

**Halkalı Neodmiyum Mıknatısla Hücresel Manyetik
Levitasyon Tekniği Geliştirilmesi ve Uygulaması**

Program Kodu: 1002

Proje No: 119M755

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Engin ÖZÇİVİCİ

ARALIK 2020

İZMİR



ÖNSÖZ

Bu projede manyetik levitasyon yöntemi ile oluşturulan ağırlıksız ortam hücre kültürü çalışmalarının temel sorunlarından bir tanesi olan mikrokapiler kullanımının alternatifleri araştırılmıştır. Manyetik levitasyon tekniğinin yarattığı ağırlıksız ortamda hücre tasnifi ve hücre kültürünün kısıtlı hacim imkanından ve hücrelere dışarıdan ulaşarak manipüle etme gibi imkanlara sahip olmadığı için bu proje özelinde yeni bir manyetik platform dizayn edilmiştir. Bu dizayn ile manyetik levitasyon sistemi yüksek ve ulaşılabilir hacimlerle çalışan bir biyofabrikasyon platformuna dönüştürülmüştür. Proje özelinde farklı hücre tipleri ile biyofabrikasyon ve oluşturulan hücresel yapıların manipülasyonu çalışmıştır. Sonuçlar platformun hücresel yapıların oluşturulmasında oldukça başarılı olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu proje TÜBİTAK Mühendislik Araştırma Destek Grubu (MAG) tarafından desteklenmiş ve Doç. Dr. Engin Özçivici yürütücülüğünde tamamlanmıştır. Proje desteği ve bulguları, projede çalışan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik programına kayıtlı Ar. Gör. Müge Anıl-İnevi'nin doktora tezi muhteviyatını oluşturarak bu öğrencilerin akademik ilerlemelerine katkıda bulunmuştur.

Proje çalışmaları esnasında kullanılan teknikler, analizler ve karşılaşılan problemler konusunda bizlere yardımcı olan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. H. Cumhur Tekin ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Gülistan Meşe Özçivici'ye teşekkürlerimizi sunarız. Ayrıca, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezi (BIYOMER) personeline bazı deneylerde verdikleri teknik destekten dolayı teşekkür ederiz.

Proje rapora hazırlandığı sırada, proje desteği ve çıktılarından 1 adet uluslararası makale taslağı hazırlanmış, ayrıca bulgular üzerinden yeni bir proje önerisinin ön çalışmaları tamamlanmıştır.

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. LİTERATÜR ÖZETİ	1
1.1 Hücrelerin uzaktan manipülasyonu	1
1.2 Hücrelerin manyetik manipülasyonu.....	1
1.3 Hücrelerin manyetik etiket olmadan levitasyonu.....	1
1.4 Makro boyutta manyetik levitasyon uygulamaları	3
2. GEREÇ VE YÖNTEM	5
2.1 Manyetik Prensipler	5
2.2 Polimerik parçacıkların manyetik levitasyonu	7
2.3 Hücre kültürü	7
2.4 Hücrelere manyetik levitasyon uygulanması	7
2.5 Hücre biyolojisi ve sağlığı deneyleri	8
2.6 Besi ortamını özelliklerinin ve manyetik alan dağılımının değiştirilmesi ile levitasyon kültürü.....	9
2.7 3 boyutlu hücresel yapıların jel matris içine gömülmesi	9
2.8 Moleküler ifadelerin RT-PCR ile belirlenmesi	9
2.9 İstatistikler.....	10
3. BULGULAR	11
3.1 Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon ile 3 boyutlu biyolojik yapıların oluşturulması	11



3.2 Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon ile 3 boyutlu kültürde kütle manipülasyonu	16
3.3 Uzun vadeli levitasyon kültürü.....	17
3.4 Farklı özkütlelere sahip hücre tiplerinin manyetik levitasyon kültürü	21
3.5 Manyetik levitasyon ile oluşturulmuş 3 boyutlu yapıların jel-içi kültürü	26
3.6 Manyetik levitasyon kültürlerinden mRNA eldesi	28
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	29
5. KAYNAKLAR.....	32



ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. *Farklı konsantrasyonlarda (5000 ve 50000 hücre/kapiler kanal) manyetik levitasyon (100 mM Gd³⁺) kültürü gerçekleştirilen D1 ORL UVA hücrelerinin 24 ve 48 saat sonra oluşturdukları 3 boyutlu yapılar ve bu yapıların uzunluk ve kalınlık değerlerini gösteren grafikler. Ölçek çizgisi: 500 µm (Anil-Inevi M vd., 2018)..... 3*
- Şekil 2. *Tek bir delikli silindirik mıknatısın (Neodmiyum, 50.8 × 50.8 × 25.4 mm) oluşturduğu manyetik gradyen (Ge ve Whitesides, 2018). 4*
- Şekil 3. *Paramanyetik ortam içerisinde küresel bir parçacığın üzerine etkiyen kuvvetler. (Mavi: düşük manyetik alan, kırmızı: yüksek manyetik alan) 5*
- Şekil 4. *Halka tip tek N52 mıknatıs üzerine yerleştirilen hücrelerin levitasyonu. İlk ekimde hücreler tüp içinde dağınık yapı sergilerken (sol panel), zaman geçtikçe hücreler diyamanyetik özelliklerinden dolayı halka deliğinin tam ortasında bulunan yerel manyetik dip noktasının üzerinde toplanmaktadır (sağ panel). (Ge ve Whitesides, 2018 makalesinden uyarlanmıştır). 8*
- Şekil 5. *Manyetik kuvvet tabanlı levitasyon ve 3 boyutlu biyolojik yapı oluşumu. (A) Manyetik levitasyon sistemi. Hücre kültürü haznesi, halkalı mıknatısın deliği üzerinde konumlandırılmıştır. (B) Hücresel kümelenmenin şematik gösterimi. Şemadaki blok oklar yukarı doğru manyetik indüksiyonu temsil etmektedir.11*
- Şekil 6. *Paramanyetik kültür ortamında (0, 100 ve 200 mM Gd³⁺) süspanse edilmiş 1.02 ve 1.09 g/mL yoğunluğa sahip polimerik parçacıkların halkalı mıknatıs deliği üzerindeki davranışını gösteren mikrograflar. Sarı dikdörtgenler parçacıkların denge konumunda biriktiği bölgeyi göstermektedir. İlk mikrograflar işlemin başlangıcında ve ikinci mikrograflar ise parçacıklar denge konumuna ulaştığında (7 dakika içinde) kaydedildi. Ölçek çubuğu: 200 µm.12*
- Şekil 7. *D1 ORL UVA hücrelerinin halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon sisteminde 3 boyutlu yapı oluşturması. (A) Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon (0, 50, 100 ve 200 mM Gd³⁺, 10⁶ hücre/mL, 100 µL) ile 2 saat ya da 24 saat kültürlenen D1 ORL UVA hücrelerinin mikrografları. Ölçek çubuğu: 1 mm. (B) Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca oluşturulan hücresel kümelerin boyutu (100 ve 200 mM Gd³⁺, 10⁶ hücre/mL, 100 µL); yatay çap, dikey çap, alan ve çevre. Veriler, hata çubuklarıyla (± SD) tekrarların ortalaması olarak çizilmiştir.13*
- Şekil 8. *Farklı yoğunluklarda kültür ortamlarında (1 (ficoll ilavesi olmadan), 1.02 ve 1.04 g/mL) halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon (0 ve 100 Gd³⁺) ile 24 saat kültürlenen D1 ORL UVA hücrelerinin mikrografları. Ölçek çubuğu: 1 mm.....14*

Şekil 9. Artan Gd^{3+} konsantrasyonlarında (0, 200, 350 ve 500 mM) halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon ile 5 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin mikrografları. Ölçek çubuğu: 1 mm.....15

Şekil 10. Tek bir halkalı mıknatıstan oluşan veya üst üste yapıştırılmış 2 halkalı mıknatıstan oluşan manyetik levitasyon platformlarında (0, 150, 200 mM Gd^{3+}) 2, 24 ve 48 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin mikrografları ve boyutları. Ölçek çubuğu: 1 mm. Veriler, hata çubuklarıyla (\pm SD) tekrarların ortalaması olarak çizilmiştir.....15

Şekil 11. Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon ile 3 boyutlu kültürde kütle manipülasyonu. (A) Manyetik levitasyon sisteminde kendiliğinden birleşmiş D1 ORL UVA kümesinin (200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 100 μ L) (A) dikey düzlemde ve (B) yatay düzlemde odaklanma bölgesi. Denge konumundaki hücre kümesi (i) kültür haznesi ile birlikte yukarı doğru hareket ettirildiğinde (ii) küme denge konumuna geri çökmüştür (iii). Hücre kümesi kültür haznesi ile birlikte aşağı doğru hareket ettirildiğinde ise (iv) küme denge konumuna geri yükselmiştir (v). Şekil A'da kırmızı kesikli çizgilerin arası hücre kümesinin dengelenme eğiliminde olduğu bölgeyi belirtmektedir. Şekil B'de kırmızı kesikli çizgi hücre kümesinin yatay düzlemde odaklandığı bölgenin sınırını göstermektedir. Sarı oklar hücre kümesinin kültür haznesi ile birlikte dışsal bir kuvvet ile hareket ettirildiği yönü göstermekte ve kırmızı oklar hücre kümesinin doğal olarak hareket ettiği yönü göstermektedir. (C) Manyetik levitasyon sisteminde (200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 200 μ L) oluşmuş ve denge pozisyonunda kültürü devam eden 3 boyutlu hücre kümesinin (i) kullandığı eski besiyerinin uzaklaştırılması (ii) ve taze besiyerinin eklenmesi (iii). (D) Manyetik kaldırma sisteminde oluşmuş ve denge pozisyonunda kültürü devam eden bir 3B hücre kümesinin (i) bir pipet yardımıyla yavaşça çekilerek hasat edilmesi (ii, iii). (D) Manyetik levitasyon sisteminde oluşan 3B hücre kümesinin bir pipetle başka bir manyetik levitasyon cihazına levitasyonu devam edecek şekilde aktarılması. Ölçek çubukları: 1 mm.....17

Şekil 12. Halkalı mıknatıs tabanlı levitasyon ile oluşturulan kümelerin sağlığı ve birlikte-levitasyon kültürü. (A) Manyetik levitasyon (200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 200 μ L) ile oluşturulan, bu şartlar altında 48 saat süreyle kültürlenmiş ve daha sonra standart kültür kabına aktarılarak burada 24 saat kültürlenmiş bir D1 ORL UVA 3 boyutlu hücre kümesinin mikrografı. Manyetik levitasyonla oluşturulan D1 ORL UVA 3 boyutlu yapılarının (B) ve 3 boyutlu yapılardan ayrıştırılan tek hücrelerin (C) floresan mikroskopi görüntüleri. (canlı: yeşil, ölü: kırmızı). Hücre canlılığı, canlı ölü boyama (Calcein / PI) ile görselleştirilmiştir. Ölçek çubuğu: 200 μ m. (D) Ayrı ayrı manyetik levitasyon tekniği ile oluşturulmuş hücre kümelerinin birlikte-levitasyon kültürünün şematik temsili. (E) Manyetik levitasyon sisteminde oluşturulan ve bu şartlar altında 48 saat süreyle kültürlenmiş D1 ORL UVA hücre kümesinin birlikte-levitasyon kültürü için

levitasyon sistemindeki 200 mM Gd^{3+} içeren bir ortama tek tek aktarımı. Manyetik levitasyon sisteminde ayrı ayrı oluşturulmuş (F) iki ve (G) dört D1 ORL UVA hücresele kümesinin 24 saat boyunca 200 mM Gd^{3+} içeren ortamda birlikte-levitasyon kültürü. Ölçek çubukları: Kültür odası görüntüleri için 1 mm, Şekil F ve G için orta ve sağ görüntülerde sırasıyla 200 ve 100 μm . (H) 24 saat boyunca 200 mM Gd^{3+} içeren bir ortamda birlikte levite edilen kürelerin alanca füzyon oranı (%). Veriler, hata çubuklarıyla (\pm SD) tekrarların ortalaması olarak çizilmiştir ve Student's t-test kullanılarak değerlendirilmiştir.....19

Şekil 13. 48 saat boyunca manyetik levitasyon (200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 200 μL) ile kültürlenen ve daha sonra standart kültür kabına aktararak burada 24 saat daha kültürü sürdürülen bir D1 ORL UVA 3 boyutlu yapısının mikrografı. Ölçek çubukları: sırasıyla 100 ve 50 μm20

Şekil 14. 200 mM Gd^{3+} içeren ortamda iki (sol) ve dört (sağ) D1 ORL UVA hücresele kümesinin 24 saatlik birlikte-levitasyon kültürü sonucunda oluşturulan 3 boyutlu yapılarda hücresele kümeler arası temas bölgelerinin yakınlaştırılmış görünümü. Ölçek çubuğu: 50 μm20

Şekil 15. Şekil 12 (H)'de sunulan (A) iki ve (B) dört hücresele kümenin birlikte-levitasyon kültürü sonucunda alanca füzyon oranlarının (%) hesaplanması için görüntü işleme programında elde edilen görüntüler.....20

Şekil 16. Adipojenenez tetikleyen ajanlar içeren ortamda 7 gün boyunca kültürlenen 7F2 hücrelerinin mikrografları. Ölçek çubuğu: 50 μm21

Şekil 17. Farklı hücre tiplerinin levitasyon tabanlı 3 boyutlu kültürü. (A) Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon (0, 100, 150 ve 200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 200 μL) ile 2 veya 24 saat kültürlenen adipositlerin mikrografları. Adipositler levitasyon öncesi 7F2 hücrelerinin adipojenenezin tetiklenmesi ile elde edilmiştir. Dikey ölçekte her birim: 1 mm. Ölçek çubuğu: 1 mm. (B) Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca kültürlenmiş adiposit kümelerinin boyutu (yatay çap, dikey çap, alan ve çevre). (C) Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca kültürlenmiş adiposit kümelerinin floresan mikroskopi görüntüleri. Hücre canlılığı canlı boyama (Calcein-AM) ile görüntülenmiştir. Ölçek çubuğu: 200 μm . (D) Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon (0, 150 ve 200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 200 μL) ile 2 veya 24 saat boyunca kültürlenmiş MDA-MB-231 hücrelerinin mikrografları. Ölçek çubuğu: 1 mm. (E) Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca kültürlenmiş MDA-MB-231 hücresele kümelerinin boyutu (yatay çap, dikey çap, alan ve çevre). Veriler, hata çubuklarıyla (\pm SD) tekrarların ortalaması olarak çizilmiş ve istatistiksel anlamlılık Student's t-testi (two tail) ile belirlenmiştir. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$23

Şekil 18. Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon (100, 150 ve 200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 200 μ L) ile 24 saat kültürlenmiş ardından standart kültür kabına aktarılar burada da 24 saat kültürü sürdürülmüş adipositlerin mikrografları. Görüntülerdeki 3B yapıların sınırları sarı çizgilerle ile kabaca çizilmiştir. Oklar, kültür yüzeyine yayılmış lipit içeren hücre örneklerini göstermektedir. Ölçek çubukları: üst fotoğraflar için 100 μ m ve alt fotoğraflar için 50 μ m.24

Şekil 19. Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca kültürlenmiş adiposit kümelerinin ve 3 boyutlu yapılardan ayrıştırılan tekil hücrelerin floresan mikroskopi görüntüleri. Hücre canlılığı canlı boyama (Calcein-AM) ile görüntülenmiştir. Ölçek çubukları: Soldaki fotoğraflar için 100 μ m ve sağdaki fotoğraflar için 200 μ m.25

Şekil 20. Manyetik levitasyon sisteminde 100, 150 ve 200 mM Gd^{3+} konsantrasyonlarında 24 saatlik kültür sonucunda ayrı ayrı oluşturulan ikişer 3 boyutlu adiposit kümesinin yine aynı Gd^{3+} içeriğindeki besi ortamlarında birlikte-levitasyon kültürü. Dikey ölçekte her birim: 1 mm. Ölçek çubukları: Kültür odası görüntüleri için 1 mm, mikroskop görüntüleri için 200 μ m.26

Şekil 21. Manyetik levitasyon kültüründe oluşturulmuş D1 ORL UVA 3 boyutlu yapılarının jel içi kültürü. (A) Manyetik levitasyon ile oluşmuş bir 3 boyutlu hücresel yapının Matrigel içerisine gömülmesi. (B) Kültürün 3. saatinde Matrigel'de hücresel küme. (C) Mikro kaşık şeklinde kesilmiş bir pipet ucu kullanılarak jele gömülü 3 boyutlu kümenin hasat edilmesi. (D-E) Standart bir kültür kabına aktarılmış Matrigel'e gömülü bir 3 boyutlu küme. (D) Kültür idamesi için Matrigel üzerine besi ortamı eklenmeden önceki, (E) eklendikten sonraki görüntü. Dikey ölçekte her birim: 1 mm. Ölçek çubuğu: 1 mm. (F) Matrigel'e gömülü 3 boyutlu kümenin 1 ve 4 günlük kültürden sonra mikrografları. Ölçek çubuğu: 200 μ m.27

Şekil 22. Matrigel'e gömülü 3 boyutlu D1 ORL UVA kümesinin (A) 1 ve 4 günlük kültürden sonra görüntüsü ve (B) 4 gün sonra Matrigel'de yayılmış hücrelerin görüntüsü. Ölçek çubukları: (A) için 100 μ m ve (B) için 50 μ m.27



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. RT-PCR'da kullanılan primer listesi	10
Tablo 2. qRT-PCR protokolü	10
Tablo 3. Manyetik levitasyon (200 mM Gd ³⁺) ile standart büyüme ortamında ya da osteojenik farklılaştırma ortamında 48 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin (ekim sayısı: 200,000 hücre/kültür kabı) RT-PCR sonuçları.	28

Manyetik levitasyon hücresel ve doku düzeyinde biyomühendislik uygulamalarında hücrelerin uzaktan manipülasyonu için önemli bir teknolojidir. Mevcut diamanyetik levitasyon tasarımlarının çoğu, sistemin çalışma hacmini ve uygulanabilirliğini sınırlayan aynı kutupları birbirine dönük iki blok mıknatıs arasında bir levitasyon haznesi içermektedir. Bu projede, biyofabrikasyon uygulamalarında kullanılmak üzere bu fiziksel sınırlamaları ortadan kaldırmak için halkalı mıknatıs tabanlı bir manyetik levitasyon sistemi oluşturulmuştur. Projede tanımlanan bu konfigürasyon, levitasyon sırasında besi ortamı veya hücrelerin sisteme transfer edilebilmesini ve sistemden uzaklaştırılabilmesini, yüksekliğinden bağımsız olarak kültür haznesi kullanılabilmesini ve böylelikle büyük boyutlu canlı yapıların üretilmesini ve kültürün sürdürülebilmesini mümkün kılmıştır. Biyofabrikasyon çalışmalarından önce, sistemin canlı hücrelerin levitasyonu için özkütleri açısından uygunluğu polimerik parçacıklar ile gösterilmiştir. Sistemin manyetik odaklama fonksiyonu ve hücrelerin kendi kendine bir araya gelme özelliğinden yararlanarak düzende milimetre boyutunda 3 boyutlu canlı yapılar oluşturulmuş ve kültürleri cihaz içerisinde sürdürülmüştür. Burada uygulamaya sunulan manyetik levitasyon cihazı, açık bir operasyon alanı sağlaması sebebiyle kültüre levitasyon esnasında ve kolay müdahale olanağı sunmuştur. Proje kapsamında besi ortamındaki paramanyetik iyon konsantrasyonunu değiştirerek farklı özkütlelere sahip hücre tiplerinin (kök hücre, adiposit ve kanser hücresi) levitasyonu ve 3 boyutlu yapı oluşumu için manyetik levitasyon protokolleri oluşturulmuştur. Hücrelerin levitasyonu için gereken paramanyetik iyon konsantrasyonunun ise besi ortamın özkütlesinin artırılması ile azaltılabileceği gösterilmiştir. Hücre sağlığı açısından zararsız olduğu proje çalışmasında gösterilmiş olan bu teknik, ayrı ayrı oluşturulmuş 3 boyutlu canlı birimlerinin daha karmaşık yapılar üretmek üzere birleşmesine de olanak sağlamıştır. Ayrıca proje çıktılarında, halkalı mıknatıs tabanlı levitasyon sisteminin hücrelerden çalışılabilir mRNA izolasyonu sağlayabildiği ve gen ifadesi düzeyinde çalışmalar için uygun olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, projede oluşturulan manyetik levitasyon sistemi doku mühendisliği, ilaç testi ve kanser araştırmaları gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanım alanı bulabilecektir.

