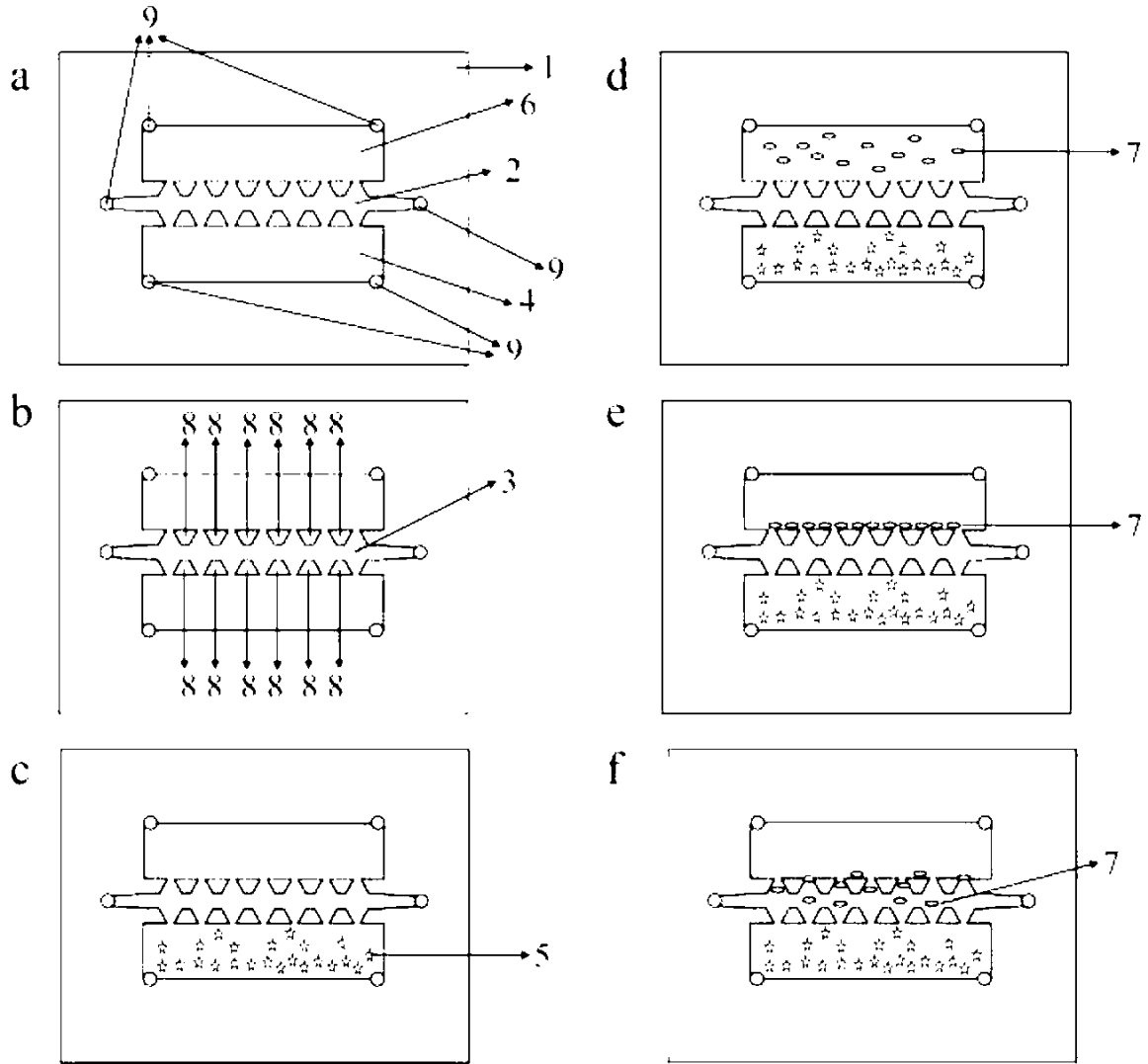
29 Kanallara (2, 4, 6) yükleme yapılabilmesi için her birinde en az bir delik (9) vardır.

30

31 Buluşun sanayiye uygulama biçimi

32 Buluş, ilaç sektöründe hücre göçü ve işgalini etkileyebilecek etkenlerin belirlenmesi için
33 kullanılabilir.

34



Şekil 1