Anahtar kelimeler: Biyofabrikasyon, Manyetik Levitasyon, Canlı hücreler, Hücresel sferoidler, Gadolinium



ABSTRACT

Magnetic levitation is an emerging technology for remote manipulation of cells in cellular and tissue level bioengineering applications. Most of the extant diamagnetic levitation configurations use two magnets with same poles facing each other that limit working volume and applicability. This project proposes a single ring magnet-based magnetic levitation system to eliminate physical limitations for biofabrication applications. This configuration makes it convenient to add and remove medium or cells during the levitation, to place a culture chamber regardless of its height and thus to manufacture and maintain sizable living constructs. Prior to biofabrication, suitability of the system for levitation of objects with the density range of living cells was demonstrated with polymeric beads. In the system, magnetic focusing and cellular self-assembly allowed formation and maintenance of millimeter-sized 3-dimensional living structures. The magnetic levitation device proposed here enabled easy and on-site intervention in levitation culture with an open operational space. The levitation protocol was adapted for levitation and self-assembly of various cell types (i.e., stem cell, adipocyte and cancer cell) representing cells of different densities by changing paramagnetic ion concentration in the suspending medium. It was shown that increasing the density of the medium reduced paramagnetic ion concentration required for levitation of cells. This technique, which we showed to be harmless in terms of cell viability, additionally allowed the merging of separately formed 3-dimensional living units. Furthermore, it has been shown that the ring magnet-based levitation system is suitable for studies at gene expression level by providing enough mRNA from levitation culture. In conclusion, the system offers wide range applications including bottom-up tissue engineering, drug testing and cancer research.

Key words: Biofabrication, Magnetic levitation, Living cells, Cellular spheroids, Gadolinium

1. LİTERATÜR ÖZETİ

1.1 Hücrelerin uzaktan manipülasyonu

Canlı (Lee vd., 2017) ve cansız (Gauthier vd., 2013) materyallerin uzaktan (contact-free) manipülasyonu, mikro yapıların konumlandırma ve üretimi için ciddi öneme sahip bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımın biyomedikal alandaki uygulamaları, hücrelerin akışta yönlendirilerek ayırıştırma / saflaştırılmalarına (Gossett vd., 2010); hücrelerden doku / organoid üretimine (Guo vd., 2016); hücre – biyomalzeme arayüzlerinin oluşturulmasına (Shimizu vd., 2007) ve hücrelerin istenilen konumda hapsedilerek farklı özellikler için ölçümüne (Huang vd., 2008) olanak sağlar. Uzaktan hücre manipülasyonu elektriksel (Čemažar vd., 2016), akustik (Lenshof vd., 2017), optik (Eriksson vd., 2007) ve manyetik (Yaman vd., 2018) yöntemlerle sağlanabilir. Bu yöntemlerin içerisinde manyetik yöntemler, görece düşük maliyetli, kolay dizayn ve entegre edilebilir ve ayrı bir enerji kaynağına ihtiyaç duymayan bileşenleri ile hücresel biyomühendislik uygulamalarında önemli bir avantaj sağlar.

1.2 Hücrelerin manyetik manipülasyonu

Hücrelerin manyetik manipülasyonu ile ayırma, saflaştırma (Fachin vd., 2017), ölçme (Jing vd., 2008) ve doku mühendisliği uygulamaları (Souza vd., 2010) yapmak mümkündür. Fakat bu manipülasyonların yöntemlerinin önemli bir kısmı normalde diyamanyetik özellik gösteren hücrelerin manyetik alandan etkilenebilmesi için hücrelerin manyetik nano/mikro parçacıklar ile işaretlenmesi ve bu sayede istenen manipülasyonların gerçekleştirilmesi prensibine dayanmaktadır. Alternatif olarak hücrelerin manyetik etiketsiz (label-free) manipülasyonu da mümkündür. Hücrelerin buldukları ortamın manyetik duygunluk (magnetic susceptibility) değerinin artırılması aracılığı ile hücreler güçlü manyetik alan oluşturan konumlardan diyamanyetik özellikleri yüzünden kaçma eğilimi gösterirler (Rodríguez-Villarreal vd., 2011). Bu prensip kullanılarak hücrelerin iki kuvvetli mıknatıs düzeneği arasında levitasyonları sağlanabilir (Tasoglu vd., 2015a). Manyetik levitasyon prensibi ile hücreler özkütlelerine göre ayırıştırılabilirler (Durmus vd., 2015, ve grubumuzda Sarıgil vd., 2019), biyobasılabilirler (Mishriki vd., 2019) ya da ağırlıksız ortamda gruplanıp kültürlenebilirler (grubumuzdan Anil-Inevi vd., 2018).

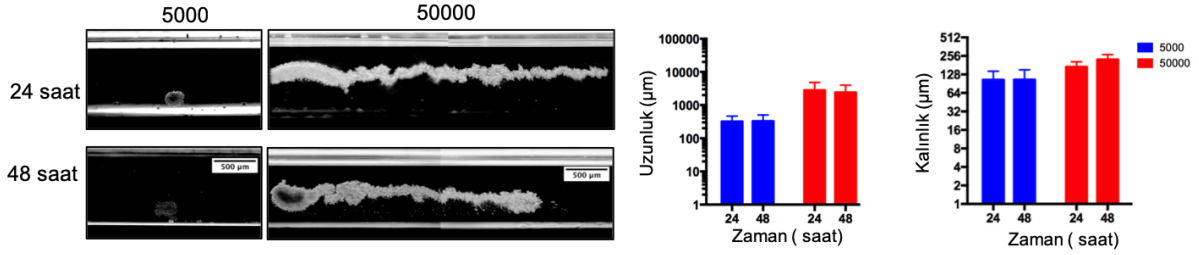
1.3 Hücrelerin manyetik etiket olmadan levitasyonu

Hücrelerin manyetik etiket olmadan levitasyonu için iki önemli bileşen gerekmektedir. Bu bileşenler aynı kutupları birbirine dönük olacak şekilde yerleştirilmiş iki mıknatıs (ferromagnet, örneğin neodmiyum) ve besi ortamının manyetik duygunluğunu yükselterek paramanyetik hale

getiren ajanlar (örneğin Gadolinyum(III) (Gd^{3+}) iyonu) olarak gruplanabilir. Grubumuz tarafından da kullanılan manyetik levitasyon uygulamalarında hücreler, iki mıknatıs arasında oluşan manyetik alan gradyeninin tam ortada oluşan minimum noktasına doğru sürüklenir ve orada kendi ağırlıklarını dengeleyen bir konuma (örneğin düşük yoğunluklu hücreler daha yüksekte; daha yoğun hücreler daha alçakta) yerleşirler. Levitasyon konumunda geçen zaman içerisinde hücreler birbirleri ile etkileşerek tutunurlar ve çok hücreli yapılar oluştururlar. Paramanyetik besi ortamının uzun süreli hücre kültürü için hücre sağlığı açısından uygun olduğu ve levitasyon sistemi içerisinde farklı desenlerde hücresel yapıların biyofabrikasyonunun hem dışarıda oluşturulan hücre kümeleriyle (Tocchio vd., 2018) hem de laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda tekil hücrelerin manyetik odak alanında birleştirilmesiyle (Anil-Inevi vd., 2018) yapılabileceği gösterilmiştir. Bu sayede doku mühendisliğinde önemli bir uygulama alanı olan doku iskelesinden bağımsız (scaffold-free) yaklaşımla farklı biyolojik yapılar oluşturulabilir. Klasik doku mühendisliği uygulamalarında hücre dışı yapıyı modellemek ve hücreleri bir arada tutmak için kullanılan doğal (Singh vd., 2016) ya da sentetik polimerler (Place vd., 2009) yerine, bu yaklaşım hücreleri uzaktan manyetik alanla bir arada tutarak zaman içerisinde kendi doku iskelelerini oluşturmalarına izin vermektedir. Ayrıca doku iskelesi kullanımı gerektirmeyen bu teknik, hücre fenotip ve davranışına etki eden sertlik, pürüzlülük ya da kimyasal kompozisyon gibi kontrolü zor malzeme kaynaklı değişkenleri ortadan kaldırmaktadır. Manyetik levitasyon teknolojisi bu anlamda doku mühendisliği uygulamaları için ciddi bir potansiyel barındırmaktadır.

Her ne kadar prensip olarak manyetik levitasyon teknolojisi ile biyolojik yapıların elde edilmesi mümkün olsa bile, bu teknolojinin şu anda bulunduğu seviye uygulama için önemli kısıtlar barındırmaktadır. Hücresel levitasyon şu anki uygulamalarda hacmi $50 \mu l$ 'yi geçmeyen mikroakışkan kapiler kanallarda gerçekleşmektedir. Bu yüzden oluşturulan biyolojik yapılar hacme uygun olarak kısıtlı sayıda hücre (<100000 /kapiler) ile gerçekleştirilebilmekte, bu durum da oluşturulan biyolojik yapıların boyutlarını sınırlamaktadır. Ek olarak düzenekte oluşan biyolojik yapılar manyetik alan gradyeninin minimum değeri taşıdığı noktalarda bulunmak istediği için bu yapılar hücre sayısı arttığında uzama eğilimi göstermekte, fakat mıknatıslara yaklaşmamak için kolaylıkla kalınlaşmamaktadırlar (**Şekil 1**). Bu yüzden oluşan yapılar simetrik olamamaktadır. Ayrıca hücreler 1 mm'den az kalınlığa sahip bir kapilerde buldukları için bu yapıların aktarımı ve manipülasyonları sırasında önemli güçlükler yaşanmaktadır. Son olarak mikroakışkan sistemde kapilerin hacmi içerisinde bulunan hücre besiyerinin biyolojik yapı bozulmadan değiştirilmesi mümkün olmamaktadır, bu yüzden mikroakışkan sistem içerisinde uzun süreli kültür gerçekleşmemektedir. Manyetik levitasyon yaklaşımının doku

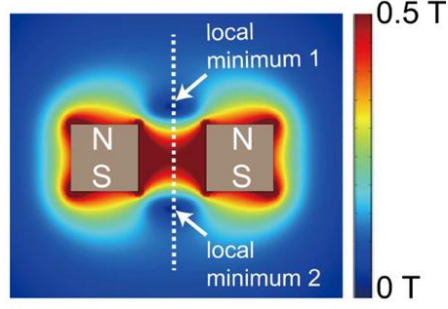
mühendisliği uygulamalarının yaygınlaşabilmesi için, çalışılabilir ortam hacmi ve boyut manipülasyonu üzerindeki kısıtların aşılması gerekmektedir.



Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda (5000 ve 50000 hücre/kapiler kanal) manyetik levitasyon (100 mM Gd^{3+}) kültürü gerçekleştirilen D1 ORL UVA hücrelerinin 24 ve 48 saat sonra oluşturdukları 3 boyutlu yapılar ve bu yapıların uzunluk ve kalınlık değerlerini gösteren grafikler. Ölçek çizgisi: 500 µm (Anil-Inevi M vd., 2018)

1.4 Makro boyutta manyetik levitasyon uygulamaları

Manyetik levitasyon uygulamalarının iki prizmatik mıknatıs arasında ortamın duygunluk değerinin değiştirilerek gerçekleştirildiği hem mikro, hem de makro boyutta oldukça fazla uygulama bulunmaktadır. Fakat makro uygulamalar istisnasız bir şekilde cansız malzemelerin levitasyonu için kullanılabilmektedir (Mirica vd., 2010; 2011; Zhang vd., 2018). Bu durumun en temel sebebi, makro boyutta levitasyon için biyoyumluluğu yüksek Gd^{3+} iyonlarının yetersiz kalması ve levitasyon sağlamak için yeterli duygunluk seviyelerine biyoyumlu olmayan $MnCl_2$ (ve diğerleri) ile ulaşılabilmektedir. Yakın zamanda manyetik levitasyon uygulamasının sadece iki prizmatik mıknatıs arasında değil, aynı zamanda tek başına duran delikli silindirik (halka) bir mıknatısta da gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir (Ge ve Whitesides, 2018). Silindirik mıknatıs, kutuplarının etkileşimleri sebebiyle mıknatısın delik noktası üzerinde bir minimuma sahip manyetik gradyan yaratabilme özelliğine sahiptir (**Şekil 2**). Mıknatıs ortasında oluşan minimum manyetik alan boyutu, mıknatıs boyut parametreleri ile ilgilidir. Bu sayede boyutları santimetre seviyesinde olan mıknatıslarda hücrelerin doku iskelesinden bağımsız olarak konumlanabilecekleri bölgenin boyutları mikroakışkan sistemde elde edilebilene oranla hem daha büyük hem de daha simetrik olabilmektedir. Ek olarak tek mıknatıs kullanımı ile sistemdeki üst sınırın kaldırılması ile görece sınırsız bir besiyeri rezervuarının sisteme entegre edilebilmesinin önünü açmaktadır.



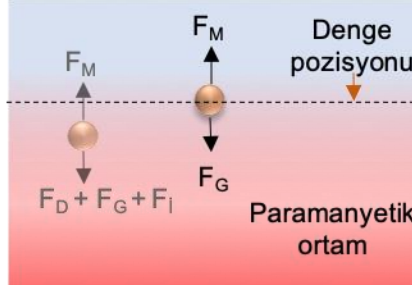
Şekil 2. Tek bir delikli silindirik mıknatısın (Neodmiyum, $50.8 \times 50.8 \times 25.4$ mm) oluşturduğu manyetik gradyen (Ge ve Whitesides, 2018).

Manyetik levitasyon teknolojisi hem hücreler hem de diğer malzemeler için uzaktan manipülasyonu sağlayan güncel bir teknolojidir. Tamamlanan projede, hücrelerin manyetik levitasyon yaklaşımı ile literatürde ilk kez, halka mıknatıs üzerinde, makro boyutta, besiyeri ve biyolojik yapı aktarımına açık ve doku iskelesinden bağımsız biyofabrikasyonu amaçlanmıştır. Projenin başarılması ile doku mühendisliği ve ağırlıksız ortam biyolojisi uygulamaları için önemli bir teknoloji geliştirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Manyetik Prensipler

Sıvı içerisinde bulunan ve manyetik kuvvet etkisindeki bir parçacık (ya da hücre) üzerine sistemde denge pozisyonuna gelene kadar etki eden net kuvvet (F_{Net}); manyetik kuvvet (F_M), sürüklenme kuvveti (F_D) ve kaldırma kuvvetinin (F_G) bileşkesidir (**denklem 1 seti**) (**Şekil 5**).



Şekil 3. Paramanyetik ortam içerisinde küresel bir parçacığın üzerine etkiyen kuvvetler. (Mavi: düşük manyetik alan, kırmızı: yüksek manyetik alan)

Bu sistemde, eylemsizlik kuvveti (inertial force, F_I) mikroakışkanın düşük Reynolds sayısı sebebiyle, Brownian kuvvet (F_B) ise sadece yeterince küçük parçacıkların (yaklaşık olarak ≤ 10 nm) hareketini anlamlı derecede etkilemesi sebebiyle göz ardı edilebilmektedir.

$$\vec{F}_{Net} = \vec{F}_M + \vec{F}_D + \vec{F}_G \quad \text{ise} \quad ma = \vec{F}_M + \vec{F}_D + \vec{F}_G,$$

$$m \frac{d\vec{v}_p}{dt} = \vec{F}_M + \vec{F}_D + \vec{F}_G \quad (1)$$

Bir parçacık üzerine etki eden F_M , B : manyetik akı yoğunluğu (Tesla, T), ∇ : del operatörü, \vec{m} : manyetik dipol değerlerine bağlıdır (**denklem 2**). B mıknatısın yüzeyinden uzaklaştıkça azalmaktadır. Buradan paramanyetik tuz solüsyonunda ya da ferro sıvı içerisinde düşük manyetik alanda üretilen manyetik dipole ulaşılabilir (**denklem 3**).

$$\vec{F}_M = (\vec{m} \cdot \nabla) \vec{B} \quad (2)$$

ve

$$\vec{m} = \frac{V \cdot \Delta\chi}{\mu_0} \vec{B} \quad (3)$$

Bu denklemde; V : parçacığın hacmi, μ_0 : boşluğun geçirgenliği ($1.2566 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{m} \cdot \text{A}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$), $\Delta\chi$: parçacık ile onu çevreleyen ortamın manyetik duygunluk (magnetic susceptibility) farkı ($\chi_p - \chi_m$) olarak düzenlenerek F_M değeri ifade edilebilir (**denklem 4**).

$$\vec{F}_M = \frac{V \cdot (\chi_p - \chi_m)}{\mu_0} (\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B} \quad (4)$$

$(\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B}$ kartezyen koordinat sisteminde genişletilerek:

$$(\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B} = \begin{pmatrix} B_x \frac{\partial B_x}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_x}{\partial y} + B_z \frac{\partial B_x}{\partial z} \\ B_x \frac{\partial B_y}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_y}{\partial y} + B_z \frac{\partial B_y}{\partial z} \\ B_x \frac{\partial B_z}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_z}{\partial y} + B_z \frac{\partial B_z}{\partial z} \end{pmatrix} \quad (5)$$

üç boyutta manyetik akı değerlerine ulaşılabilir. Belirtilen koşullarda küresel bir parçacığın üzerine etki eden bir diğer kuvvet olan sıvı çekme kuvveti (drag force) F_D ; R (parçacığın çapı), η (dinamik viskozite), f_d (sürüklenme katsayısı) ve v_p 'ye (parçacığın hızı) bağlı olarak değişecektir (**denklem 6**).

$$\vec{F}_D = 6\pi R \eta f_d(v_p) \quad (6)$$

Parçacık üzerine etki eden diğer kuvvet F_G ise; V : parçacığın hacmi, $\Delta\rho$: parçacık ile onu çevreleyen ortamın hacimsel yoğunluk farkı ($\rho_p - \rho_m$), g : yerçekimi ivmesine ($9.8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$) bağlı olarak hesaplanabilir (**denklem 7**).

$$\vec{F}_G = V \Delta\rho g \quad (7)$$

Bu durumda, parçacığın denge noktasına ulaşana kadar üzerine etki eden kuvvet düzenlenerek (**denklem 8**) denge noktasına ulaşıldığında parçacığın hızı sıfır olacağı için ($F_D=0$), F_{Net} küresel parçacığın denge haline göre düzenlenebilir (**denklem 9**).

$$\vec{F}_{Net} = \frac{V \cdot (\chi_p - \chi_m)}{\mu_0} (\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B} + 6\pi R \eta f_d(v_p) + V \cdot (\rho_p - \rho_m) g \quad (8) \quad \text{ve} \quad \vec{F}_{Net} = \frac{V \cdot (\chi_p - \chi_m)}{\mu_0} (\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B} + V \cdot (\rho_p - \rho_m) g$$

(9)

Hücreler gibi diyamanyetik olan parçacıklar manyetik alan uygulandığında manyetik alana antiparalel şekilde hizalanmış bir manyetik dipol oluşur ve bu sebeple manyetik alanın minimum olduğu alana doğru bir manyetik kuvvet oluşur. Oluşan bu manyetik dipol ise parçacık ile onu çevreleyen ortamın manyetik duyunluk değerine göre değişmektedir.

Projemizde yukarıda ayrıntılarıyla açıklanan fiziksel olaylardan yararlanılarak halkalı mıknatıs tabanlı platform içerisindeki hücrelerin üzerine yerçekimine ters yönde etki eden manyetik kuvvet, besi ortamının manyetik duyguluk değeri (χ_m) değiştirilerek artırılmış ve hücrelerin makro boyutta levitasyonu sağlanmıştır. Hücreleri çevreleyen besi ortamının manyetik duyguluk değeri, besi ortamına farklı konsantrasyonlarda Gd^{3+} (Gadavist) ilave edilerek elde edilmiştir.

2.2 Polimerik parçacıkların manyetik levitasyonu

1,02 g/mL (boyut: 10–20 μm) ve 1,09 g/mL (boyut: 20–27 μm) (Cospheric LLC., ABD) özkütleli polimer parçacıklar, 0, 100 ve 200 mM gadolinyum (Gd^{3+}) (Gadavist®, Bayer) içeren hücre kültürü ortamında süspense edilmiştir. Polimer parçacık süspansiyonu bir mikro kapiler kanala (1 mm x 1 mm kare kesit, 50 mm uzunluk, Vitrocom) yüklenmiş ve kanal mıknatıs deliğinin üzerinden geçecek şekilde halkalı mıknatısın üzerinde konumlandırılmıştır. Parçacıkların manyetik alan gradyanındaki hareketi bir stereo mikroskop (Soif Optical Instruments) altında görselleştirilmiştir.

2.3 Hücre kültürü

Çalışma boyunca D1 ORL UVA (kemik iliği mezenkimal kök hücresi), 7F2 (yağ hücreleri) ve MDA-MB-231 (agresif meme kanseri) hücre hatları kullanılmıştır (Balian vd., 2000; Sarigil vd., 2019; Lacroix ve Leclercq, 2004). Hücreler standart büyüme besi ortamında tutularak (DMEM, 10%FBS, 2%P/S) hücre sayısı artırılmıştır. Hücreler bu süreçte standart inkübatörde saklanmış (37°C, 5% CO_2) ve tüm kültür alanını kaplayacak kadar büyüdükleri zaman (confluency) trypsin ile kaldırılarak pasajlanmıştır. Adipojenik tetikleme için 7F2 hücreleri, 7 gün süreyle 5 $\mu g/mL$ insülin, 10 nM deksametazon ve 50 mM indometasinden oluşan indüksiyon ortamına maruz bırakılmıştır.

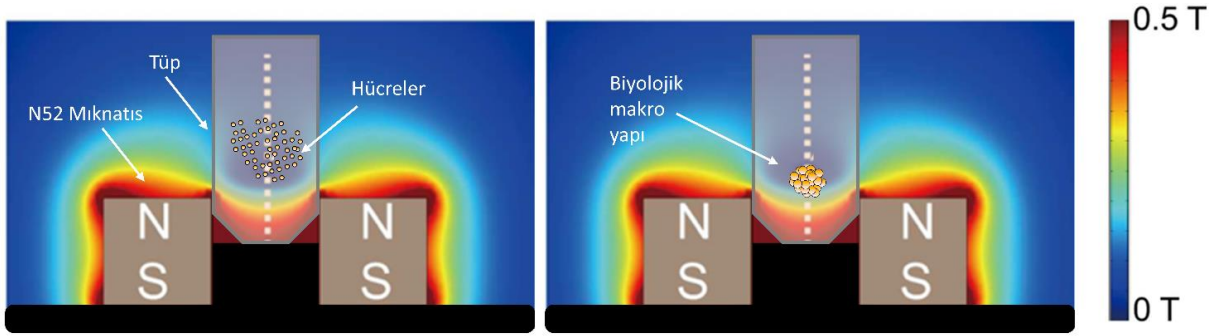
Manyetik levitasyon platformu içerisinde kültürlemek için gerekli sayıda hücre transferi, santrifüjlendikten sonra ortamda bulunan trypsin uzaklaştırılarak sağlanmıştır. Tüm deneylerde paramanyetik Gd^{3+} içeren solüsyon hücrelere uygulama öncesi vortekslenmiş ve Gd^{3+} içeren hücre kültürü besiyeri kültür süresince her gün değiştirilmiştir.

2.4 Hücrelere manyetik levitasyon uygulanması

Hücreler, çeşitli Gd^{3+} konsantrasyonları (50 mM, 100 mM, 150 mM ve 200 mM) içeren besi ortamında süspense edilmiştir. Manyetik levitasyon düzeneğinde kullanılacak olan tüpler (PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) için kullanılan saydam tüpler) orta noktaları mıknatısın deliğine gelecek şekilde sabitlenmiştir ve aksi belirtilmedikçe 200 μL hücre süspansiyonu hücre

kültürü tüpüne aktarılmıştır. Levitasyonun makro düzeyde görüntülenmesi 15X mikro odak uzunluklu lens (Baseus) ile ekipmanlandırılmış bir akıllı cep telefonu ile gerçekleştirilmiştir. Kümelerin yatay çapı, dikey çapı, alanı ve çevresi ImageJ Fiji yazılımı ile ölçülmüş ve görüntüler analiz için kaydedilmiştir. İlgili deneylerde video kamera kayıtları yapılmıştır.

Deney başlangıcında hücrelerin tripsinizasyon sırasında ayrıştırılmaları ve akış etkileri sebebi ile hücreler solüsyona dağılmakta ve bulanık bir görüntü kazandırmaktadır (**Şekil 4 sol panel**). Zaman geçtikçe hücrelerin mıknatıs deliği üzerinde bulunan lokal dip manyetik alanın üzerinde kararlı bir şekilde toplanarak levite olmakta ve bu noktada birbirleri ile etkileşerek kararlı makro biyolojik yapılar oluşturmaktadırlar (**Şekil 4 sağ panel**). Hücrelerin kararlı olarak konumlandıkları nokta özgül ağırlıkları ile ilişkili denge pozisyonlarıdır (**bkz. Manyetik prensipler**). Deney süresince hücreler levitasyon düzeneğinin tüm bileşenleri ile beraber standart inkübatörde saklanmış (37°C, 5% CO₂), ve düzenli olarak görüntülenmişlerdir. Elde edilen görüntüler oluşan yapıların morfolojik analizi için kullanılmıştır.



Şekil 4. Halka tip tek N52 mıknatıs üzerine yerleştirilen hücrelerin levitasyonu. İlk ekimde hücreler tüp içinde dağınık yapı sergilerken (sol panel), zaman geçtikçe hücreler diyamanyetik özelliklerinden dolayı halka deliğinin tam ortasında bulunan yerel manyetik dip noktasının üzerinde toplanmaktadırlar (sağ panel). (Ge ve Whitesides, 2018 makalesinden uyarlanmıştır).

2.5 Hücre biyolojisi ve sağlığı deneyleri

Hücre canlılığı deneyleri live/dead assay yöntemiyle (Calcein-AM ve Propidium Iodide boyama yapılarak) kontrol edilmiştir. D1 ORL UVA hücreleri, paramanyetik ortam içeren 200 mM Gd³⁺ içinde süspansiyon edilmiş ve manyetik levitasyon sisteminde 48 saat kültürlenmiştir. Adipositlerden oluşan 3 boyutlu yapıların canlılık testi için ise, adipojenezi ile indüklenen 7F2 hücreleri 24 saat süreyle manyetik levitasyon sisteminde kültürlenmiş ve sonra standart bir kültür kabına aktararak 24 saat daha kültürlenmiştir. Hücrelerin canlılığı, üreticinin protokolüne göre live/dead assay yöntemiyle (Sigma Aldrich) değerlendirilmiştir. Hücreler, 37°C'de 15 dakika boyanmış ve görüntüler bir floresan mikroskobu (Olympus IX-83)

kullanılarak elde edilmiştir. Hücreler hem 3 boyutlu küme formu hem de ayrıışmış tek hücreler olarak incelenmiştir.

2.6 Besi ortamını özelliklerinin ve manyetik alan dağılımının değiştirilmesi ile levitasyon kültürü

Kültür ortamına Ficoll® PM 400 (Sigma-Aldrich) ilave edilmiş besi ortamının özkütlesi 1.02 ve 1.04 g/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. D1 ORL UVA hücreleri farklı miktarlarda Gd³⁺ ile paramanyetik hale getirilen bu besi ortamlarında manyetik levitasyon ile 24 saat kültürlenmiş kültür görüntüleri kaydedilmiştir.

Besi ortamının manyetik duyarlılığını ve dolayısıyla hücreler üzerin etki eden manyetik kuvveti daha da artırmak için, 200 mM'dan daha da arttırılmış Gd³⁺ konsantrasyonları ile D1 ORL UVA hücrelerinin levitasyon kültürü gerçekleştirilmiş ve hücrelerin kümelenmesi gözlemlenmiştir.

Levitasyon sistemindeki manyetik alanı güçlendirmek için zıt kutupları karşılıklı bakacak şekilde iki mıknatıs tutturulmuştur. D1 ORL UVA hücreleri farklı Gd³⁺ konsantrasyonları içeren paramanyetik besi ortamında süspense edilmiş ve 1 halkalı mıknatıs veya zıt kutupları birbirine bağlanmış 2 halkalı mıknatıs delikleri üzerinde levite edilmiştir. Levitasyon sistemlerine 200 µL hücre süspansiyonu transfer edilerek ve 2, 24 ve 48 saat sonra kültürler gözlemlenmiştir.

2.7 3 boyutlu hücresel yapıların jel matris içine gömülmesi

D1 ORL UVA hücreleri, ortam içeren 200 mM Gd³⁺ içinde süspense edilmiş ve 24 saat süreyle manyetik levitasyon sisteminde kültürlenmiştir. Kültürün 24. saatinin sonunda, levitasyonun sürdürülmesi için kültür kabında sadece 20 µl kalana kadar ortam aspire edilmiştir. Kalan ortamın hacminin beş katı olacak şekilde Matrigel (BD Biosciences) +4°C'de kültüre yavaşça ilave edilmiştir. Ardından jelleşme için kültürler 37 ° C'lik bir inkübatörde 3 saat süreyle tutulmuştur. Matrigel jelleştikten sonra etrafını saran jel ile birlikte 3 boyutlu yapı, bir tarafı kesilerek mikro kaşık haline getirilen bir pipet yardımıyla bir kültür plakasına aktarılmış ve kültür aşamalarının görüntüleri kaydedilmiştir. Matrigel içine gömülü 3 boyutlu yapı üzerine besi ortamı eklenerek 4 gün boyunca kültürlenmiştir.

2.8 Moleküler ifadelerin RT-PCR ile belirlenmesi

Hücrelerin manyetik levitasyon platformunda kültürlenmesi sonucunda elde edilen biyolojik yapıların mRNA düzeylerinin belirlenmesinde standard RT-PCR kitleri kullanılmıştır. Proje sürecinde kullanılacak hücrelerde GAPDH kontrol geninin ve Runx2 ve ALP genlerinin mRNA seviyesinin tespiti yapılmıştır. Toplam mRNA izolasyonu RNAqueous Micro Kit (Invitrogen)

protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen örneklerin mRNA konsantrasyonları Nanodrop kullanılarak ölçülmüştür. Eşit miktarlarda mRNA'dan First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) ile elde edilen cDNA'lar RT-PCR analizi için kullanılmıştır. Çevrimler sonucu (Tablo 2) elde edilen ifade eğrileri kontrollü olarak analiz edilmiştir.

Tablo 1. RT-PCR'da kullanılan primer listesi

Gen adı	İleri (forward) primer (5'-3')	Geri (reverse) primer (5'-3')
GAPDH	GAC ATG CCG CCT GGA GAA AC	AGC CCA GGA TGC CCT TTA GT
Runx2	TCC CTG AAC TCT GCA CCA AGT	TTC CGT CAG CGT CAA CAC CAT
ALP	TTT AGT ACT GGC CAT CGG CA	ATT GCC CTG AGT GGT GTT GCA

Tablo 2. qRT-PCR protokolu

Preincubation	95 °C	600 s	1 cycle
3 step amplification	95 °C	30 s	45 cycle
	60 °C		
	72 °C		
Melting	95 °C	10 s	1 cycle
	65 °C	60 s	
	72 °C	1 s	

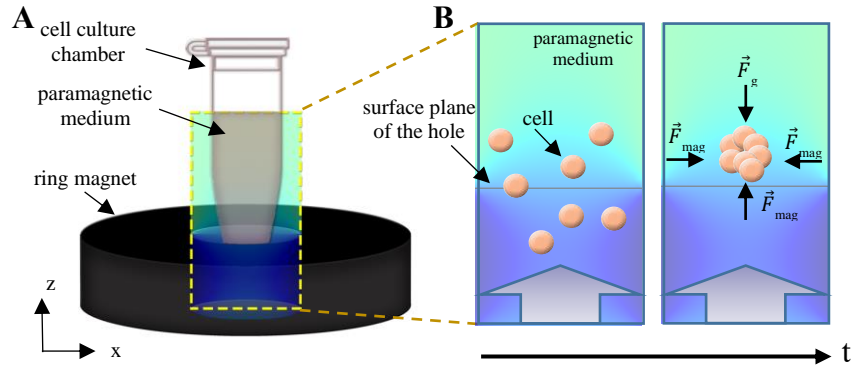
2.9 İstatistikler

Tüm deneyler en az üç kez tekrar edilmiştir ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak rapor edilmiştir. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism sürüm 6.0 (GraphPad Yazılımı) ile Student's t-testi (two tail) veya Sidak post hoc düzeltme ile iki yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık sınırı olarak %5 gözetilmiştir.

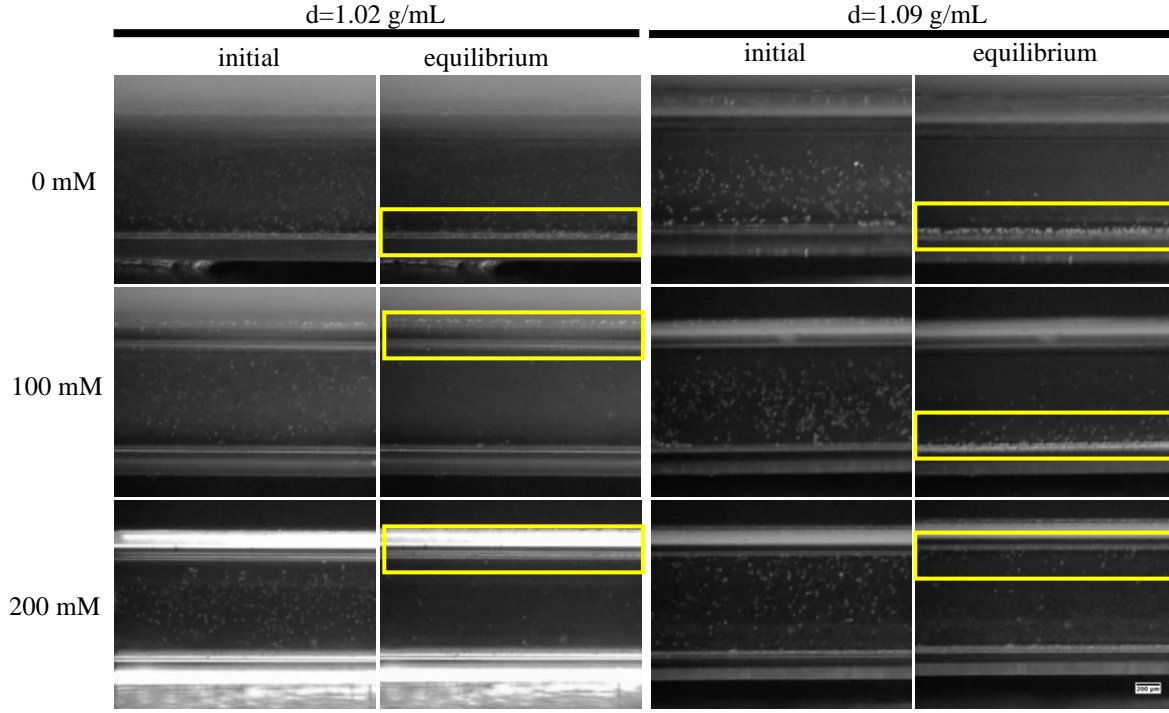
3. BULGULAR

3.1 Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon ile 3 boyutlu biyolojik yapıların oluşturulması

Hücrelerin levitasyonu ile 3 boyutlu biyolojik yapıların oluşturulması için tek bir NdFeB (N52) halkalı mıknatıs üzerine konumlandırılmış bir hücre kültürü haznesinden oluşan bir manyetik levitasyon sistemi tasarlanmıştır (**Şekil 5**). İlk olarak, halkalı mıknatıs sisteminin canlı hücrelerin levitasyonu için uygulanabilirliğini test etmek için özkütlesi yüksek ve düşük olan hücreleri temsil etmek üzere 1.02 ve 1.09 g/mL özkütleli polimerik parçacıklar (Durmus vd., 2015, ve grubumuzda Sarıgil vd., 2019) Gd^{3+} içeren (100 ve 200 mM) paramanyetik besi ortamlarında süspansiyon edilmiş ve halka mıknatıs üzerindeki hareketleri gözlemlenmiştir (**Şekil 6**). 1.02 g/mL özkütleyle sahip polimerik parçacıkların, hem 100 hem de 200 mM Gd^{3+} içeren paramanyetik ortamda levitasyonu gözlemlenirken, yoğun parçacıkların (1.09 g/mL) 100 mM Gd^{3+} konsantrasyonunda sedimantasyonu gözlemlenmiştir. Bu parçacıkların levitasyonunun ise 200 mM Gd^{3+} içeren ortamda sağlandığı görülmüştür.

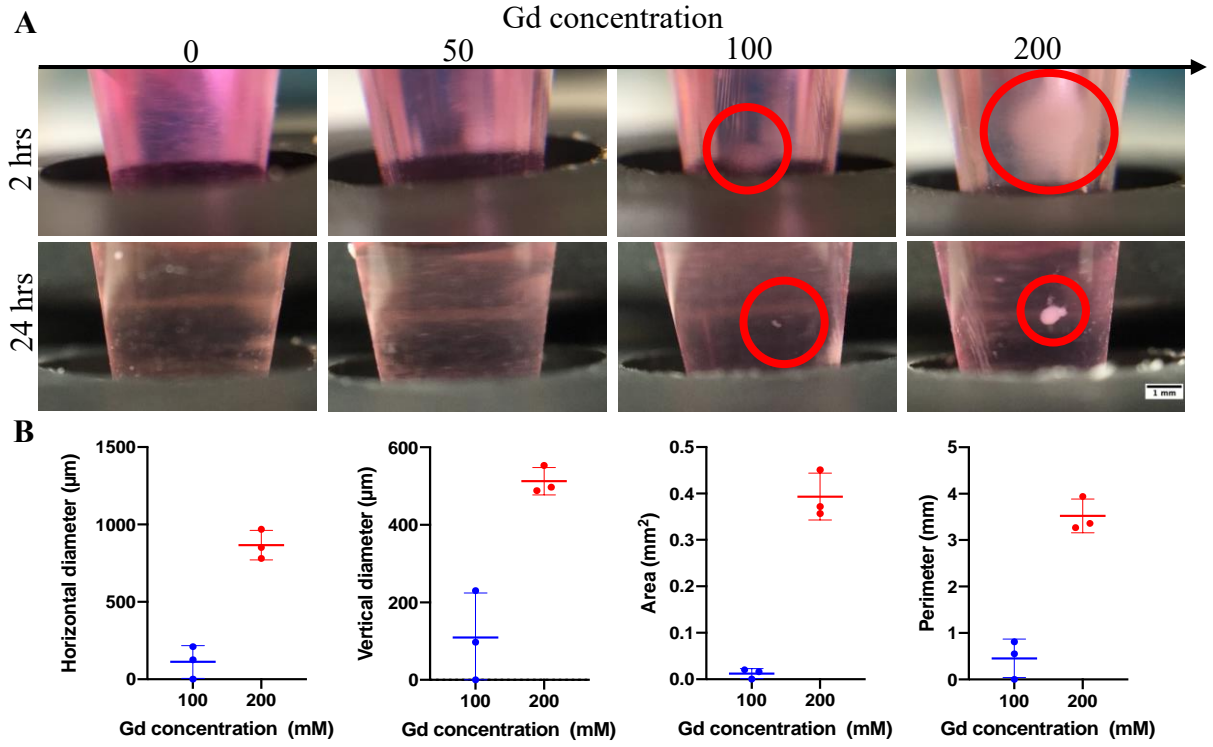


Şekil 5. Manyetik kuvvet tabanlı levitasyon ve 3 boyutlu biyolojik yapı oluşumu. (A) Manyetik levitasyon sistemi. Hücre kültürü haznesi, halkalı mıknatısın deliği üzerinde konumlandırılmıştır. (B) Hücresel kümelenmenin şematik gösterimi. Şemadaki blok oklar yukarı doğru manyetik indüksiyonu temsil etmektedir.



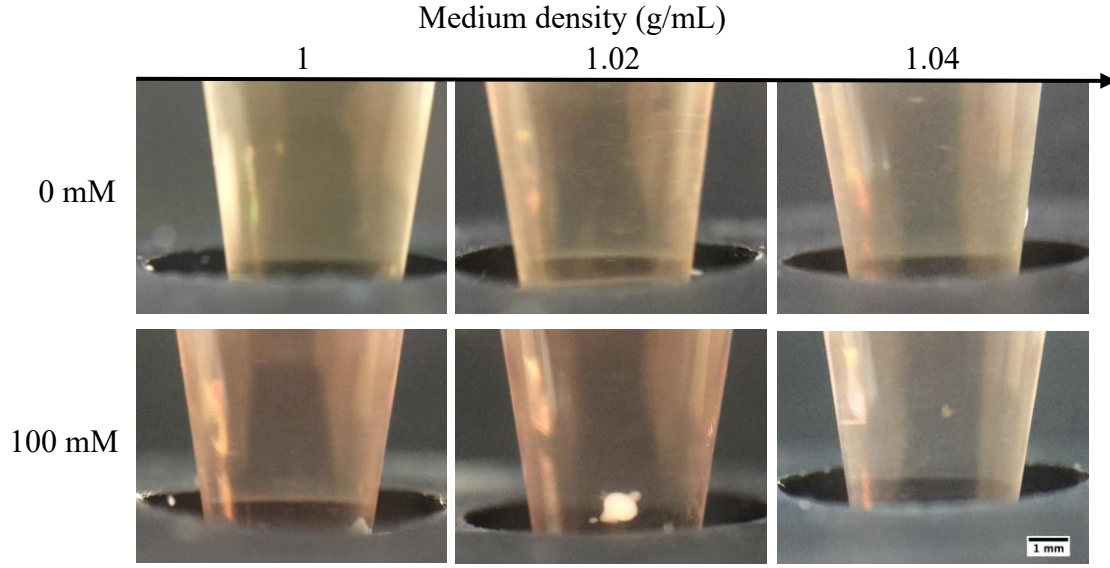
Şekil 6. Paramanyetik kültür ortamında (0, 100 ve 200 mM Gd^{3+}) süspansiyon edilmiş 1.02 ve 1.09 g/mL yoğunluğa sahip polimerik parçacıkların halkalı mıknatıs deliği üzerindeki davranışını gösteren mikrograflar. Sarı dikdörtgenler parçacıkların denge konumunda biriktiği bölgeyi göstermektedir. İlk mikrograflar işlemin başlangıcında ve ikinci mikrograflar ise parçacıklar denge konumuna ulaştığında (7 dakika içinde) kaydedildi. Ölçek çubuğu: 200 μm .

Sistemin canlı hücrelere yakın özkütleyle sahip parçacıklarının levitasyonunu sağlayabildiğini gösterdikten sonra, D1 ORL UVA hücreleri artan Gd^{3+} (0, 50, 100 ve 200 mM) konsantrasyonlarına sahip ortamda süspansiyon haline getirilmiş ve levitasyon ile 24 saat boyunca kültürlenmiştir (**Şekil 7**). Gd^{3+} içermeyen kontrol grubunda ve 50 mM Gd^{3+} içeren paramanyetik ortamda, levitasyon ile elde edilmiş 3 boyutlu biyolojik yapılar gözlemlenmemiştir. Kültürün ilk 2 saatinde, 100 ve 200 mM Gd^{3+} içeren paramanyetik ortamda hücrelerin odaklanmaya başladıkları bölgede bulutsu bir görünüm oluşturarak kümelenmeye başladığı gözlemlenmiştir ve 24 saat sonra kompakt 3 boyutlu yapılar oluşmuştur. 200 mM Gd^{3+} içeren ortam hücrelerin çoğunun levitasyonunu sağlayarak 100 mM Gd^{3+} içeren ortamda oluşan kümelere kıyasla çok daha büyük yapıların oluşmasını sağlamıştır. 200 mM Gd^{3+} içeren ortamda oluşan hücre kümelerinin ortalama yatay çapı $867.33 \pm 94.93 \mu m$ olarak ölçülmüş ve bu değer dikey çapının yaklaşık 1.7 katı olduğu görülmüştür. Bu kümelerin kesit alanı ve çevresi ise sırasıyla $0.39 \pm 0.05 mm^2$ ve $3.52 \pm 0.36 mm$ olarak ölçülmüştür.



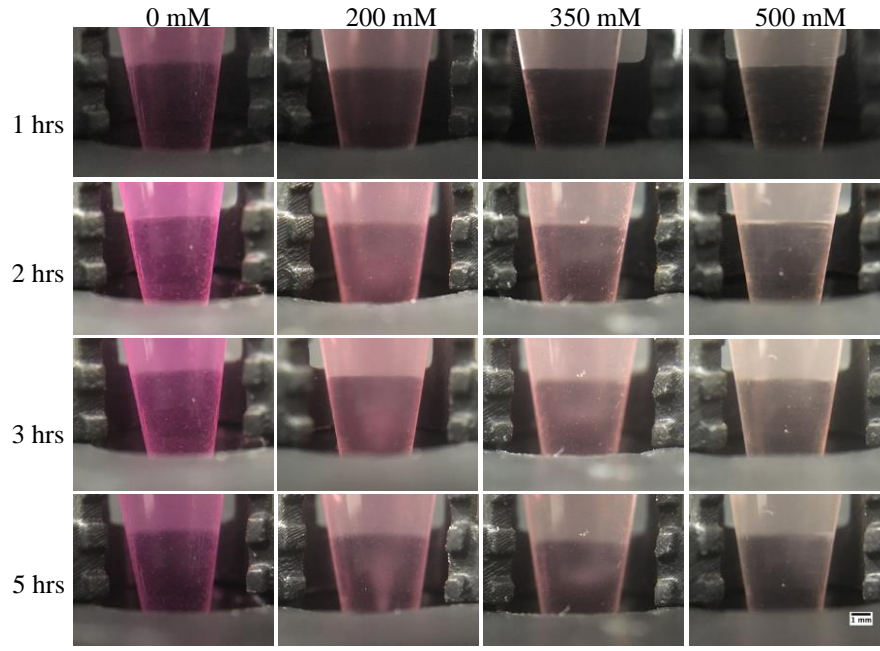
Şekil 7. D1 ORL UVA hücrelerinin halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon sisteminde 3 boyutlu yapı oluşturması. (A) Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon (0, 50, 100 ve 200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/mL, 100 μL) ile 2 saat ya da 24 saat kültürlenen D1 ORL UVA hücrelerinin mikrografları. Ölçek çubuğu: 1 mm. (B) Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca oluşturulan hücresel kümelerin boyutu (100 ve 200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/mL, 100 μL); yatay çap, dikey çap, alan ve çevre. Veriler, hata çubuklarıyla (\pm SD) tekrarların ortalaması olarak çizilmiştir.

Daha sonra, kültür ortamı özellikleri ve manyetik alan manipüle edilerek manyetik levitasyon kültürü üzerine etkileri test edilmiştir. Hücrelere etki eden yerçekimi kuvvetini ve dolayısıyla levitasyonu sağlamak için gerekli olan besi ortamı manyetik duyarlılığını azaltmak için, ortama ficoll eklenerek ortamın özkütlesi artırılmış ve D1 ORL UVA hücreleri bu daha yoğun ortamlarda levite edilmiştir. (Şekil 8) Kültür ortamının yoğunluğu 1.02 g/mL'ye yükseltildiğinde, 100 mM Gd^{3+} konsantrasyonu içeren ortam, 1 g/mL özkütleli ortamdan farklı olarak çoğu hücrenin levitasyonu sağlayarak kompakt bir 3 boyutlu yapının oluşmasına olanak sağlamıştır. 1.02 g/mL yoğunluklu ortamda oluşturulan hücresel yapıların ölçülen yatay çapı, dikey çapı, alanı ve çevresi sırasıyla $1005.33 \pm 123.29 \mu\text{m}$, $712 \pm 54.03 \mu\text{m}$, $0.70 \pm 0.13 \text{mm}^2$ ve $4.15 \pm 1.09 \text{mm}$ olarak ölçülmüştür. Ayrıca 1.02 g/mL yoğunluğa sahip ortamda oluşan hücresel yapıların yatay çapı ($p = 0.73$), dikey çapı ($p = 0.67$), alanı ($p = 0.24$) ve çevresi ($p = 0.82$) istatistiksel olarak 200 mM Gd^{3+} içeren 1 g/mL özkütleli ortamda oluşan yapılar ile benzer olduğu belirlenmiştir. Ortam yoğunluğunun daha fazla artırılarak 1.04 g/mL'ye ayarlanması ise gözlenebilir küme oluşumuna neden olmamıştır.

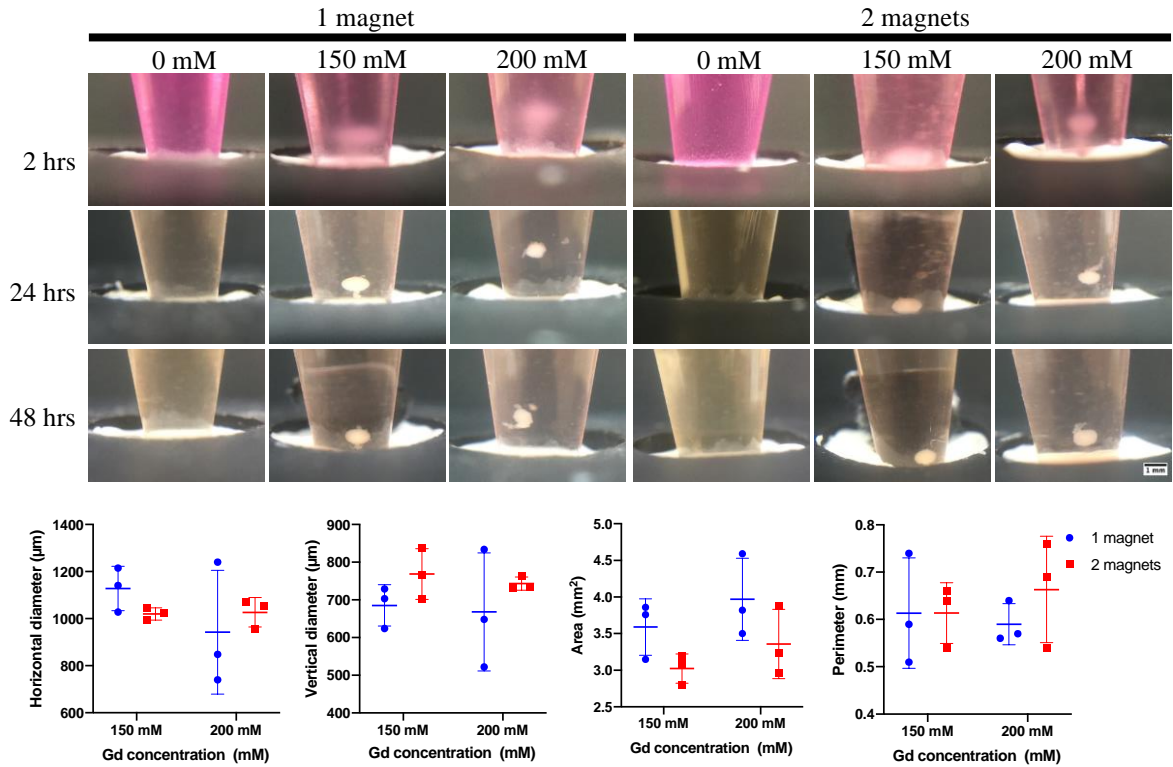


Şekil 8. Farklı yoğunluklarda kültür ortamlarında (1 (ficoll ilavesi olmadan), 1.02 ve 1.04 g/mL) halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon (0 ve 100 Gd^{3+}) ile 24 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin mikrografları. Ölçek çubuğu: 1 mm.

Ortamın manyetik duyarlılığının artırılmasının dolayısıyla hücreler üzerine etki eden manyetik kuvvetin artırılmasının hücre kümelerinin oluşum hızını artırıp artırmadığını test etmek için 350 ve 500 mM Gd^{3+} konsantrasyonları ile levitasyon denenmiş, ancak 5 saat sürdürülen gözleme göre kümelenme hızında artış saptanmamıştır (**Şekil 9**). Son olarak, iki mıknatısın zıt kutupları karşılıklı gelecek şekilde üst üste konumlandırılması ile yanal mıknatıs alanını iki kat artırarak yükseltilecek manyetik alan gücünün D1 ORL UVA hücre kümelerinin boyutunu etkileyip etkilemediği test edilmiştir (**Şekil 10**). Bu uygulama sonucunda, manyetik alan değişiminin hem 150 mM hem de 200 mM Gd^{3+} içeren test gruplarında boyut değişimine neden olmamıştır. Boyut parametreleri olan yatay çap (sırasıyla $p = 0.62$ ve 0.74), dikey çap ($p = 0.50$ ve 0.56), alan ($p = 0.26$ ve 0.22) ve çevrenin ($p = 0.99$ ve $p = 0.57$) istatistiksel olarak benzer olduğu belirlenmiştir.



Şekil 9. Artan Gd^{3+} konsantrasyonlarında (0, 200, 350 ve 500 mM) halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon ile 5 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin mikrografı. Ölçek çubuğu: 1 mm.

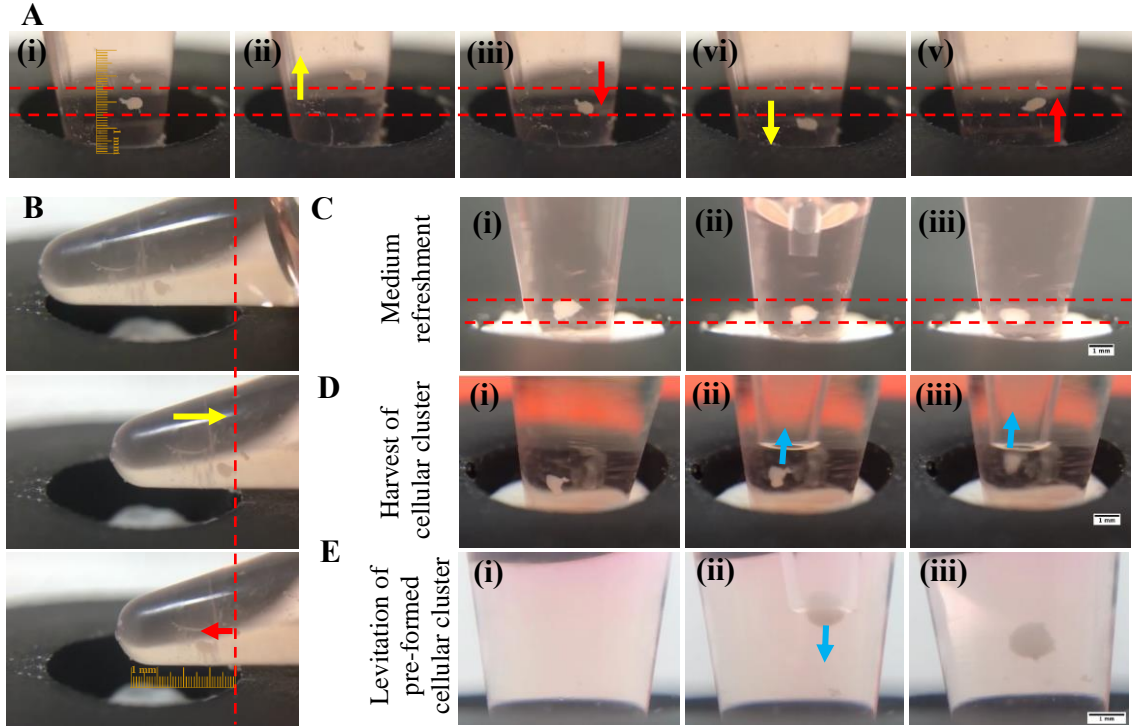


Şekil 10. Tek bir halkalı mıknatıstan oluşan veya üst üste yapıştırılmış 2 halkalı mıknatıstan oluşan manyetik levitasyon platformlarında (0, 150, 200 mM Gd^{3+}) 2, 24 ve 48 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin mikrografı ve boyutları. Ölçek çubuğu: 1 mm. Veriler, hata çubuklarıyla (\pm SD) tekrarların ortalaması olarak çizilmiştir.

3.2 Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon ile 3 boyutlu kültürde kütle manipülasyonu

Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon kurulumunun 3 boyutlu biyolojik yapılar oluşturabildiğinin gösterilmesi ve protokol değişkenlerinin levitasyona etkisinin belirlenmesinin ardından sistemin hücre kültüründe kütle manipülasyonları (sıvı faz besi ortamı ve katı faz hücresel kümeler) için uygunluğu araştırılmıştır. Öncelikle, dikey düzlemde halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyonda hücre odaklanma bölgesini gözlemek için, manyetik levitasyon ile birleştirilmiş D1 ORL UVA kümesi kültür haznesi (**Şekil 11 (A)**) ile birlikte dikey düzlemde hareket ettirilmiştir. Levite durumdaki hücre kümesi her iki yönde hareket sonrasında da denge pozisyonuna geri dönmüştür. Daha sonra, yatay düzlemde hücre odaklanma bölgesini gözlemek için, manyetik levitasyon kültürü ile oluşturulan D1 ORL UVA kümesi, kültür haznesi ile birlikte halka mıknatıs yüzeyine paralel olarak mıknatısın merkezinden dışa doğru hareket ettirilmiştir (**Şekil 11 (B)**). Hücresel yapının, mıknatıs deliğinin üstündeki alanın sınırına ulaştığında, mıknatıs yüzeyindeki yüksek manyetik alan nedeniyle mıknatısın merkezine doğru geri hareket ettiği görülmüştür.

Kültürün uzun süreli idamesi için önemli bir faktör olan ortam tazelenmesinin uygulanabilirliği, manyetik levitasyon sisteminde oluşmuş ve 48 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin kültüründe test edilmiştir (**Şekil 11 (C)**). Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon sisteminde, toplam hacmi 200 µl olan kullanılmış besi ortamın hacmen %80'ini ortamdaki uzaklaştırılmış ve yine paramanyetik hale getirilmiş taze besi ortamı ile tazeleme gerçekleştirilmiştir. Besi ortamının 3 boyutlu biyolojik yapının levitasyonunu bozmadan tazelenileceğinin gösterilmesinin ardından sistemde oluşturulan hücre kümelerinin transferi denenmiştir. 2×10^5 D1 ORL UVA hücrelerinden oluşan 3 boyutlu yapılar 1000 µl pipet ucu kullanılarak mekanik olarak bozulma olmaksızın levitasyon kültüründen nazikçe toplanabilmiş (**Şekil 11 (D)**) ve levitasyon sisteminde oluşturulmuş kümeler yine mekanik olarak bozulmaya uğramadan başka bir levitasyon cihazında başarıyla aktarılabilmiş ve levitasyonu sürdürülmüştür (**Şekil 11 (E)**).



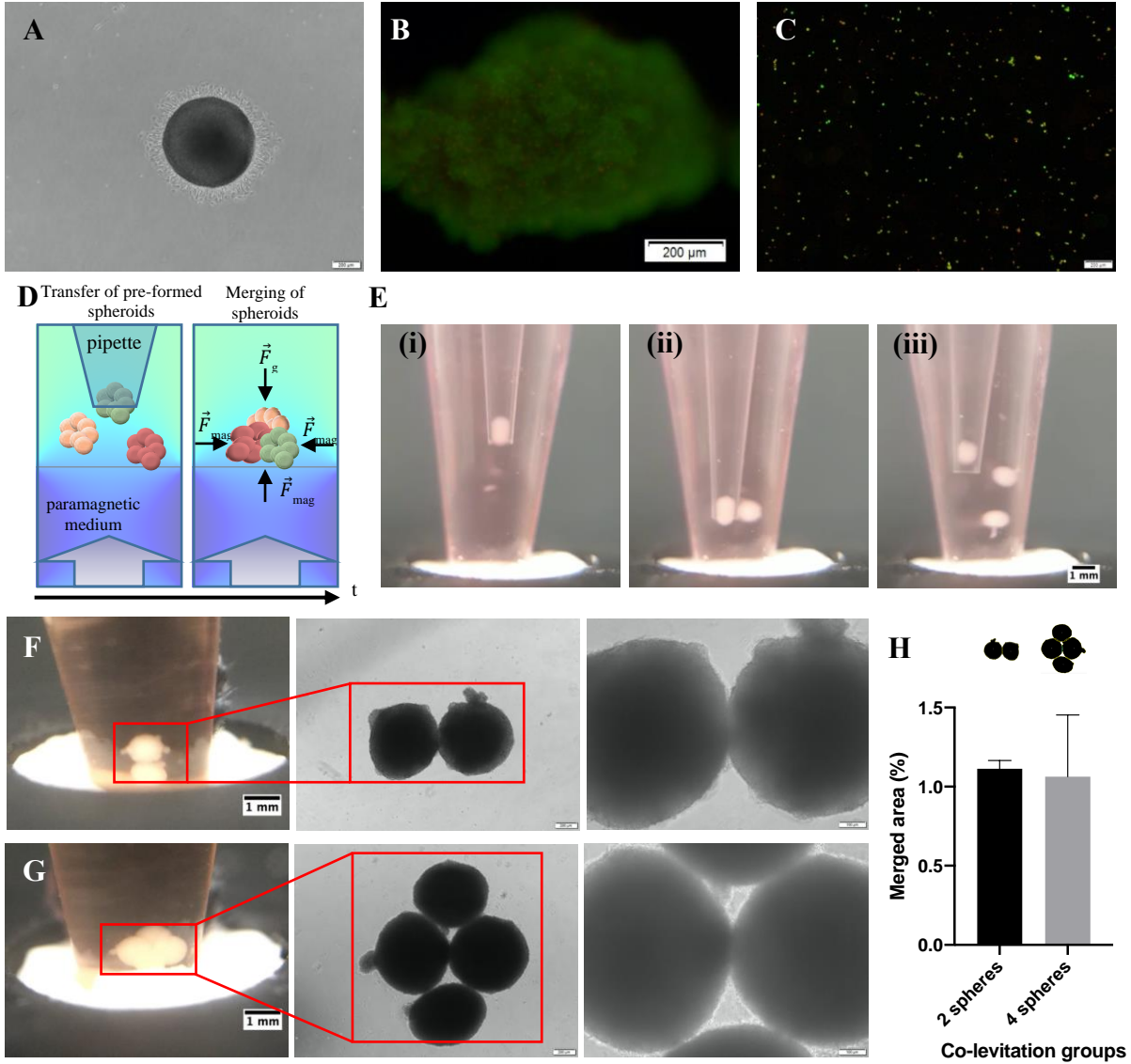
Şekil 11. Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon ile 3 boyutlu kültürde kütle manipülasyonu. (A) Manyetik levitasyon sisteminde kendiliğinden birleşmiş D1 ORL UVA kümesinin (200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, $100 \mu\text{L}$) (A) dikey düzlemde ve (B) yatay düzlemde odaklanma bölgesi. Denge konumundaki hücresel küme (i) kültür haznesi ile birlikte yukarı doğru hareket ettirildiğinde (ii) küme denge konumuna geri çökmüştür (iii). Hücresel küme kültür haznesi ile birlikte aşağı doğru hareket ettirildiğinde ise (iv) küme denge konumuna geri yükselmiştir (v). Şekil A'da kırmızı kesikli çizgilerin arası hücresel kümenin dengelenme eğiliminde olduğu bölgeyi belirtmektedir. Şekil B'de kırmızı kesikli çizgi hücresel kümenin yatay düzlemde odaklandığı bölgenin sınırını göstermektedir. Sarı oklar hücresel kümenin kültür haznesi ile birlikte dışsal bir kuvvet ile hareket ettirildiği yönü göstermekte ve kırmızı oklar hücresel kümenin doğal olarak hareket ettiği yönü göstermektedir. (C) Manyetik levitasyon sisteminde (200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, $200 \mu\text{L}$) oluşmuş ve denge pozisyonunda kültürü devam eden 3 boyutlu hücresel kümenin (i) kullandığı eski besiy ortamının uzaklaştırılması (ii) ve taze besiy ortamın eklenmesi (iii). (D) Manyetik kaldırma sisteminde oluşmuş ve denge pozisyonunda kültürü devam eden bir 3B hücresel kümenin (i) bir pipet yardımıyla yavaşça çekilerek hasat edilmesi (ii, iii). (D) Manyetik levitasyon sisteminde oluşan 3B hücresel kümenin bir pipetle başka bir manyetik levitasyon cihazına levitasyonu devam edecek şekilde aktarılması. Ölçek çubukları: 1 mm.

3.3 Uzun vadeli levitasyon kültürü

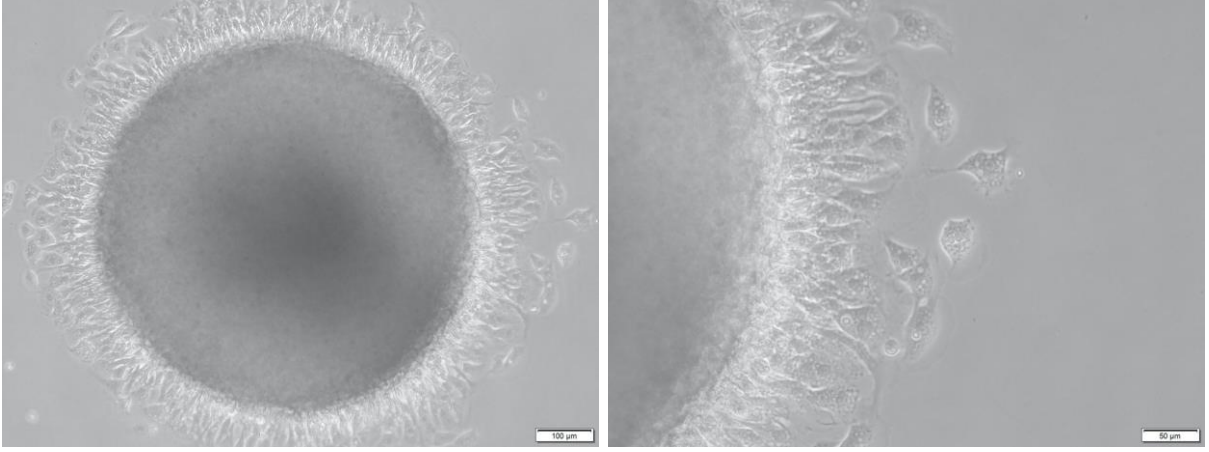
Levitasyon kültürünün hücrelerin sağlığı üzerindeki etkileri, 24 saatlik levitasyon kültürü sırasında oluşan 3 boyutlu hücresel kürelerin standart bir kültür kabına aktarılmasıyla ve burada hücrelerin tutunup kültürün devam edip etmediğinin incelenmesi ile test edilmiştir (**Şekil 12 (A)** ve **Şekil 13**). $713 \pm 3 \mu\text{m}$ çapında olduğu belirlenen hücresel kümelerdeki hücrelerin kümenin kenarlarından tutunarak yayılmaya başladığı ve kültürün 24. saatinde bu hücresel yayılmanın alansal olarak kümenin çapının $\sim 43\%$ 'ü kadar olduğu gözlemlenmiştir. Manyetik

levitasyon sisteminde oluşan 3 boyutlu yapıların canlılığını belirlemek için ise, hem bütünlüğü bozulmamış 3 boyutlu yapılar üzerinde (**Şekil 12 (B)**) hem de kümenin iç kısımlarında kalan hücrelerin canlılığının görüntülenebilmesi için bu yapıların tek hücre süspansiyonuna parçalanmış formu üzerinde (**Şekil 12 (C)**) live/dead boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin çoğunun hem 3 boyutlu formda hem de tek hücre süspansiyonunda calcein-AM sinyalinden anlaşıldığı üzere canlı olduğunu gösterilmiştir.

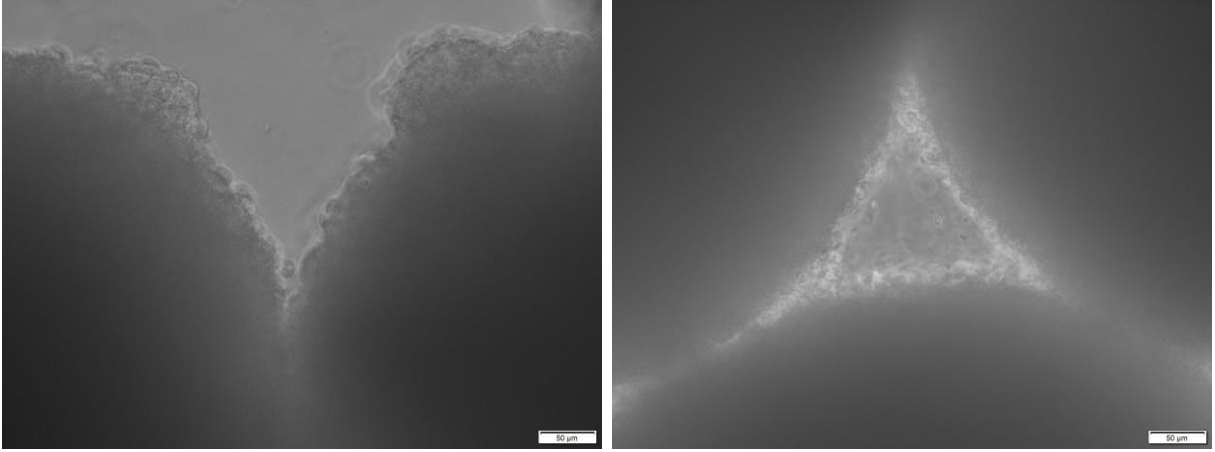
Biyolojik birimlerin sistemde oluşturulabildiğinin ve bu yapıların sağlıklı olduğunun gösterilmesinin ardından halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon sisteminin 3 boyutlu yaşam birimlerinden oluşan kompleks yapıların oluşturulmasında uygulanabilme potansiyeli araştırılmıştır. Levitasyon kültüründe ayrı ayrı oluşturulmuş homoselüler sferoidler aynı levitasyon sistemine transfer edilerek başarılı bir şekilde temas halinde birlikte levite edilebildikleri gösterilmiştir (**Şekil 12 (D)- (G)**). Burada D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyonunun sonucunda oluşan 3 boyutlu kümeler, levitasyon sistemindeki 200 mM Gd³⁺ içeren besi ortamına yavaşça aktarılmıştır (**Şekil 12 (E)**). İki veya dört hücreli kümenin cihaza aktarılmasıyla oluşturulan birlikte-levitasyon kültürleri sferoidler arasında hücre-hücre bağlanmasına izin vermek için 24 saat daha kültürlenmiştir. Hücreli kürelerin 24 saatlik birlikte-levitasyon işleminden sonra kaynaştığı görülmüştür. Ayrıca sferoidler arası temas bölgelerinin daha iyi gözlemlenebilmesi için bütünlük birlikte-kültür ürünleri standart kültür kaplarına aktarılmıştır ve bütünlük kültür ürünlerinin bu mekanik işlem esnasında zarar görmediği gözlemlenmiştir (**Şekil 14**). 24 saatlik bir birlikte-levitasyon, hücreli kümelerin alansal olarak 1.07 ± 0.35 oranında birleşmesine neden olmuş ve bilateral ve dörtlü birlikte-levitasyon kültürlerinde füzyon yüzdesi arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.87$) (**Şekil 12 (H) ve Şekil 15**).



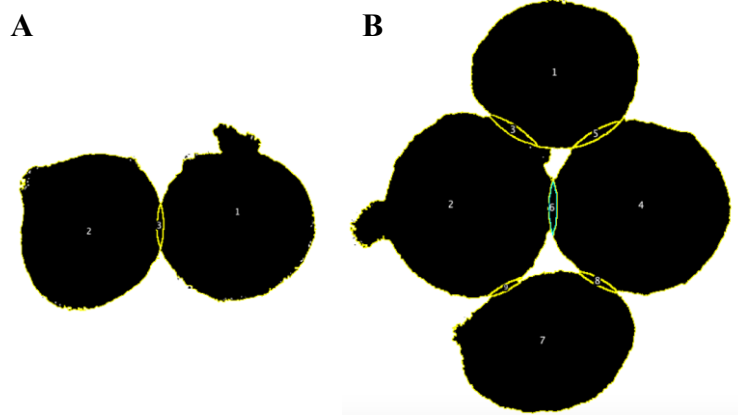
Şekil 12. Halkalı mıknatıs tabanlı levitasyon ile oluşturulan kümelerin sağlığı ve birlikte-levitasyon kültürü. (A) Manyetik levitasyon (200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, $200 \mu\text{L}$) ile oluşturulan, bu şartlar altında 48 saat süreyle kültürlenmiş ve daha sonra standart kültür kabına aktarılarak burada 24 saat kültürlenmiş bir D1 ORL UVA 3 boyutlu hücresel kümesinin mikrografı. Manyetik levitasyonla oluşturulan D1 ORL UVA 3 boyutlu yapılarının (B) ve 3 boyutlu yapılardan ayrıştırılan tekil hücrelerin (C) floresan mikroskopi görüntüleri. (canlı: yeşil, ölü: kırmızı). Hücre canlılığı, canlı ölü boyama (Calcein / PI) ile görselleştirilmiştir. Ölçek çubuğu: $200 \mu\text{m}$. (D) Ayrı ayrı manyetik levitasyon tekniği ile oluşturulmuş hücresel kümelerin birlikte-levitasyon kültürünün şematik temsili. (E) Manyetik levitasyon sisteminde oluşturulan ve bu şartlar altında 48 saat süreyle kültürlenmiş D1 ORL UVA hücresel kümelerinin birlikte-levitasyon kültürü için levitasyon sistemindeki 200 mM Gd^{3+} içeren bir ortama tek tek aktarımı. Manyetik levitasyon sisteminde ayrı ayrı oluşturulmuş (F) iki ve (G) dört D1 ORL UVA hücresel kümesinin 24 saat boyunca 200 mM Gd^{3+} içeren ortamda birlikte-levitasyon kültürü. Ölçek çubukları: Kültür odası görüntüleri için 1 mm , Şekil F ve G için orta ve sağ görüntülerde sırasıyla 200 ve $100 \mu\text{m}$. (H) 24 saat boyunca 200 mM Gd^{3+} içeren bir ortamda birlikte levite edilen kürelerin alanca füzyon oranı (%). Veriler, hata çubuklarıyla ($\pm \text{SD}$) tekrarların ortalaması olarak çizilmiştir ve Student's *t*-test kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 13. 48 saat boyunca manyetik levitasyon (200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, $200 \mu\text{L}$) ile kültürlenmiş ve daha sonra standart kültür kabına aktararak burada 24 saat daha kültürü sürdürülen bir D1 ORL UVA 3 boyutlu yapısının mikrofrafı. Ölçek çubukları: sırasıyla 100 ve $50 \mu\text{m}$.



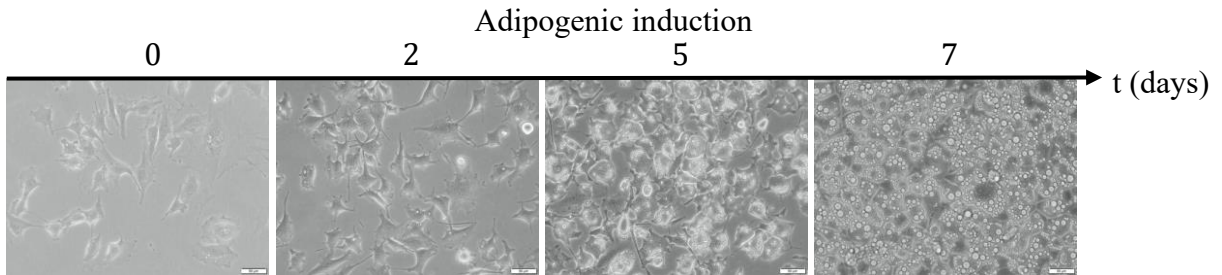
Şekil 14. 200 mM Gd^{3+} içeren ortamda iki (sol) ve dört (sağ) D1 ORL UVA hücre kümesinin 24 saatlik birlikte-levitasyon kültürü sonucunda oluşturulan 3 boyutlu yapılarda hücre kümeleri arası temas bölgelerinin yakınlaştırılmış görünümü. Ölçek çubuğu: $50 \mu\text{m}$.



Şekil 15. Şekil 12 (H)'de sunulan (A) iki ve (B) dört hücre kümesinin birlikte-levitasyon kültürü sonucunda alanca füzyon oranlarının (%) hesaplanması için görüntü işleme programında elde edilen görüntüler.

3.4 Farklı özkütlelere sahip hücre tiplerinin manyetik levitasyon kültürü

Manyetik levitasyon prensibinde hücrelerin denge konumunu belirleyen özelliklerden biri, tekil hücrelerin özkütleleri olduğundan farklı özkütle özelliği sergileyen hücrelerle de manyetik levitasyon protokolü denenmiştir. Düşük özkütleli hücrelerin levitasyona dayalı 3 boyutlu kültürünün sistemimizde test edilmesi için hücre içi lipit içermeleri nedeniyle düşük özkütleyle sahip olan adipositler (Sarıgil vd., 2019) kullanılmıştır. Lipit biriktirmiş hücreler elde etmek için 7F2 hücreleri adipojenezi tetikleyen ajanlar içeren besi ortamında 7 gün boyunca kültürlendi (**Şekil 16**). Hücre içerisindeki lipit birikiminin gözlemlenmesinin ardından hücreler, artan Gd^{3+} konsantrasyonları (0, 100, 150 ve 200 mM) içeren paramanyetik ortamda süspansiyon edilmiş ve halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon sisteminde 24 saat boyunca kültürlenmiştir (**Şekil 17 (A)**). Kültürün 2. saatinde 100 ile 200 mM arasında Gd^{3+} içeren paramanyetik ortamda hücrelerin levitasyon aracılığı ile mıknatıs üzerinde deliğin merkezine doğru birikmeye başladığı ve kültürün 24. saatinde 3 boyutlu yapılar oluştuğu gözlemlenmiştir. 100 mM Gd^{3+} içeren ortamda oluşan kümelerin 150 ve 200 mM Gd^{3+} içeren ortamda oluşan kümelere göre alan olarak sırasıyla 1.95 ve 2.95 kat ($\sim 5,8 \text{ mm}^2$) ve çevre olarak sırasıyla 1.51 ve 1.58 kat daha büyük ($\sim 10,72 \text{ mm}$) olduğu belirlenmiştir (**Şekil 17 (B)**). 150 ve 200 mM Gd^{3+} içeren ortamda oluşan kümeler arasında ise alan ($p=0.06$) ve çevre ($p=0.78$) büyüklükleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Levitasyon için kullanılan Gd^{3+} konsantrasyonuna bağlı olarak değişen hücresel küme boyutunun ise yatay çaptan ziyade dikey çap yönünde olduğu belirlenmiştir. Grafik daha yakından incelendiğinde, 100 mM Gd^{3+} içeren ortamda oluşan hücresel kümelerin dikey çapının $3917 \pm 622.55 \mu\text{m}$ olduğu ve 150 mM ve 200 mM Gd^{3+} konsantrasyonlarında oluşan kümelerin dikey çaplarından sırasıyla 2.38 ve 2.72 kat daha fazla olduğu görülmüştür.

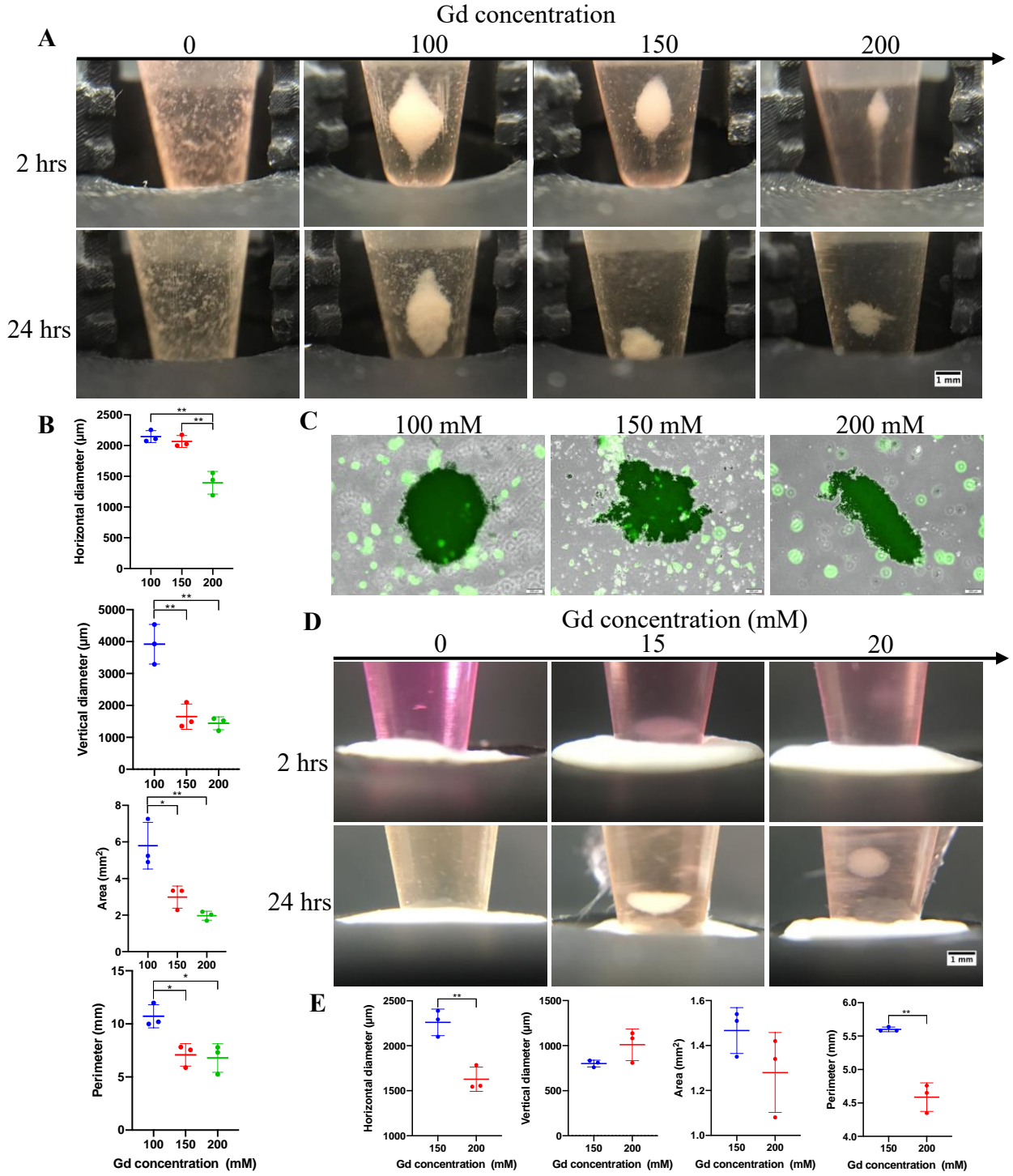


Şekil 16. Adipojenenez tetikleyen ajanlar içeren ortamda 7 gün boyunca kültürlenen 7F2 hücrelerinin mikrografları. Ölçek çubuğu: 50 μm .

24 saatlik bir levitasyon kültürü sonucunda oluşan 3 boyutlu adiposit yapıları kültürü sürdürmek için standart bir hücre kültürü kabına aktarılmış ve burada 24 saat daha kültürlenmiştir (**Şekil 18**). Tüm paramanyetik besi ortamı gruplarında kültür kabına aktarılan 3 boyutlu yapıların gevşek paketlenmiş olduğu ve birçok adipositin transferden sonra 3 boyutlu

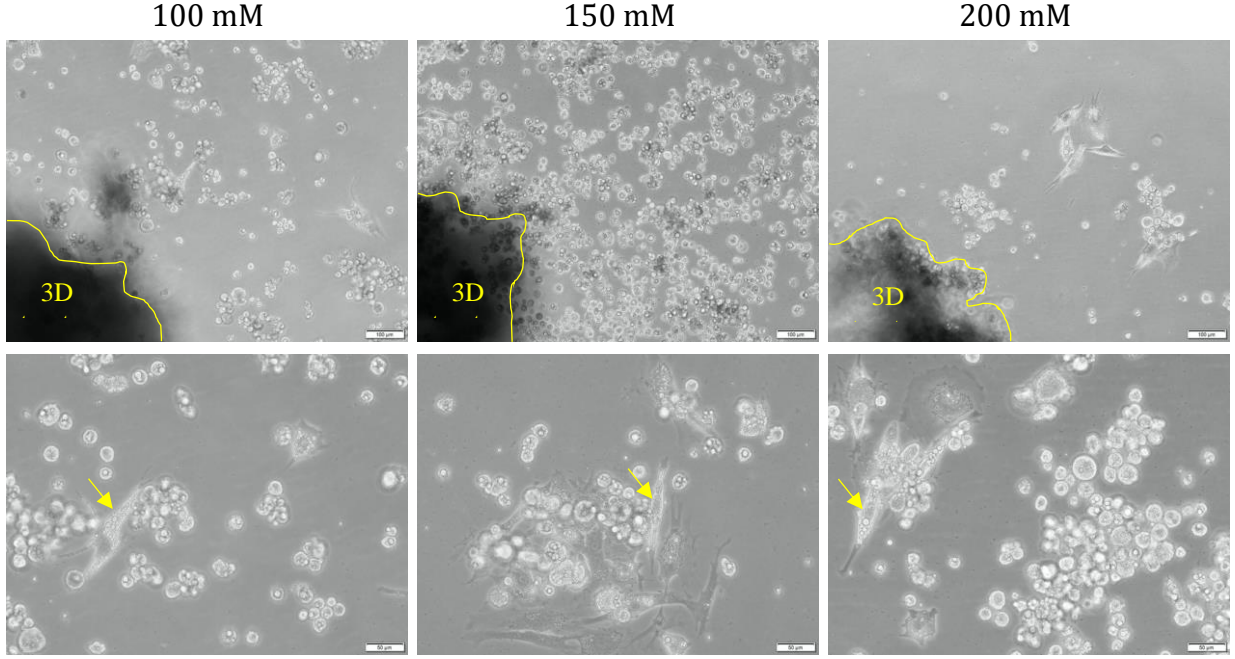
kümelerin kenarlarından ayrıldığı gözlemlenmiştir. Ana hücresele kümeden ayrılan hücrelerin çoğu süspansiyon halinde iken, bazı lipit içeren hücrelerin kültür yüzeyine tutunarak yayıldığı gözlemlenmiştir. Kültürün sonunda Calcein-AM boyama ile hücrelerin canlılığı test edilerek 3 boyutlu kümedeki çoğu hücrenin canlı olduğunu gösterilmiştir (**Şekil 17 (C) ve Şekil 19**). Ayrıca 24 saat boyunca farklı Gd^{3+} konsantrasyonlarında ayrı ayrı oluşturulan 3 boyutlu adiposit kümelerinin yine aynı Gd^{3+} içeriğindeki besi ortamında birlikte-levitasyonu test edilmiştir (**Şekil 20**). Hücresele kümeler levitasyonun 24. saatinde sistemdeki manyetik kuvvet sayesinde bütünleşik görünüm sergilemesine rağmen, kültür kabına aktarıldığında kümeler arasında hala bir füzyon olmadığı ve aktarım işlemi sebebiyle kümelerin dağıldığı gözlemlenmiştir.

Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon sistemi ayrıca meme kanseri hücrelerinden oluşan 3 boyutlu yapıların biyofabrikasyonu için de test edilmiştir. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri levitasyon aracılığıyla 3 boyutlu yapılar oluşturmak amacıyla 150 ve 200 mM Gd^{3+} içeren besi ortamlarında 24 saat kültürlenmiştir (**Şekil 17 (D)**). Levitasyon kültürünün 2. saatinde, paramanyetik besi ortamında bulunan hücrelerin bulanık bir görünüm sergileyerek kümelenmeye başladığı gözlemlenmiştir. Kültürün 24. saatinde sıkıca paketlenmiş $1.37 \pm 0.17 \text{ mm}^2$ alana sahip 3 boyutlu hücresele kümelerin olduğu görülmüştür (**Şekil 17 (E)**). 150 mM Gd^{3+} içeren besi ortamında oluşan 3 boyutlu yapıların yatay çapının ~%39, çevresinin ~%22 oranında 200 mM Gd^{3+} içeren ortamda oluşan kümelerden yüksek olduğu görülmüştür.

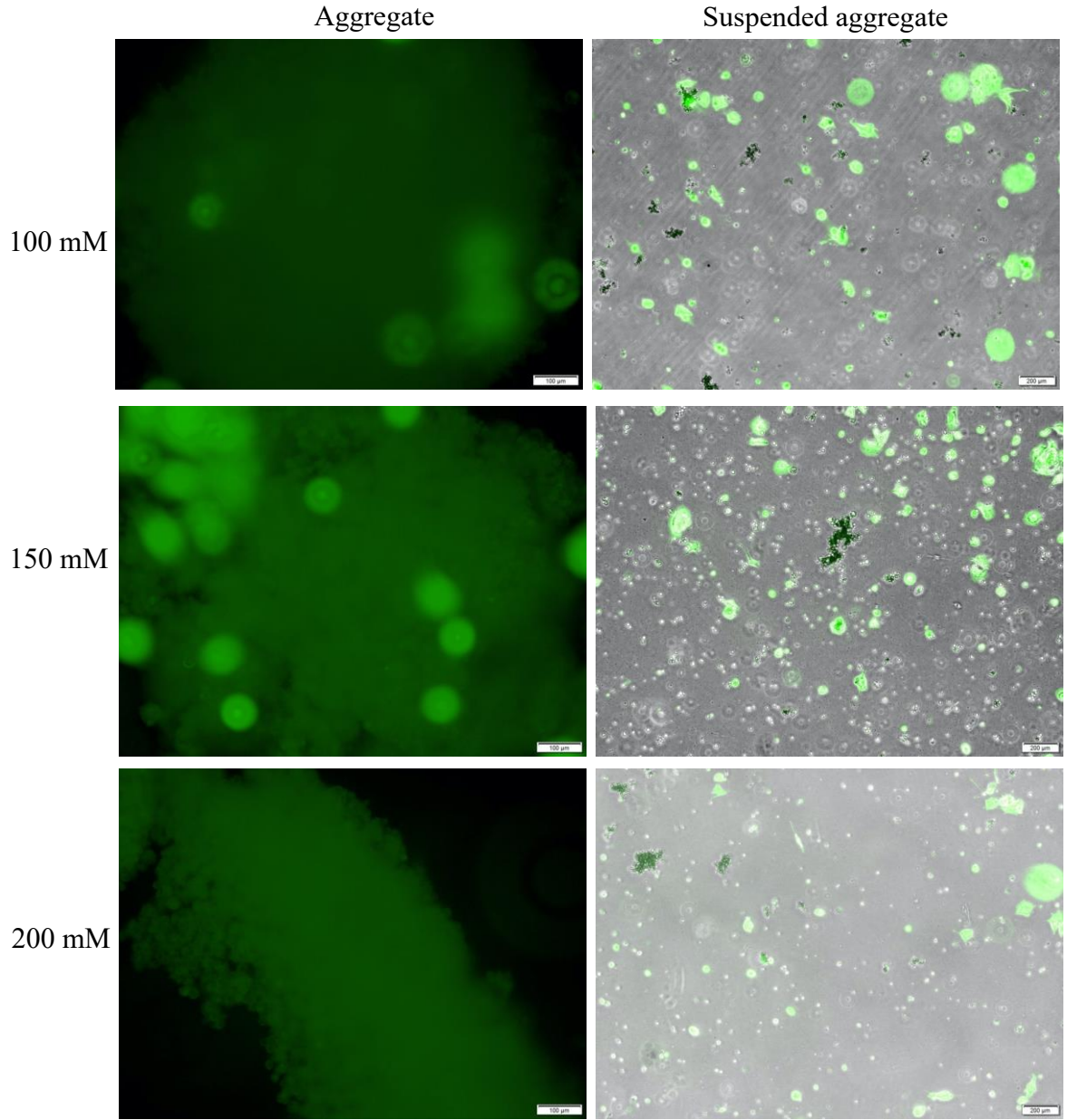


Şekil 17. Farklı hücre tiplerinin levitasyon tabanlı 3 boyutlu kültürü. (A) Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon (0, 100, 150 ve 200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 200 μ L) ile 2 veya 24 saat kültürlenmiş adipositlerin mikrografları. Adipositler levitasyon öncesi 7F2 hücrelerinin adipojenезinin tetiklenmesi ile elde edilmiştir. Dikey ölçekte her birim: 1 mm. Ölçek çubuğu: 1 mm. (B) Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca kültürlenmiş adiposit kümelerinin boyutu (yatay çap, dikey çap, alan ve çevre). (C) Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca kültürlenmiş adiposit kümelerinin floresan mikroskopi görüntüleri. Hücre canlılığı canlı boyama (Calcein-AM) ile görüntülenmiştir. Ölçek çubuğu: 200 μ m. (D) Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik

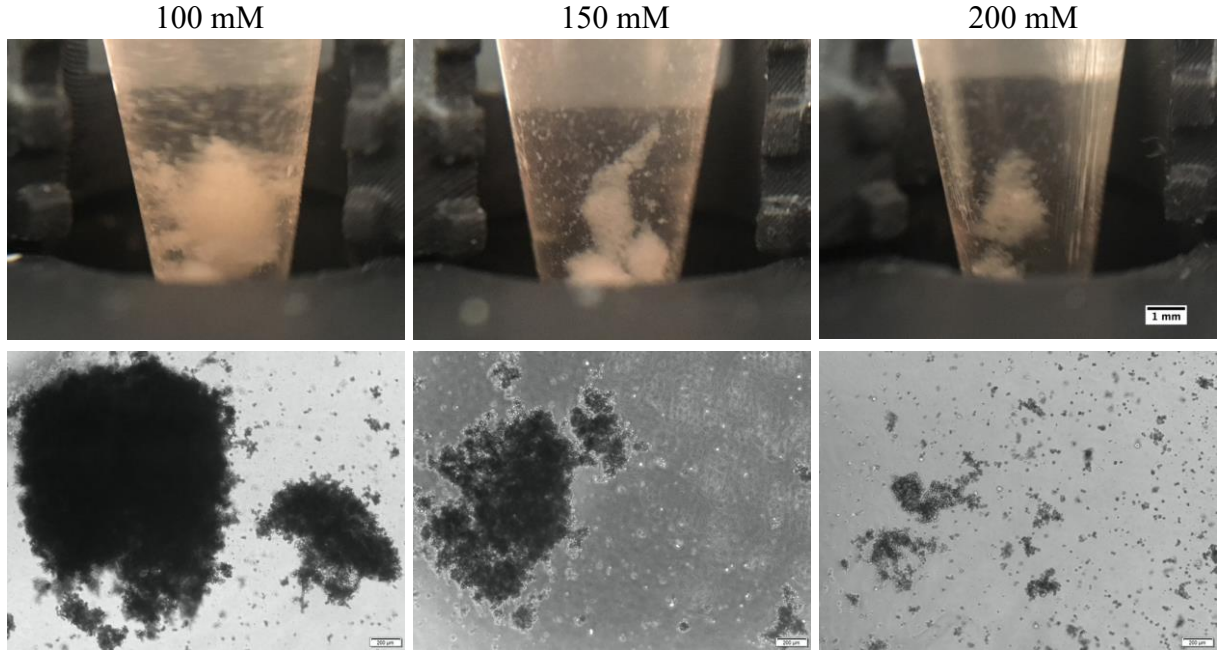
levitasyon (0, 150 ve 200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 200 μ L) ile 2 veya 24 saat boyunca kültürlenmiş MDA-MB-231 hücrelerinin mikrografları. Ölçek çubuğu: 1 mm. (E) Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca kültürlenmiş MDA-MB-231 hücresel kümelerinin boyutu (yatay çap, dikey çap, alan ve çevre). Veriler, hata çubuklarıyla (\pm SD) tekrarların ortalaması olarak çizilmiş ve istatistiksel anlamlılık Student's t-testi (two tail) ile belirlenmiştir. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.



Şekil 18. Halkalı mıknatıs tabanlı manyetik levitasyon (100, 150 ve 200 mM Gd^{3+} , 10^6 hücre/ml, 200 μ L) ile 24 saat kültürlenmiş ardından standart kültür kabına aktarılarada burada da 24 saat kültürü sürdürülmüş adipozitlerin mikrografları. Görüntülerdeki 3B yapıların sınırları sarı çizgilerle ile kabaca çizilmiştir. Oklar, kültür yüzeyine yayılmış lipit içeren hücre örneklerini göstermektedir. Ölçek çubukları: üst fotoğraflar için 100 μ m ve alt fotoğraflar için 50 μ m.



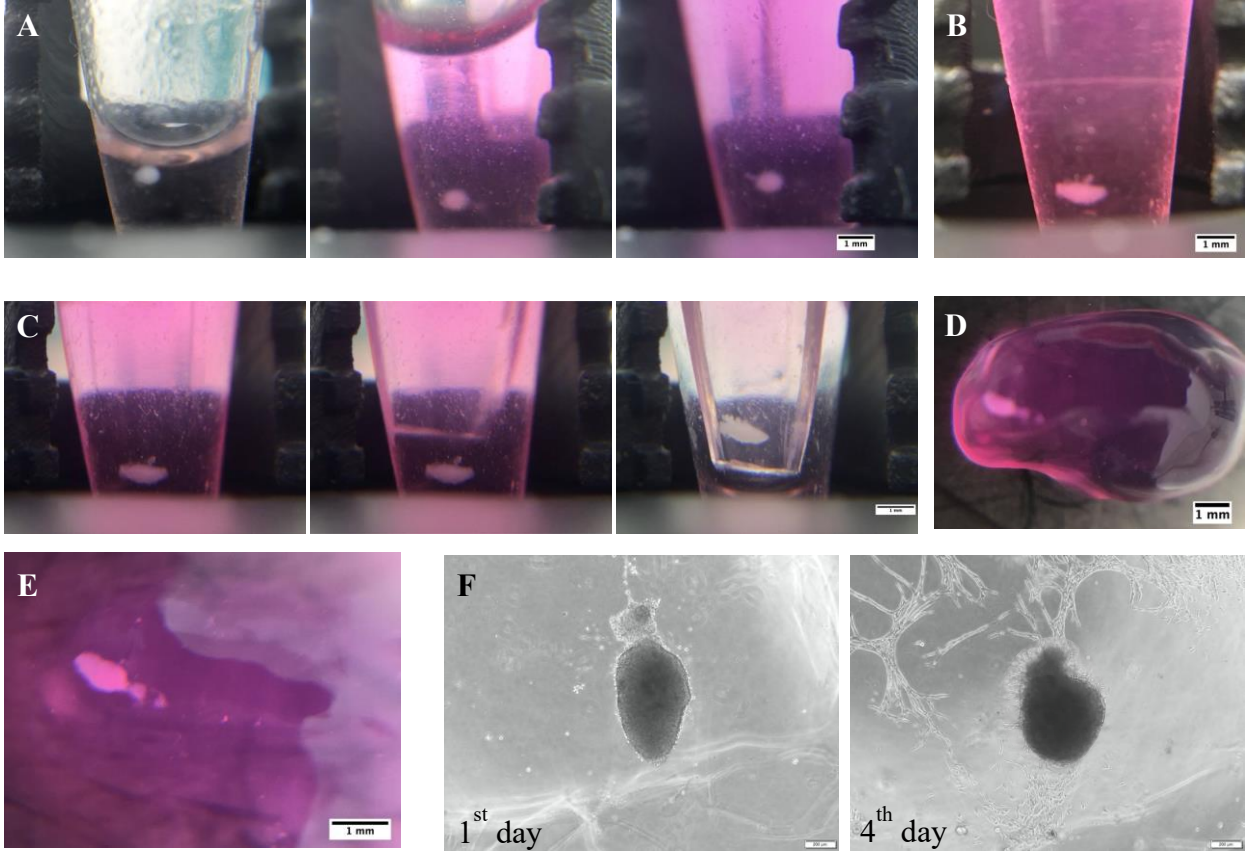
Şekil 19. Manyetik levitasyon ile 24 saat boyunca kültürlenmiş adiposit kümelerinin ve 3 boyutlu yapılardan ayrıştırılan tekil hücrelerin floresan mikroskopi görüntüleri. Hücre canlılığı canlı boyama (Calcein-AM) ile görüntülenmiştir. Ölçek çubukları: Soldaki fotoğraflar için 100 μ m ve sağdaki fotoğraflar için 200 μ m.



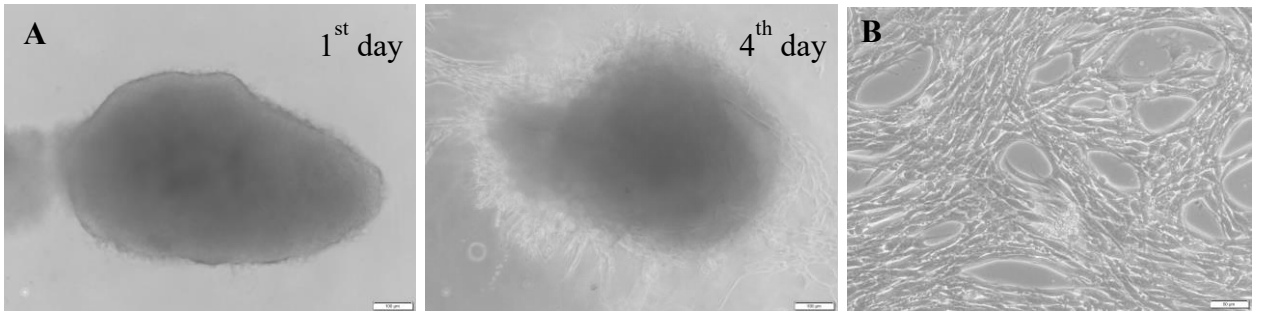
Şekil 20. Manyetik levitasyon sisteminde 100, 150 ve 200 mM Gd^{3+} konsantrasyonlarında 24 saatlik kültür sonucunda ayrı ayrı oluşturulan ikişer 3 boyutlu adiposit kümesinin yine aynı Gd^{3+} içeriğindeki besi ortamlarında birlikte-levitasyon kültürü. Dikey ölçekte her birim: 1 mm. Ölçek çubukları: Kültür odası görüntüleri için 1 mm, mikroskop görüntüleri için 200 μm .

3.5 Manyetik levitasyon ile oluşturulmuş 3 boyutlu yapıların jel-içi kültürü

Matriks içerisine gömülmüş 3 boyutlu modeller ilaç yanıtı, hücre göçü ve stromal etkiler gibi birçok araştırma sahasında etkili bir şekilde uygulanmaktadır. Manyetik levitasyon ile oluşturulan Manyetik levitasyon ile oluşturulmuş 3 boyutlu yapıların da jel içi bir kültüre mekanik olarak bozulmadan ve tamamen jel ile sarılarak aktarılabilişliğini ve kültürün sürdürülebilirliğini göstermek hedeflenmiştir. D1 ORL UVA hücreleri 24 saat boyunca levitasyona ile kültürlenmiş ve kültürün sonunda oluşan 3 boyutlu yapılar Matrigel'e gömülmüştür (**Şekil 21 (A), (B)**). Jel içine gömme işleminde önce 3 boyutlu yapının levitasyonunu sürdürmeye yetecek kadar besi ortamı (~20 μl) bırakarak besi ortamının çoğunu kültürden uzaklaştırılmıştır, ardından Matrigel levitasyon sistemine yavaşça eklenmiştir. Eklenen Matrigel hacmi, üzerine eklendiği besi ortamı hacminin beş katı olacak şekilde uygulama gerçekleştirilmiştir. Matrigel aktarımı sıvı formunu korumak amacıyla +4 ° C'de gerçekleştirilmiş ve ekleme tamamlandıktan sonra kültür oda sıcaklığına alınarak sıcaklık değişimi ile jelleşme sağlanmıştır. Levite hücresel yapıların, herhangi bir gözlemlenebilir deformasyon olmaksızın Matrigel içine başarılı bir şekilde aktarılacağı görülmüştür. Daha sonra jel matriks içerisine gömülmüş hücresel yapı ayrı bir kültür kabına aktarılmış ve kültürü sürdürülmüştür (**Şekil 21 (C) - (E)**). Kültürün 4. gününde, 3 boyutlu hücresel yapının jel matriks içinde yayıldığı gözlemlenmiştir (**Şekil 21 (F) ve (D), Şekil 22**).



Şekil 21. Manyetik levitasyon kültüründe oluşturulmuş D1 ORL UVA 3 boyutlu yapılarının jel içi kültürü. (A) Manyetik levitasyon ile oluşmuş bir 3 boyutlu hücresel yapının Matrigel içerisine gömülmesi. (B) Kültürün 3. saatinde Matrigel'de hücresel küme. (C) Mikro kaşık şeklinde kesilmiş bir pipet ucu kullanılarak jele gömülü 3 boyutlu kümenin hasat edilmesi. (D-E) Standart bir kültür kabına aktarılmış Matrigel'e gömülü bir 3 boyutlu küme. (D) Kültür idamesi için Matrigel üzerine besi ortamı eklenmeden önceki, (E) eklendikten sonraki görüntü. Dikey ölçekte her birim: 1 mm. Ölçek çubuğu: 1 mm. (F) Matrigel'e gömülü 3 boyutlu kümenin 1 ve 4 günlük kültürden sonra mikrografları. Ölçek çubuğu: 200 μ m.



Şekil 22. Matrigel'e gömülü 3 boyutlu D1 ORL UVA kümesinin (A) 1 ve 4 günlük kültürden sonra görüntüsü ve (B) 4 gün sonra Matrigel'de yayılmış hücrelerin görüntüsü. Ölçek çubukları: (A) için 100 μ m ve (B) için 50 μ m.

3.6 Manyetik levitasyon kültürlerinden mRNA eldesi

Manyetik levitasyon kültürü sonucunda elde edilen kültürlerde gen seviyesinde değişimlerin incelenebilmesi için öncelikle manyetik levitasyonda kültürlenen hücre gruplarından mRNA elde edilmesi gerekmektedir. Daha önce, 50 µl kültür hacmine sahip mikrokapiler manyetik levitasyon düzeneğinde kültürlenen hücrelerden; hücre sayısı, kültür süresi, besi ortamı tazeleme sıklığı ve havuzlama sayısı geniş aralıklarda değiştirilerek test edilmesine rağmen başarıyla mRNA eldesinin gerçekleştirilemediği grubumuz tarafından gösterilmiştir. Bunu sebebi olarak mRNA eldesi için yeterli miktarda hücre toplamak amacıyla hücre sayısı arttırıldığında nispeten küçük hacimli kültür ortamının hücrelerin sağlıklı idamesi için yeterli olmaması olarak görülmüştür. Ayrıca besi ortamı tazeleme işleminin bu nispeten küçük kültür kabı boyutlarında zorlayıcı ve hücrelerin bütünlüğünü bozabilen bir süreç olduğu anlaşılmıştır. Bu projede uygulamaya alınan büyük ölçek manyetik levitasyon cihazında kültürlenen hücrelerden mRNA izole edilip edilemeyeceğini test etmek için ise, D1 ORL UVA hücreleri 200 mM Gd³⁺ içeren besi ortamında süspansiyon edilerek 200,000 hücre/kültür kabı yoğunluğu ile manyetik levitasyon cihazına yüklenmiş ve 48 saat süreyle kültürlenmiştir. Kültür süresi sonunda 3 örnek havuzlanarak hücre miktarının arttırılması hedeflenmiştir. Sonuçlara göre izole edilen mRNA miktarının ve saflığının RT-PCR için uygun olduğu görülmüş ve housekeeping gen (GAPDH) ve örnek olarak seçilen osteojenik genlerin (Runx2, OCN) ifadesi RT-PCR ile test edilmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre tüm test edilen genler 30 altı döngüde gözlemlenmiştir (**Tablo 3**). Bu sonuç göstermiştir ki bu projede tasarlanan, üretilen ve faaliyete alınan mikroakışkan esaslara dayanmayan daha büyük hacimde olan halkalı miknatıs tabanlı manyetik levitasyon düzeneği levitasyon ile oluşturulan biyolojik yapılarda gen düzeyinde incelemelere olanak sağlayabilmektedir.

Tablo 3. Manyetik levitasyon (200 mM Gd³⁺) ile standart büyüme ortamında ya da osteojenik farklılaştırma ortamında 48 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin (ekim sayısı: 200,000 hücre/kültür kabı) RT-PCR sonuçları.

Uygulama	Havuzlama	260 nm'de pik	Döngü		
Büyüme ortamı	3	✓	GAPDH: 22.44	Runx2: 29.04	OCN 29.61
Osteojenik farklılaştırma ortamı	3	✓	GAPDH: 20.04	Runx2: 31.15	OCN 29.96

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Manyetik kuvvet tabanlı hücre manipülasyonu biyolojik ve klinik araştırmalarda ve doku mühendisliğinde kullanılan önemli bir tekniktir. Hücrelerin manyetik etiketler ile etiketlenmesini gerektirmeyen manyetik levitasyon protokollerinin oluşturulması operasyon için gerekli maliyeti, iş gücünü, operasyon süresini azaltmış ve sistemin canlı hücreler için biyoyumluluğunu ve tekrarlanabilirliğini arttırmıştır. Önceleri hücre ayırımı için uygulanan teknik daha sonra biyofabrikasyon uygulamalarına uyarlanmış ve uygulama alanı genişletilmiştir. Biyofabrikasyon için şimdiye kadar uygulanan manyetik levitasyon düzenekleri her ne kadar önemli gelişmeler kaydetmiş olsa da çeşitli doku mühendisliği uygulamaları ve biyolojik testler için gerekli hücre sayısını sağlayabilmek için nispeten daha büyük (milimetre boyutunda) canlı yapıların oluşturulmasını sağlayabilen sistemlere gereksinim oluşmuştur. Bu proje ile beraber hücrelerin manyetik etiketlenmesini gerektirmeyen bir büyük ölçekli manyetik levitasyon protokolü oluşturulmuş ve milimetre-ölçekli 3 boyutlu canlı yapıların biyofabrikasyonu için uygulanmıştır. Proje ile beraber:

1) Daha önce çeşitli cisimlerin özkütle temelli ayrıştırılması için uygulanmış halkalı mıknatıs tabanlı levitasyon sistemi ilk defa biyofabrikasyon için uyarlanmış ve canlı yapıların uzun süre kültürü için uygunluğu test edilmiştir. Teknikler İYTE Biyomühendislik Bölümü bünyesinde içselleştirilmiştir. Proje sürecinde manyetik levitasyon teknikleri ile ilgili içselleştirilen deneyimin uluslararası bir dergide yayınlanması ve bilimsel birikime aktarılması için ilgili makale hazırlanma aşamasındadır.

2) Diamanyetik levitasyon amacıyla genellikle kullanılan sistemler iki mıknatıs arasına yerleştirilmiş kapiler bir hazne içerisinde kültür sağlayabilmektedirler. Bu sistemler her ne kadar büyük hücresel blokların (~2.68 cm uzunluğa kadar) üretimine olanak sağlasa da yapıların kalınlıkları az olduğu için (~280 µm kalınlığa kadar) transfer edilebilir mekanik dayanıklılıktan yoksundurlar ve kapiler haznenin kenarlarına doğru kalınlaşmalar gösterebilen homojen olmayan yapılar oluşabilmektedir (Anil-İnevi vd., 2018). Daha büyük blok mıknatıslar arasında nispeten büyük hacimde haznelerde gerçekleştirilebilen levitasyon sistemleri de üretilmiştir fakat bu sistemler de kültür haznesinin altını ve üstünü işgal eden kültüre yerinde müdahaleyi zorlaştıran mıknatıslar içermektedir (Tasoglu vd., 2015b). Proje çıktılarında bu fiziksel engeli kaldıran ve böylece biyolojik yapılara ve onu çevreleyen besi ortamına erişim ve müdahaleyi mümkün kılan bir manyetik levitasyon düzeneği oluşturulmuştur. Ayrıca bu düzende kullanılacak hücre kültürü haznesi için yükseklik limiti de ortadan kalmıştır.

3) Proje çıktılarında halkalı mıknatıs tabanlı levitasyon sistemi farklı özkütlelere sahip hücre tiplerinin levitasyonu için başarıyla uygulanmıştır. Öncelikle canlı hücrelerin sergilediği özkütle

aralığı için levitasyonu hücre sağlığı açısından riskli olmayan Gd^{3+} konsantrasyonları ile mümkün kıldığı özkütlesi bilinen parçacıkların levitasyonu gerçekleştirilerek gösterilmiştir. Farklı özkütlerde hücre tipleri (kök hücre, adiposit ve meme kanseri hücreleri) için levitasyon protokolleri de proje kapsamında oluşturulmuştur. Manyetik levitasyon sırasında gözlemlenen hücrelerin hücre dışı matristen bağımsız kendilerini birleştirme kapasitesi (self-assembly) ve bu kapasitenin her hücre tipi için farklılık göstermesi doku mühendisliğinde üç boyutlu hücre kültürü uygulamaları için kullanılabilir yeni bir yöntem olarak gösterilmiştir.

4) Manyetik levitasyon sağlayan Gd^{3+} bileşenli kontrast ajanının farklı hücre tiplerinin halkalı mıknatis tabanlı levitasyon düzeneğinde levitasyonu ve kümelenmesi için gerekli konsantrasyonu ilk kez gösterilmiştir. Bu çalışmalar sırasında levitasyonu sağlayan Gd^{3+} ajanı için test edilen dozların ilerleyen zamanlarda gerçekleştirilecek çalışmalar için önemli bir referans kaynağı olacağı düşünülmektedir.

5) Proje çıktılarında farklı tip hücreler manyetik levitasyonla oluşturulan ağırlıksız alanda uzun süre kültürlenmişlerdir. Bu hücrelerin deney sonunda canlılıklarını korudukları direk ve indirek testlerle gösterilmiştir. Ayrıca düzenekte hücresel blokların füzyonunun gerçekleştirilebileceği ve daha karmaşık ve büyük biyolojik yapıların üretimine olanak sağlayabileceği raporlanmıştır. Bu sonuçlar, biyofabrikasyon için oldukça pratik, ucuz ve gözleme izin veren bir alternatif yöntemin literatürde ilk kez gösterilmesini sağlamıştır.

6) Proje çıktılarında levitasyon ile oluşturulan kompakt hücresel kümelerin levitasyon esnasında faz geçişi sıcaklık ile kontrol edilen bir matriks ile sarılması aracılığıyla jel içi kültüre kolaylıkla aktarılabilirdiği gösterilmiştir. Manyetik levitasyon kültür ürününün jel matriks ile sarılabilmesinin, düzeneğin ilaç yanıtı, hücre göçü ve stromal etki gibi çeşitli çalışmalarda etkin bir şekilde uygulanabilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

7) Proje çıktılarında, halkalı mıknatis tabanlı levitasyon sisteminin hücrelerden çalışılabilir mRNA izolasyonu için yetersiz kalan küçük hacimli levitasyon sistemlerinin aksine gen ifadesi düzeyinde çalışmalar için uygun oluşu gösterilmiştir.

Proje sonuçları ile beraber, biyofabrikasyon için hücrelerin uzaktan manipülasyonunu sağlayan halkalı mıknatis tabanlı bir manyetik levitasyon düzeneği oluşturulmuş ve ilgili düzenekte hücre kültürü için çeşitli protokoller tanımlanmıştır. Kullanılan yöntemin hücreler için toksik olmaması, manyetik alan ve besi ortamı özellikleri ile levitasyonun kolaylıkla manipüle edilebilmesi proje sırasında oluşturulan platformların kolay kurulan ve ucuz bileşenlere sahip olması özellikle kaynak kısıtlı araştırma süreçlerine oldukça ciddi avantajlar sağlamaktadır. İlerleyen projelerde, bu projede kullanılan sistemin karmaşık hücresel desenlerin oluşturulması, hedef



odaklı kapasitesinin geliştirilmesi, otomatizasyonu ve çeşitli biyolojik hipotezlerin test edilmesi için uygulanması gündeme gelecektir.

5. KAYNAKLAR

- Anil-Inevi, M., Yaman, S., Yildiz, A.A., Mese, G., Yalcin-Ozuysal, O., Tekin, H.C. and Ozcivici, E., 2018. "Biofabrication of in situ self assembled 3D cell cultures in a weightlessness environment generated using magnetic levitation". *Scientific reports*, 8(1), p.7239.
- Čemažar, J., Douglas, T.A., Schmelz, E.M. and Davalos, R.V., 2016. "Enhanced contactless dielectrophoresis enrichment and isolation platform via cell-scale microstructures". *Biomicrofluidics*, 10(1), p.014109.
- Durmus, N.G., Tekin, H.C., Guven, S., Sridhar, K., Yildiz, A.A., Calibasi, G., Ghiran, I., Davis, R.W., Steinmetz, L.M. and Demirci, U., 2015. "Magnetic levitation of single cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(28), pp.E3661-E3668.
- Eriksson, E., Scrimgeour, J., Granéli, A., Ramser, K., Wellander, R., Enger, J., Hanstorp, D. and Goksör, M., 2007. "Optical manipulation and microfluidics for studies of single cell dynamics". *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 9(8), p.S113.
- Fachin, F., Spuhler, P., Martel-Foley, J.M., Edd, J.F., Barber, T.A., Walsh, J., Karabacak, M., Pai, V., Yu, M., Smith, K. and Hwang, H., 2017. "Monolithic chip for high-throughput blood cell depletion to sort rare circulating tumor cells". *Scientific reports*, 7(1), p.10936.
- Gauthier, M., Lambert, P. and Régnier, S., 2013. "Microhandling and micromanipulation strategies". *Microrobotics for Micromanipulation*, pp.179-242.
- Ge, S. and Whitesides, G.M., 2018. "Axial" Magnetic Levitation Using Ring Magnets Enables Simple Density-Based Analysis, Separation, and Manipulation. *Analytical chemistry*, 90(20), pp.12239-12245.
- Gossett, D.R., Weaver, W.M., Mach, A.J., Hur, S.C., Tse, H.T.K., Lee, W., Amini, H. and Di Carlo, D., 2010. "Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems". *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8), pp.3249-3267.
- Guo, F., Mao, Z., Chen, Y., Xie, Z., Lata, J.P., Li, P., Ren, L., Liu, J., Yang, J., Dao, M. and Suresh, S., 2016. "Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(6), pp.1522-1527.
- Huang, W.H., Ai, F., Wang, Z.L. and Cheng, J.K., 2008. "Recent advances in single-cell analysis using capillary electrophoresis and microfluidic devices". *Journal of Chromatography B*, 866(1-2), pp.104-122.

- Lee, W., Tseng, P. and Di Carlo, D. eds., 2017. *Microtechnology for cell manipulation and sorting*. New York, NY, USA: Springer.
- Lenshof, A., Johannesson, C., Evander, M., Nilsson, J. and Laurell, T., 2017. "Acoustic Cell Manipulation". In *Microtechnology for Cell Manipulation and Sorting* (pp. 129-173). Springer, Cham.
- Mirica, K.A., Ilievski, F., Ellerbee, A.K., Shevkopyas, S.S. and Whitesides, G.M., 2011. "Using Magnetic Levitation for Three Dimensional Self-Assembly". *Advanced Materials*, 23(36), pp.4134-4140.
- Mirica, K.A., Phillips, S.T., Mace, C.R. and Whitesides, G.M., 2010. "Magnetic levitation in the analysis of foods and water". *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(11), pp.6565-6569.
- Mishriki, S., Fattah, A.A., Kammann, T., Sahu, R.P., Geng, F. and Puri, I.K., 2019. "Rapid Magnetic 3D Printing of Cellular Structures with MCF-7 Cell Inks". *Research*, 2019, p.9854593.
- Place, E.S., George, J.H., Williams, C.K. and Stevens, M.M., 2009. "Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering". *Chemical society reviews*, 38(4), pp.1139-1151.
- Rodríguez-Villarreal, A.I., Tarn, M.D., Madden, L.A., Lutz, J.B., Greenman, J., Samitier, J. and Pamme, N., 2011. "Flow focussing of particles and cells based on their intrinsic properties using a simple diamagnetic repulsion setup". *Lab on a Chip*, 11(7), pp.1240-1248.
- Sarigil, O., Anil, M., Yilmaz, E., Mese, G., Tekin, H.C. and Ozcivici, E., 2019. "Label-free density-based detection of adipocytes of bone marrow origin using magnetic levitation". *Analyst*, 144, pp. 2942 – 2953.
- Singh, M.R., Patel, S. and Singh, D., 2016. "Natural polymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering". In *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering* (pp. 231-260). William Andrew Publishing.
- Shimizu, K., Ito, A., Arinobe, M., Murase, Y., Iwata, Y., Narita, Y., Kagami, H., Ueda, M. and Honda, H., 2007. "Effective cell-seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering". *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(5), pp.472-478.

- Souza, G.R., Molina, J.R., Raphael, R.M., Ozawa, M.G., Stark, D.J., Levin, C.S., Bronk, L.F., Ananta, J.S., Mandelin, J., Georgescu, M.M. and Bankson, J.A., 2010. "Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation". *Nature nanotechnology*, 5(4), p.291.
- Tasoglu, S., Khoory, J.A., Tekin, H.C., Thomas, C., Karnoub, A.E., Ghiran, I.C. and Demirci, U., 2015a. "Levitational image cytometry with temporal resolution". *Advanced Materials*, 27(26), pp.3901-3908.
- Tasoglu, S., Yu, C. H., Liaudanskaya, V., Guven, S., Migliarese, C. and Demirci, U. 2015b. "Magnetic levitational assembly for living material fabrication" *Advanced healthcare materials* 4 1469-76.
- Yaman, S., Anil-Inevi, M., Ozcivici, E. and Tekin, H.C., 2018. "Magnetic Force-Based Microfluidic Techniques for Cellular and Tissue Bioengineering". *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6.
- Zhang, C., Zhao, P., Gu, F., Xie, J., Xia, N., He, Y. and Fu, J., 2018. "Single-ring magnetic levitation configuration for object manipulation and density-based measurement". *Analytical chemistry*, 90(15), pp.9226-9233.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ENGİN ÖZÇİVİCİ
Proje No:	119M755
Proje Başlığı:	Halkalı Neodmiyum Miknatisla Hücresel Manyetik Levitasyon Tekniği Geliştirilmesi ve Uygulaması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. BİYOMÜHENDİSLİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2019 - 01/11/2020
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29991.24
Öz:	<p>Manyetik levitasyon hücresel ve doku düzeyinde biyomühendislik uygulamalarında hücrelerin uzaktan manipülasyonu için önemli bir teknolojidir. Mevcut diamanyetik levitasyon tasarımlarının çoğu, sistemin çalışma hacmini ve uygulanabilirliğini sınırlayan aynı kutupları birbirine dönük iki blok miknatis arasında bir levitasyon haznesi içermektedir. Bu projede, biyofabrikasyon uygulamalarında kullanılmak üzere bu fiziksel sınırlamaları ortadan kaldırmak için halkalı miknatis tabanlı bir manyetik levitasyon sistemi oluşturulmuştur. Projede tanımlanan bu konfigürasyon, levitasyon sırasında besi ortamı veya hücrelerin sisteme transfer edilebilmesini ve sistemden uzaklaştırılabilmesini, yüksekliğinden bağımsız olarak kültür haznesi kullanılabilmesini ve böylelikle büyük boyutlu canlı yapıların üretilbilmesini ve kültürün sürdürülebilmesini mümkün kılmıştır. Biyofabrikasyon çalışmalarından önce, sistemin canlı hücrelerin levitasyonu için özkütleleri açısından uygunluğu polimerik parçacıklar ile gösterilmiştir. Sistemin manyetik odaklama fonksiyonu ve hücrelerin kendi kendine bir araya gelme özelliğinden yararlanarak düzende milimetre boyutunda 3 boyutlu canlı yapılar oluşturulmuş ve kültürleri cihaz içerisinde sürdürülmüştür. Burada uygulamaya sunulan manyetik levitasyon cihazı, açık bir operasyon alanı sağlaması sebebiyle kültüre levitasyon esnasında ve kolay müdahale olanağı sunmuştur. Proje kapsamında besi ortamındaki paramanyetik iyon konsantrasyonunu değiştirerek farklı özkütlelere sahip hücre tiplerinin (kök hücre, adiposit ve kanser hücresi) levitasyonu ve 3 boyutlu yapı oluşumu için manyetik levitasyon protokolleri oluşturulmuştur. Hücrelerin levitasyonu için gereken paramanyetik iyon konsantrasyonunun ise besi ortamın özkütlesinin artırılması ile azaltılabileceği gösterilmiştir. Hücre sağlığı açısından zararsız olduğu proje çalışmasında gösterilmiş olan bu teknik, ayrı ayrı oluşturulmuş 3 boyutlu canlı birimlerinin daha karmaşık yapılar üretmek üzere birleşmesine de olanak sağlamıştır. Ayrıca proje çıktılarında, halkalı miknatis tabanlı levitasyon sisteminin hücrelerden çalışılabilir mRNA izolasyonu sağlayabildiği ve gen ifadesi düzeyinde çalışmalar için uygun olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, projede oluşturulan manyetik levitasyon sistemi doku mühendisliği, ilaç testi ve kanser araştırmaları gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanım alanı bulabilecektir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Biyofabrikasyon, Manyetik Levitasyon, Canlı hücreler, Hücresel sferoidler, Gadolinium
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır