

**Manyetik Levitasyon Yöntemiyle Kemik Hücrelerinin
Ağırlıksız Ortamda Kültürlenmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 215S862

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Engin ÖZÇİVİCİ

Araştırmacı:

Dr. Öğr. Üye. Ahu ARSLAN YILDIZ

Danışman:

Dr. Öğr. Üye. Hüseyin Cumhur TEKİN

Bursiyer(ler):

Öykü SARIGİL

Melike KIZILKAYA

Melike ÇAĞAN

HAZİRAN 2019

İZMİR



ÖNSÖZ

Bu projede kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücrelerin manyetik levitasyon yöntemi ile oluşturulan ağırlıksız ortamda tasnifi ve kültürü üzerine kurgulanan deneysel çalışmalar mikroakışkan tabanlı sistemler geliştirilerek yapılmıştır. Sonuçlar ağırlıksız ortamın kemik iliği kaynaklı hücrelerin doku iskelesinden bağımsız üretimi ve tekil hücrelerin özkütlelerine göre tasnif ve algılanması açısından oldukça etkin bir kullanım sağladığını göstermiştir.

Bu proje TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu (SBAG) tarafından desteklenmiş ve Doç. Dr. Engin Özçivici yürütücülüğünde tamamlanmıştır. Projenin yürütülmesi sırasında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü'nden Dr. Öğr. Üye. Ahu Arslan Yıldız araştırmacılık, Dr. Öğr. Üye. Hüseyin Cumhur Tekin danışmanlık görevi üstlenmişlerdir. Proje desteği ve bulguları, projede bursiyer olarak çalışan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik programına kayıtlı Ar. Gör. Müge Anıl-İnevi'nin doktora, Öykü Sarıgil'in, Melike Çağan'ın ve Melike Kızılkaya'nın yüksek lisans 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 Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Doç. Dr. Özden Yalçın Özuysal ve 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 2 adet uluslararası makale, 1 adet uluslararası derleme makalesi, 1 adet uluslararası kitap bölümü, ve 2 si tam metin olmak üzere 5 adet bildiri yayınlanmıştır.

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1 Mekanik kuvvetlerin biyolojik sistemler üzerinde etkileri	2
2.2 Kemik mekanobiyolojisi.....	2
2.3 Ağırksız ortam biyolojisi.....	4
2.4 Manyetik levitasyon.....	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM	8
3.1 Manyetik Prensipler	8
3.2 Hücre kültürü	10
3.3 Manyetik levitasyon ile hücre ayrıştırılması	10
3.4 Manyetik levitasyon ile hücre kültürü.....	11
3.5 mRNA ifade analizleri.....	11
3.6 Hücre çoğalması ve hücre sağlığı deneyleri.....	12
3.7 PI boyaması ve akış sitometrisi ile hücre döngüsü analizleri	12
4. BULGULAR	13
4.1 Manyetik levitasyon cihazının dizaynı ve üretilmesi.....	13
4.2 Projede kullanılan hücre tiplerinin karakterizasyonu	16
4.3 Manyetik levitasyonun mikroakışkan kanalda doğrulanması	18
4.4 Gadavist ajanı ile manyetik levitasyon deneyleri	19



4.5 Diğer MRI kontrast ajanları ile manyetik levitasyon deneyleri	22
4.6 Manyetik levitasyon için kullanılan ajanların hücre canlılığına etkisi	27
4.7 Ortam sıcaklığının manyetik levitasyona etkisi	32
4.8 Manyetik levitasyon ile uzun süreli hücre kültürü.....	32
4.9 Manyetik levitasyon ile hücre kültürünün hücre canlılığına etkisi	40
4.10 Manyetik levitasyon kültürlerinden mRNA eldesi	42
4.11 Manyetik levitasyon ile biyofabrikasyon ve çok fazlı yapılar oluşturulması.....	45
4.12 Manyetik levitasyon ile kemik iliği kökenli hücrelerin özkütlerine göre ayrıştırılması	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
6. KAYNAKLAR.....	72



TÜBİTAK

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kemik iliği hücrelerinin farklılaşma mekanizmaları..	4
Şekil 2. Manyetik levitasyon deneyinin çalışma prensibi	5
Şekil 3. Manyetik levitasyon prensibi ile kan hücrelerinin birbirinden ayrılması.	6
Şekil 4. Manyetik levitasyon için kullanılan ajanın (Gadavist, Bayer) JHEsoAD1 hücreleri üzerindeki toksisitesi.....	7
Şekil 5. Paramanyetik ortam içerisinde küresel bir parçacığın üzerine etkiyen kuvvetler. (Mavi: düşük manyetik alan, kırmızı: yüksek manyetik alan)	8
Şekil 6. Manyetik levitasyon prensibi ile çalışan düzeneğin ana parçaları.....	13
Şekil 7. (a) Manyetik levitasyon düzeneğini bir araya getirecek ek parçaların üç boyutlu çizim programındaki görüntüsü; (b) Miknatısların ve kapiler kanalın monte edileceği tutucu parçanın üç boyutlu çizim programındaki görüntüsü.....	13
Şekil 8. (a) Aynaların monte edileceği ve tutucu parçalara bağlanacak ataçmanın üç boyutlu çizim programındaki görüntüsü; (b) Mikroskop yuvasına yerleştirilerek düzeneğe ile görüntü alınabilmesini sağlayacak adaptörün üç boyutlu çizim programındaki görüntüsü.....	14
Şekil 9. Parçaların destek kısımları eklenerek üç boyutlu yazdırmaya uygun hale getirilmesinde kullanılan arayüzün (PreForm) ekran görüntüsü.....	15
Şekil 10. Manyetik levitasyon düzeneğini oluşturan ek parçaların optimize edilmiş boyutları (mm cinsinden).....	15
Şekil 11. Manyetik levitasyon düzeneğinin farklı açılardan görünümü;.....	16
Şekil 12. Proje kapsamında kullanılan hücrelerin ışık mikroskobu (faz) görüntüleri	16
Şekil 13. 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plastiğe ekilen D1 ORL UVA, MC3T3 ve 7F2 hücrelerine ait 3 gün süre ile takip edilen büyüme eğrileri.	17
Şekil 14. 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plastiğe ekilen D1 ORL UVA, MC3T3 ve 7F2 hücrelerine ait 3 gün süre ile takip edilen büyüme eğrileri.	17
Şekil 15. Standard büyüme ortamı (mavi), kemik oluşturma ortamı (kırmızı) ve yağ oluşturma ortamı (yeşil) kullanılarak kültürlenmiş D1 ORL UVA, MC3T3 ve 7F2 hücrelerine ait büyüme eğrileri.	18

Şekil 16. Farklı Gadavist konsantrasyonları içeren besi ortamları ile süspanse edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğindeki 10. dakika sonundaki levitasyon görüntüleri..	19
Şekil 17. (a) Mikroskop görüntüsünün FIJI programında açılması (b) Hücreleri izole edebilmek için threshold uygulanması.	20
Şekil 18. Farklı Gadavist konsantrasyonları içeren besi ortamları ile süspanse edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğindeki 10. dakika sonundaki ortalama levitasyon konumu	20
Şekil 19. Farklı Gadavist konsantrasyonları içeren besi ortamları ile süspanse edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğindeki ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi.	21
Şekil 20. Farklı Gadavist konsantrasyonları içeren besi ortamları ile süspanse edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğinde 10. dakika sonundaki ortalama levitasyon konumlarının varyasyon katsayıları.	22
Şekil 21. Farklı konsantrasyonlarda Magnevist içeren besi ortamları ile süspanse edilen D1 ORL UVA hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki (A) ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi ve (B) 10. dakika ortalama levitasyon konumu.	23
Şekil 22. Farklı konsantrasyonlarda Omniscan içeren besi ortamları ile süspanse edilen D1 ORL UVA hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki (A) ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi ve (B) 10. dakika ortalama levitasyon konumu.	24
Şekil 23. Farklı konsantrasyonlarda Dotarem içeren besi ortamları ile süspanse edilen D1 ORL UVA hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki (A) ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi ve (B) 10. dakika ortalama levitasyon konumu.	25
Şekil 24. Farklı konsantrasyonlarda Multihance içeren besi ortamları ile süspanse edilen D1 ORL UVA hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki (A) ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi ve (B) 10. dakika ortalama levitasyon konumu.	26
Şekil 25. Farklı kontrast ajanlarını değiştiren konsantrasyonlarda içeren besi ortamları ile süspanse edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğinde 10. dakika sonundaki ortalama (A) levitasyon konumları ve (B) varyasyon katsayıları.	27
Şekil 26. Farklı kontrast ajanlarının değişen konsantrasyonlarda içeren besi ortamlarında (A) 24 ve (B) 72 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin MTT analizi sonucunda elde edilen canlılık oranları.	28

- Şekil 27. Farklı konsantrasyonlarda Gadavist ve Omniscan içeren besi ortamlarında 72 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin LIVE/DEAD assay sonucu elde edilen görüntüleri (scale bar 100µm).....29
- Şekil 28. 200 mM Gadavist içeren besi ortamlarında 72 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin LIVE/DEAD assay sonucu elde edilen görüntüleri.30
- Şekil 29. Farklı miktarlarda PBS içeren besi ortamlarında (% , hacim/hacim) 24, 48 ve 72 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin MTT analizi sonucunda elde edilen canlılık oranları. .31
- Şekil 30. D1 ORL UVA hücrelerinin 50, 100 ve 200 mM Gadavist içeren besi ortamı ile manyetik levitasyon düzeneğinde farklı sıcaklıklarda (28, 32 ve 36°C) 3 dakika levitasyonu 32
- Şekil 31. 50 mM Gadavist içeren besi ortamlarında (A) 24 ve 48 saat manyetik levitasyon düzeneği içerisinde kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin horizontal görüntüsü (kırmızı oklar hücre gruplarını göstermektedir) ve (B) 72 saat sonra kapilerin vertikal görüntüsü.33
- Şekil 32. 100 mM Gadavist içeren besi ortamlarında 24, 48 ve 72 saat manyetik levitasyon düzeneği içerisinde kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin görüntüsü.....34
- Şekil 33. 100 mM Gadavist içeren besi ortamında manyetik levitasyon düzeneği içerisinde kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin 0., 5. ve 10. saat levitasyon görüntüsü (kırmızı ok hücre seviyelerini gösterir).35
- Şekil 34. Farklı yoğunluklarda (5000, 50000 ve 500000 hücre/kapiler) hücre ekimi gerçekleştirilen D1 ORL UVA hücrelerinin 100 mM Gadavist içeren besi ortamında ve manyetik levitasyon düzeneği içerisinde 24 ve 48. saat kültür görüntüleri.....35
- Şekil 35. Farklı yoğunluklarda (5000, 50000 ve 500000 hücre/kapiler) hücre ekimi gerçekleştirilen D1 ORL UVA hücrelerinin 100 mM Gadavist içeren besi ortamında ve manyetik levitasyon düzeneği içerisinde 24 ve 48. saat kültür sonucunda oluşturduğu hücre kümeleri36
- Şekil 36. 100 mM Gadavist içeren besi ortamı ile (a) 24, (b) 72 ve (c) 120 saat kültürlenmiş (2 boyutlu; 2B) D1 ORL UVA hücrelerinin kültür görüntüleri.....38
- Şekil 37. Manyetik levitasyon ile oluşturulan (100 mM Gadavist); D1 ORL UVA hücre kümelerinin (a) 24, (b) 72 ve (c) 120 saat kültür görüntüleri.....39
- Şekil 38. Manyetik levitasyon ile oluşturulan (100 mM Gadavist, 120 saat); D1 ORL UVA hücre kümelerinin manyetik levitasyon düzeneğinin (a) içerisinde ve (b) dışarısında Calcein-AM boyaması sonucunda elde edilen görüntüleri ve (c) hücre kümelerinden elde edilen tek hücre süspansiyonunun LIVE/DEAD assay sonucu elde edilen görüntüsü.....40

- Şekil 39. 100 mM Gd^{+3} içeren besi ortamları ile süspansede edilen ve 2 boyutlu kültürde ya da manyetik levitasyon düzeneğinde (50,000 hücre/kapiler kanal) kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin 0, 2 ve 24. saatte kültür görüntüsü.....41
- Şekil 40. 100 mM Gd^{+3} içeren besi ortamları ile süspansede edilen ve 2 boyutlu kültürde ya da manyetik levitasyon düzeneğinde (50,000 hücre/kapiler kanal) kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin kültürün 0, 2 ve 24. saatte hücre döngüsü evre oranları.41
- Şekil 41. D1 ORL UVA^{eGFP} ve MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin manyetik levitasyonu sonucunda (100 mM Gadavist, 5000 hücre/kapiler); (a) levitasyon yükseklikleri (kapilerin zemininden uzaklık), (b) levitasyon görüntüleri.46
- Şekil 42. MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin 100 mM Gadavist içeren besi ortamında ve manyetik levitasyon düzeneği içerisinde 24 ve 48 saat kültür sonucunda oluşturduğu hücre kümelerinin (a) alanı, (b) çevre uzunluğu, (c) elongasyon değerleri, (d) kalınlığı (e) uzunluğu ve (f) miknatıslar arasındaki pozisyonu.....47
- Şekil 43. Farklı yoğunluklarda (toplam 5000 ve 50000 hücre/kapiler) ve farklı yükleme stratejileri (L1, L2 ve L3) kullanılarak manyetik levitasyon ile (100 mM Gadavist) kültürlenmiş D1 ORL UVA^{eGFP} (yeşil) ve MDA-MB-231^{dsRed} (kırmızı) hücrelerinin konfokal mikroskop ve floresan mikroskop (sol üst) ile elde edilmiş ko-kültür görüntüleri;48
- Şekil 44. D1 ORL UVA^{eGFP} (yeşil) ve MDA-MB-231^{dsRed} (kırmızı) hücrelerinin L1 stratejisi ile manyetik levitasyonu sonucunda oluşan bir hücre kümesinin (toplam 50000 hücre, 1:1 hücre oranı) konfokal mikroskop görüntüsü.....49
- Şekil 45. D1 ORL UVA^{eGFP} (yeşil) ve MDA-MB-231^{dsRed} (kırmızı) hücrelerinin L2 stratejisi ile manyetik levitasyonu sonucunda oluşan bir hücre kümesinin (toplam 50000 hücre, 1:1 hücre oranı) konfokal mikroskop görüntüsü.....50
- Şekil 46. D1 ORL UVA^{eGFP} (yeşil) ve MDA-MB-231^{dsRed} (kırmızı) hücrelerinin L3 stratejisi ile manyetik levitasyonu sonucunda oluşan bir hücre kümesinin (toplam 50000 hücre, 1:1 hücre oranı) konfokal mikroskop görüntüsü.....51
- Şekil 47. Farklı Gd^{3+} konsantrasyonları (15, 30 ve 50 mM) kullanılarak 10 gün boyunca adipojenik ve standart besi ortamında büyütülen 7F2 hücrelerinin manyetik levitasyon cihazında 24 saatlik kültür görüntüleri.....52
- Şekil 48. Standart besi yeri ve adipojenik besi yerinde farklı günler boyunca kültür edilen kontrol ya da yağlanmış 7F2 hücrelerinin, kontrol D1 ORL UVA hücreleri ile 50:50 oranda karıştırılması sonucunda oluşan 3B yapıların mikroskop görüntüleri. (Scale bar: 200 μ m).....53

- Şekil 49. Eşit oranda, heterojen karıştırılan 7F2 (kırmızı) ve D1 ORL UVA (yeşil) hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri.54
- Şekil 50. 3B adipojenik kültür için farklı desenlerin oluşturulması.55
- Şekil 51. 7 Gün boyunca adipojenik farklılaşmaya uyarılan 7F2 hücrelerinin, farklılaşmamış D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon cihazına D1 (50 mM) + 7F2 (50 mM) + D1 (40 mM) yükleme stratejisiyle oluşturduğu 3B yapıların floresan görüntüleri.56
- Şekil 52. Yoğunluğu bilinen polimer parçacıkların (1, 1.02 ve 1.09 g/mL) manyetik levitasyon (25, 50 ve 100 mM Gadavist) görüntüleri.57
- Şekil 53. Farklı sürelerde (1, 15 ve 22 gün) adipojenik ve osteojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamlarında ve standart büyüme ortamında kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin kültür görüntüleri.58
- Şekil 54. 15 gün boyunca adipojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon (25, 50 ve 100 mM Gadavist) görüntüleri.58
- Şekil 55. Yoğunluğu bilinen polimer parçacıkların (1, 1.02 ve 1.09 g/mL) (a) manyetik levitasyon (25 mM Gadavist) görüntüleri ve (b) levitasyon yüksekliği ile parçacık yoğunluğu arasındaki korelasyon.59
- Şekil 56. Farklı sürelerde (1, 5, 8, 12 ve 15 gün) (a, b) adipojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında, (c, d) osteojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında ve (e, f) standart büyüme ortamında kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon sistemindeki (25 mM Gadavist) levitasyon yüksekliklerine göre hesaplanmış yoğunluk değişimleri ve levitasyon görüntüleri.60
- Şekil 57. Adipojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında, osteojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında ve standart büyüme ortamında kültürlenmiş (1 ve 15 gün) D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon sistemindeki (25 mM Gadavist) levitasyon yüksekliklerine göre hesaplanmış yoğunluk değişimleri.61
- Şekil 58. D1 ORL UVA hücrelerinin 25 mM Gd^{3+} içeren besiyeri ile gerçekleştirilen levitasyona sonucuna göre levitasyon ve yoğunluk profili.62
- Şekil 59. Adipojenik farklılaşma uygulanan (A) D1 ORL UVA hücrelerinin 15. gündeki ve (B) 7F2 hücrelerinin 10. gündeki 2D kültür görüntüleri)63
- Şekil 60. Farklı günlerde 7F2 hücrelerinin levitasyonu. (a) 25 mM Gd^{3+} ile levite edilen kontrol ve deney grubunun 1, 5 ve 10. günlerdeki levitasyon görüntüleri. (b) Levitasyon yüksekliklerine



göre hesaplanmış yoğunluk değerlerinin dağılım grafiği (c) Değişen yoğunluk değerlerinin yüzdece dağılımı.64

Şekil 61. Farklı oranlarda (%50, %25, %10, %5 ve %1) karıştırılarak levite edilen (25 mM Gd³⁺) farklılaşmamış D1 ORL UVA (yeşil) ve adipojenik farklılaşmış 7F2 hücrelerinden (kırmızı) oluşan heterojen hücre popülasyonlarının floresan görüntüleri.65

Şekil 62. Adipojenik hücrelerin heterojen popülasyonda tanımlanması.66

Şekil 63. Farklı günlerde (1, 5 ve 10. günler) %50 oranla karıştırılan farklılaşmamış 7F2 (kırmızı) ve D1 ORL UVA hücrelerinin (yeşil) levitasyonu66

Şekil 64. 7F2 ve D1 ORL UVA hücrelerinin yoğunluğa bağlı olarak kategorizasyonu67

Şekil 65. Standart besi ortamında kültür edilen kemik iliği hücrelerinin farklı günlerde (1, 5, 7, 11 ve 14. günler) 25 mM Gd³⁺ konsantrasyonu kullanılarak levite edilmesi.....68



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. RT-PCR’da kullanılan primer listesi	11
Tablo 2. qRT-PCR protokolü	12
Tablo 3. Deneylerde kullanılan ticari kontrast ajanlarının konsantrasyonları ve besi yerine eklendiklerinde kapladıkları hacim.	31
Tablo 4. Farklı hücre ekim yoğunluğu, kültür süresi, havuzlama (pooling) ve besi ortamı tazeleme sayıları kullanılarak manyetik levitasyon ile kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinden mRNA izolasyonu. Sonuçlar NanoDrop ile ölçülmüştür.	43
Tablo 5. Manyetik levitasyon ile 0 dakika, 2 saat ve 24 saat kültürlenmiş (100 mM Gd ³⁺) D1 ORL UVA hücrelerinden (5,000 hücre/kapiler kanal) mRNA izolasyonu ve GAPDH geni için RT-PCR sonucu.	44
Tablo 6. Manyetik levitasyon ya da 2 boyutlu kültürde 7 gün boyunca kültürlenmiş (100 mM Gd ³⁺) D1 ORL UVA hücrelerinin (50,000 hücre/kapiler kanal) RT-PCR sonuçları (havuzlama yapılmamıştır).....	44
Tablo 7. Manyetik levitasyon (100 mM Gd ³⁺) ile standart büyüme ortamında ya da osteojenik farklılaştırma ortamında 48 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin (ekim sayısı: 5,000 ya da 10,000 hücre/kapiler kanal) RT-PCR sonuçları.	44

Mekanik kuvvetler canlılarda özellikle kas ve kemik dokularının sağlıklı formlarda bulunmasında ve fonksiyonlarını yerine getirmesinde önemli rol oynarlar. Mekanik kuvvetlerin kısmen ya da tamamen ortadan kalktığı felç, yatalıklık, yaşlılık ve yerçekimsiz ortam koşulları kas ve kemik dokusunda ciddi miktarda kayıplar meydana getirmektedir. Kemik doku kayıplarına ek olarak mekanik yüklenmenin ortadan kalkması kemik iliğinde bulunan ve kemik hücre havuzunu oluşturan mezenkimal kök hücrelerin yağ yönelimine girmelerine ve kemik iliğinin aşırı miktarda yağlanmasına sebep olur. Bu durum kemiklerde kırılma riskini artırır. Ayrıca yağ yönelimine bir kez giren kök hücreler kronik olarak tekrar kemik oluşturmaya, dolayısıyla rejenerasyona kolayca yönelemezler. Yaşam koşulları ya da ilerleyen yaş sebebiyle bir insanın kemik kütleini kaybedip yağ kütleini kazanmasının birey ve toplum için ciddi bir sosyo-ekonomik maliyeti vardır. Modern toplumda yaş ortalaması artıp hareket ihtiyacı azalırken, kemik erimesi (osteoporoz) ve şişmanlık (obezite) oranlarında da bir artış görülmekte ve bu hastalıkların tedavisi için gereken maddi kaynaklar toplum refahını kısıtlamaktadır. Bu durumla mücadele edebilmek için tedaviye yönelik biyomedikal yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir.

Mekanik kuvvet yoksunluğu ile kemik erimesinin arasındaki ilişkinin incelenmesi için günümüzde gönüllü yatalıklık, fiziksel sınırlama ve kasılmayı önleyici ajanların kullanılması gibi yöntemler tercih edilmektedir. Ancak bu teknikler uygulama zorluğu ve barındırdığı etik problemler dolayısı ile verimli olarak kullanılamamaktadır. Bunun yanı sıra da hücre bazındaki mekanik kuvvet yoksunluğu veya ağırlıksız ortam çalışmaları pahalı uzay uçuşları veya biyoreaktör sistemlerine olan gereksinimden dolayı detaylı olarak gerçekleştirilememektedir. Son yıllarda temel amacı hücre ayırıştırma olarak geliştirilen manyetik levitasyon tekniği kemik hücrelerinin ağırlıksız ortamda incelenebilmesi için oldukça önemli bir fırsat yaratmıştır. Bu projenin amacı manyetik levitasyon prensibini kullanarak kemik ve kemik iliği hücrelerini ağırlıksız ortamda kültürleyerek, oluşan moleküler ve hücrenel değişimleri kısa ve uzun vadeli olarak incelemektir. Bu amaca ulaşmak için hücre kültürü sırasında besiyeri ortamı Gadolinyum iyonları kullanılarak paramanyetik hale getirilmiş ve hücreler iki adet neodimium mıknatısın yaratacağı manyetik ortamda ağırlık vektörleri sıfırlanmış şekilde asılı kalmıştır. Projenin sonuçlanması ile manyetik levitasyon tekniği ile ağırlıksız ortamda kemik hücre kültürü teknolojisi geliştirilmiş olacak, ayrıca kemik hücrelerinin ağırlıksız ortamda verdikleri hücrenel ve moleküler yanıtların kolay ve ucuz bir şekilde incelenmesi sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Ağırlıksız Ortam, Manyetik Levitasyon, Gadolinyum, Kemik Hücresi, Mezenkimal Kök Hücreler, Hareketsizlik, Kemik Erimesi, Şişmanlık



ABSTRACT

Mechanical loads play an important role in maintaining a healthy form and function of tissues, especially for bone and muscle. Complete or partial removal of mechanical loads, such as during paralysis, bedrest, aging and spaceflight, induces a significant amount of muscle and bone tissue loss. In addition to the loss of bone tissue, mesenchymal stem cells in the bone marrow environment that support the pool for bone making cells lose their ability for osteogenesis and commit adipogenic pathways. This shift in lineage commitment leads to fat accumulation in the bone marrow and regenerative potential of bone diminishes, increasing risk of fracture. The concept of bone loss (osteoporosis) together with fat accumulation (adipogenesis) presents a serious socio-economic burden for modern society. Novel biomedical approaches are necessary to study this conditions arising from weightlessness for development of diagnostic and treatment options.

The relation between the mechanical loads and osteoporosis is currently investigated with methods such as voluntary bedrest, the use of physical constraints and injection of contraction inhibitory agents. However, these techniques inherently present large statistical variations and suffer from ethical concerns. Cell culture studies can be utilized to study weightlessness but it requires expensive space flight or bioreactor systems. In recent years a magnetic levitation technique was developed for cell separation. This technique presents a novel opportunity to study a cell-based system used in the weightless environment. The aim of this project is to use magnetic levitation principle to culture bone marrow cells in the weightless environment and document the molecular and cellular changes in short and long term. Study was performed by inducing paramagnetic properties to cell culture media with gadolinium ion and applying the magnetic field from two neodymium magnets during culture time, thereby nullifying weight vectors of cultured cells. The outcome of the study is the development of a weightlessness bone cell culture technology using magnetic levitation technology and examining bone and bone marrow cells during weightlessness with an easy and inexpensive way.

Key words: Weightlessness, Magnetic Levitation, Gadolinium, Bone Cell, Mesenchymal Stem Cells, Immobility, Osteoporosis, Obesity



1. GİRİŞ

Canlıların yaşam evrelerinin tamamında bünyelerinde barındırdıkları doku ve organların sağlıklı form ve fonksiyonlara sahip olması için fiziksel, kimyasal ve biyolojik birçok faktörün uyumlu ve birlikte çalışması gerekmektedir. Fiziksel faktörler içerisinde bulunan mekanik kuvvetler özellikle kas-iskelet sistemine ait organ ve dokular olmak üzere tüm sistemlerin sağlıklı ve düzenli çalışmasına katkıda bulunur.

Kemik dokusu, insan ve diğer memelilerin hayatta kalabilmeleri için çok önemli görevlere hizmet eder. Mekanik kuvvet girdisinin geçici ya da sürekli olarak kaybedildiği felç, yatalıklık, durağan çalışma, yaşlılık ve uzay uçuşları gibi durumlarda kemik dokusu oldukça hızlı bir şekilde kaybedilir ve bu doku kayıpları mekanik kuvvet yoksunluğu ortadan kalksa bile kolaylıkla geri döndürülemez. Doku kayıplarının sebebi kemik yapan ve kemik miktarını düzenleyen hücrelerin mekanik hassasiyetleridir. Bu hücreler mekanik kuvvetler ortadan kalktığında üremelerini durdururlar ve kemik yapma potansiyellerini kaybederler.

Kemik dokusunda mekanik kuvvet yoksunluğu çalışmaları genellikle insanlarda gönüllü yatalıklık ya da kemirgenlerde arka ayaklardaki mekanik kuvvetleri cerrahi, fiziksel ya da kasılmaları bloklayıcı ajanlar yardımıyla yapılırlar. Fakat bu çalışmalar oldukça masraflı, bünyesinde etik sorunlar barındıran ve de birçok sistemin bir araya gelmesinden dolayı varyasyonlara oldukça açık çalışmalardır. Diğer komponentler izole edildiği için daha az varyasyon gösteren ve tabandan başlayan hücre kültürü çalışmaları ise ya oldukça pahalı ve zahmetli uzay uçuşları ya da santrifüj prensibine dayalı ve küçük hacimlerle çalışmaya olanak vermeyen biyoreaktörlerle gerçekleştirilebilmektedir. Çok yakın zamanda manyetik levitasyon (magnetic levitation) teknolojisi ile hücrelerin gadolinyum içeren besiyerinde ağırlıksız ortamda ayrılabilmesi ve yaşatılabileceği prensibinin gösterilmesi, kemik hücrelerinin ağırlıksız ortamda incelenebilmesi için oldukça önemli bir fırsat yaratmıştır. Raporlanan projenin amacı manyetik levitasyon prensibini kullanarak kemik iliği hücrelerini kültürleyerek ağırlıksız ortam sonucu oluşan moleküler ve hücresel değişimleri kısa ve uzun vadeli olarak incelemektir.

Raporlanan projede ortaya konulan hedefler 1) kemik iliği kökenli hücreleri manyetik levitasyon ile ayrıştırma ve tasnif etme; 2) kemik iliği kökenli hücreleri manyetik levitasyonla ağırlıksız ortamda yaşatma ve 3) manyetik levitasyon yöntemini doku mühendisliği uygulamaları için biyofabrikasyon yöntemi olarak kullanma olarak özetlenebilir. Proje sürecinde bu hedeflerin tamamı çalışılmış, ve bu manyetik levitasyon teknolojisi içselleştirilerek nitelikli bilimsel yayınların ve yeni proje fikirlerinin oluşması sağlanmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Mekanik kuvvetlerin biyolojik sistemler üzerinde etkileri

Fiziksel (mekanik) kuvvetler tüm canlıların yaşamsal fonksiyonları için oldukça kritik biyolojik uyaran ya da biyolojik çıktı görevi görürler. Mekanik sinyallerin algısı ve bu sinyallere tepki verilmesi, bakteri (Kruse ve Julicher, 2005), maya (Zhou vd., 2003), bitki (Neel ve Harris, 1971; Johnson vd., 1998) ve memeli hücreleri (Ozcivici vd., 2010a) için oldukça iyi korunmuştur. Özellikle memelilerde organ sistemlerinin bakım, tamir ve/veya yenilenmesi sırasında mekanik kuvvetler önemli roller oynarlar (Ingber, 2005; Orr vd., 2006). Mekanik kuvvetlerin etkilerinin en uygun gözlemlenebildiği yapılar kas-iskelet dokularıdır ki, mekanik fonksiyonun yitirilmesi durumunda memelilerde kas erimesi (sarcopenia) ve kemik erimesi (osteopenia) net bir biçimde görülür. Özellikle kemik erimesi, kemik kırıkları riskini artırdığı için hastalarda yaşam kalitesini oldukça etkiler (Olmeda vd., 1995) ve gelişmiş/gelişmekte olan toplumlara büyük bir sosyo-ekonomik maliyet oluşturur (Marwick, 2000; NIH, 2000).

2.2 Kemik mekanobiyolojisi

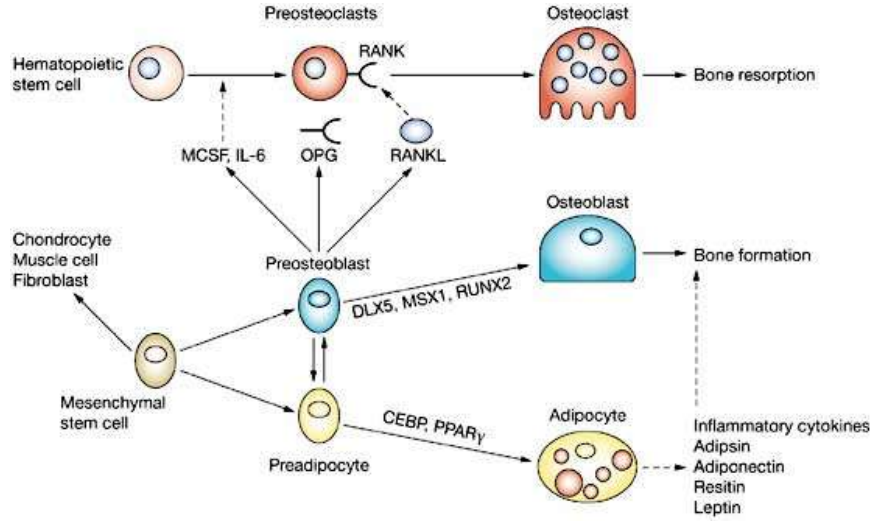
Kemik oldukça dinamik bir organ olup bu dinamik yapı iki tip kemik hücresi tarafından kontrol edilir (Martini ve Ober, 2006). Kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücrelerden özelleşen osteoblast hücreleri yeni kemik dokusunun yapılmasında faaliyet gösterirler. Osteoblastların çevrelerine Ca^{2+} iyonları çekerek yarattıkları inorganik hydroxyapatite kristalleri kemiğe tok, şekil değiştirmeye dirençli ve vücut ağırlığı ile oluşan bası kuvvetlerine dayanımlı olma özelliği kazandırır. Yine osteoblast hücreleri tarafından sentezlenen hücre dışı kolajen matris yapıları da kemik dokusunun eğilme ve çeki yüklerine karşı dayanımını sağlar. Tekrarlı yüklerle çalışan kemik dokusu mikroçatlak oluşumuna yatkındır (Burr vd., 1985; Martin, 1993; Donahue vd., 2000). Tekrarlı yükler altında çalışma sırasında oluşan bu mikroçatlakları içeren bölgeler, kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden özelleşen osteoclast hücreleri tarafından salgılanan düşük pH'lı faktörlerle yıkıma uğrattılır. Oluşan boşlukları osteoblast hücreleri hızla istila ederek orada çatlakları giderilmiş yeni kemik dokusu oluşturur.

Kemik yıkımı ve yapımını içeren bu kemik döngüsü (bone turnover) sayesinde kemik dokusu, sağlıklı bireylerde sürekli olarak hasarsız ve farklı mekanik koşullara adapte olabilecek şekilde bulunur. Bahsi geçen kemik döngüsünün ideal şartlarda varlığı oldukça katı moleküler ve mekanik bileşenlerce düzenlenir (Robling vd., 2006). Kemikte mekanik yüklenme eksikliği ya da kaybı sonucunda oluşan doku kayıplarının osteoclast aktivitesinin artmasından ziyade osteoblast sayısındaki azalma ve fonksiyonundaki değişimlerle ilgili olduğu gösterilmiştir (Ozcivici vd., 2010a; , 2010b, 2013). Osteoblastların sayıca azalması yeni yapılabilecek kemik

miktarını düşürmekle kalmayıp, bu hücrelerin osteoclast hücrelerinin özelleşmesi ve fonksiyonu için yaptıkları regülasyonu (Boyle vd., 2003; Gori vd., 2000) da etkiler.

Özetlemek gerekse kemik dokusunun sağlığı ve miktarı için mekanik kuvvetler kemik dokusunda “kullan ya da kaybet” ilkesinin belirlediği şekilde çalışmaya yol açar. Kemiğin mekanik olarak yüklenmemesi kemik matrisinde yıkıma yol açarken, fiziksel egzersiz kemik yapısının gelişmesini ve güçlenmesini sağlar (Frost, 1987). Mesela yerçekimsiz ortamdaki astronotlar her ay, kemik kütlelerinin %2’sini kaybederler (Lang vd., 2004; LeBlanc vd., 1998). Bu kayıp oranı kemikteki tüm minerali yansıtmakla beraber, özelde süngersi kemiklerde kayıplar 6 ayda %25 seviyelerini bulabilir. Ağırılıksız ortamda kemik dokusunda yaşanan bu kayıpların telafisi için, dönüşte mürettebatın uzayda geçirdiği süreden çok daha uzun bir süre geçirmesi gerekir (Sibonga vd., 2007). Uzay uçuşlarıyla benzer şekilde yatalıklık ve felç gibi geçici ya da sürekli olan mekanik kuvvet yoksunluğu da kemik erimesine yol açmaktadır (LeBlanc vd., 1990; Ramnemark vd., 1998). Örneğin gönüllü yatalıklık (voluntary bedrest) çalışmalarında rastlanan kemik kaybı oranları uzay uçuşları kadar yüksek seviyede olmasa da (%1/ay), süreklilik arz etmektedir (Shackelford vd., 2006). Uzay uçuşlarındaki kemik doku kayıplarıyla benzer şekilde bu kayıpların da kemik dokusu için telafisi oldukça zordur (LeBlanc vd., 1990).

Genel hareket ve mekanik yüklenme eksikliğinin yol açtığı diğer bir problem de bağ doku ve kemik iliğinde görülebilen yağlanmadır (Ozcivici vd., 2010b; Zayzafoon vd., 2004; Rubin vd., 2007). Osteoblast hücrelerinin kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerden geldikleri ve bu kök hücrelerin aynı zamanda yağ hücrelerine de dönüşebildikleri bilinmektedir (Pittenger vd., 1999). Yaşlılık ya da hareketsizlik durumunda osteoblast hücrelerindeki azalma ve kemik iliğindeki yağ hücrelerinin artışı göz önüne alındığında (**Şekil 1**) erişkin kök hücrelerinin karar mekanizmalarının mekanik kuvvetlerden etkilendiği düşünülebilir (Rosen ve Boussein, 2006). Bunun anlamı herhangi bir sebepten hareketsiz kalan bir hastada kemik yapımından sorumlu hücre havuzunun azalması ve böylece kemiğin mineral ve mimari yapısının bozulması, ayrıca kemik iliğindeki yağ hücrelerinin sayılarının artmasıdır. Kemik ve kemik iliğindeki bu sürecin engellenebilir ve/veya geriye döndürülebilir olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Kemik iliği kök hücrelerinin mekanik kuvvet yoksunluğu sürecinde hem kemik erimesini (osteoporosis) hem de kemik iliği yağlanmasını oluşturacak şekilde adapte olması kontrollü şartlarda ağırılıksız ortam çalışmalarının önemini ortaya koymaktadır.



Şekil 1. Kemik iliği hücrelerinin farklılaşma mekanizmaları. Kemik iliğine yerleşen kök hücrelerden mezankimal olanları ortamdaki sinyallere göre kemik (osteoblast) ya da yağ (adipocyte) yönelimlerine girerler. Bulunulan aşamada moleküler yolak işaretçileri tam olarak anlaşılammış bu yönelimlerin, dışarıdan girilen mekanik kuvvetlerden de nasıl etkilendikleri henüz bilinmemektedir (Rosen ve Bouxsein, 2006).

2.3 Ağırksız ortam biyolojisi

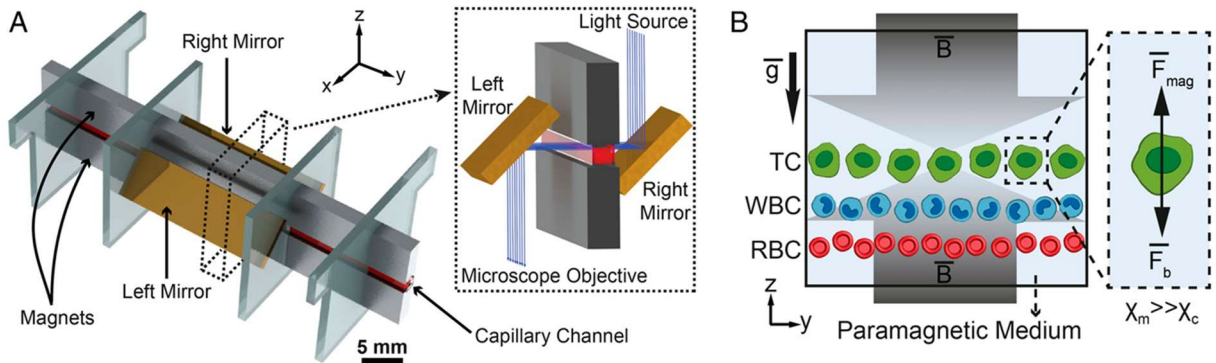
Ağırksız ortamdaki kaynaklanan mekanik yüklenme yoksunluğunun kemik ve kemik iliği bağ dokusu üzerindeki parametrik etkilerinin anlaşılabilmesi için kısa ve uzun vadeli hücre çalışmalarına izin verecek in vitro sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Uzay uçuşları sırasında hücre kültürü denemeleri yapmak mümkün (Hughes ve Lewis, 1996) fakat bu tip deneyler için yörüngeye uydu gönderilmesi oldukça masraflıdır. Dünya üzerinde hücre kültürü çalışmaları için ağırksız ortamı taklit edebilmek üzere geliştirilen teknoloji özelleşmiş biyoreaktörlerin kullanımınıdır. Random Positioning Machine (RPM) olarak adlandırılan cihazlar hücrelerin bulunduğu plastik kapları sürekli olarak döndürerek hücrelerin ve plastiğin ağırlık vektörünün yerini değiştirir. Toplam ağırlık vektörü bileşeninin integrali bu sayede zamana bağlı olarak sıfırlanarak hücreler sıfır ağırlık koşuluyla kültürlenebilirler (Sarkar vd., 2000; Yuge vd., 2003). Fakat bu uygulama sırasında hücreler sürekli olarak sıvıda oluşan kayma gerilmelerine (shear forces) tabi kalırlar (Goodwin vd., 1993). Özellikle kemik hücrelerinin üzerlerine sıvılar tarafından uygulanan kayma gerilmelerine ne kadar hassas oldukları düşünülürse (Kapur vd., 2003; Batra vd., 2005; Young vd., 2010), bu uygulamanın temel prensibi serbest düşme olması gereken deney ortamı için uygun olmadığı muhakkaktır. Benzer prensiple yani ağırlık vektörünün zamana bağlı integrasyonunu sıfırlamaya yönelik bir diğer biyoreaktör tipi olan Rotating Wall Vessel (RWV) biyoreaktörlerde de hem sıvı akışıyla ortaya çıkan kayma

gerilimleri, hem de hücrelerin taşınımı için mikrotaneler kullanma zorunluluğu kemik hücre kültürü uygulamaları için zorlayıcı niteliktedir (Kaysen vd., 1999; Villa vd., 2007).

2.4 Manyetik levitasyon

Hücrelerde ağırlıksız ortam yaratmak için kullanılabilir ve görece yeni uygulanmaya başlanan bir diğer yöntem de manyetik kuvvetler prensibinin hücre kültürüne uygulanmasıdır. Diyamanyetik nesnelere çok kuvvetli manyetik alanlarda tutarak oluşan kuvvetlerle ağırlık vektörü sıfırlanabilir (Ueno ve Iwasaka 1994; Brooks vd., 2000). Bu uygulama yukarıda bahsi geçen biyoreaktörlerden farklı olarak sisteme hiçbir mekanik bileşen eklemeyiz ve bu sistemle hücreler haftalar boyunca kültürlenebilir (Guevorkian ve Valles, 2004). Bu sistem her ne kadar gerçek ağırlıksız ortama yakın olsa da, bu ölçüde yüksek kuvvetleri oluşturabilmek için gereken mıknatıs büyüklüğü açısından oldukça önemli bir altyapı maliyeti oluşturmaktadır.

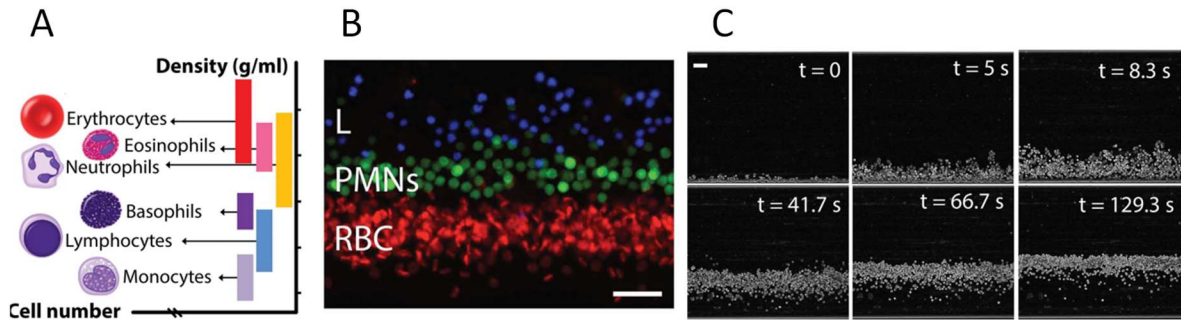
Hücrelerin ağırlıksız ortama manyetik kuvvetler kullanılarak getirilebilmeleri için çok daha basit, ucuz ve maliyet gerektirmeyen bir protokol bulunmaktadır (Durmus vd., 2015). Buna göre hücrelerin buldukları kültür besiyeri paramanyetik hale getirilerek alttan ve üstten yerleştirilen iki basit mıknatıs (ferromagnet) vasıtasıyla hücrelerin ağırlık vektörleri nötralize edilerek ağırlıksız kalmalarının sağlandığı ortaya konulmuştur (**Şekil 2A**). Hücre besiyeri ortamının paramanyetik hale getirilmesi besiyerine konulan Gadolinyum(III) (Gd^{3+}) iyonu içeren ajanlar sayesinde mümkün olmaktadır. Bahsi geçen çalışmanın temel motivasyonu, uygulama sırasında kullanılan hücrelerin manyetik kuvvet etkisiyle yoğunluklarına göre farklı noktalarda konumlandıkları için bu etkiyi heterojen hücre gruplarında (kemik iliği veya kan gibi) farklı hücre tiplerini birbirinden ayırarak manyetik kaldırma ile düşük masraflı bir hücre ayırma teknolojisinin oluşturulmasıdır (**Şekil 2B**).



Şekil 2. Manyetik levitasyon deneyinin çalışma prensibi. A. Deney için gereken komponentlerin montaj şeması, burada bir kapiler kanalın üstüne ve altına yerleştirilen mıknatısların sabitlenmesi ve ayrıca kullanılacak iki ayna yardımıyla hücrelerin gerçek zamanlı olarak görüntülenmesi için mikroskoba bağlanması gösterilmiştir. B. Hücreler üzerindeki

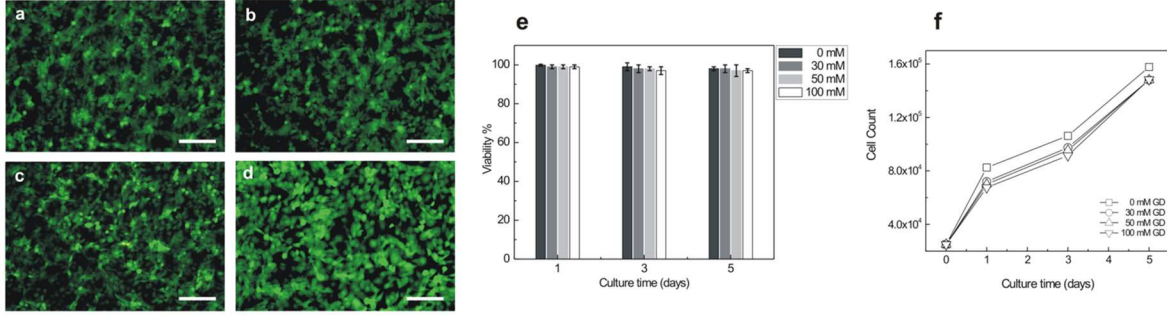
kuvvet dağılımı, paramanyetik yapılan besiyerinde hücrelerin her iki miktardan gelen kuvvetin hücresel yoğunluğa ve kullanılan ajanın derişimine bağılı olarak z ekseninde konumlanması (Durmus vd., 2015).

Manyetik levitasyon prensibi kullanılarak hücrelerin birbirinden ayrılabilmesi pratiğı aynı grup tarafından başka bir çalışmada da kullanılmış olup (Tasoglu vd., 2015), burada kandaki farklı hücre gruplarının yoğunluklarına göre ayrı ayrı denge noktalarında tasnif edilebileceğı gösterilmiştir (**Şekil 3A**). Kanda karışık halde bulunan farklı hücre grupları kendilerine özel antijenlerle boyandıktan sonra manyetik levitasyon uygulandığında her bir hücre tipinde gösterilen prensibin karışımlar için de geçerli olduğı gösterilmiştir (**Şekil 3B**). Hücrelerin deneyin başlangıcından itibaren kaldırılması için gereken süre 2 dakika olup, akabinde hücreler buldukları konumda diğere deneylere tabi tutulabilmektedir (**Şekil 3C**). Projede “hücre ayırıştırma” hedefi bulunmasa da, gösterilen manyetik levitasyon teknolojisinin hücreler üzerinde gösterdiği yüksek mekansal çözünürlük ve hızlı denge noktasına geçiş özellikleri ağırlıksız ortamda yapılacak kemik hücre kültürü sırasında kullanılmıştır.



Şekil 3. Manyetik levitasyon prensibi ile kan hücrelerinin birbirinden ayrılması. A. Kan içerisinde bulunan farklı hücrelerin yoğunlukları B. Gerçek zamanlı kan hücresi ayırma deneyi, kırmızı boyalı hücreler eritrosit, yeşil boyalı hücreler polimorfonükleik hücreleri (nötrofil vs.) mavi hücreler ise lenfositleri temsil etmektedir. C. Deneyin başlangıcından itibaren kan hücrelerinin kaldırılmasının zamana bağılı değışimi, buna göre hücrelerin steady state pozisyon almaları kullanılan derişim için 2 dakika sürmektedir (Tasoglu vd., 2015).

Bahsi geçen iki çalışmada besiyerini paramanyetik hale getiren madde manyetik rezonans görüntüleme (MRI) uygulamalarında kullanılan ve Gd^{3+} içeren kontrast ajanıdır (Gadavist, Bayer). Etken maddesi Gadobutrol (gadolinium(III)2,2',2''-(10-((2R,3S)-1,3,4-trihydroxybutan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate) olan bu ilaç paramanyetik ve suda çözülebilen yapısıyla kanserli dokuların MRI ile tanısında oldukça etkin bir maddedir (Tombach ve Heindel, 2002; Huppertz vd., 2004). Bu ajanın manyetik levitasyon amacıyla kullanıldığı çalışmalarda hücre tipleri için toksik olmadığı gösterilmiştir (**Şekil 4**). Fakat bu ajanın kısa ve uzun vadedeki kemik hücre biyolojisine ve kemik hücre dışı matris oluşumuna olan etkisi henüz bilinmemektedir.



Şekil 4. Manyetik levitasyon için kullanılan ajanın (Gadavist, Bayer) JHEsoAD1 hücreleri üzerindeki toksisitesi. 5 gün boyunca kültürlenmiş hücrelerde canlı (yeşil - Calcein) ve ölü (kırmızı - Ethidium homodimer) deneyinin a. 0 mM, b. 30 mM, c. 50 mM, d. 100 mM Gadavist derişimi. Ayrıca farklı günler için e. hücre canlılıklarının ve f. sayılarının değişimi. Sonuçlara göre besiyeri için kullanılan paramanyetik ajan toksik değildir (Durmus vd., 2015).

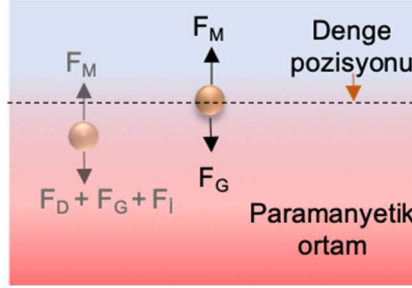
Çalışmalarda kullanılan ve Bayer firmasından temin edilen paramanyetik kontrast ajanının farklı firmalar tarafından aynı amaç için üretilen ve benzer şekilde Gd³⁺ içeren alternatifleri bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak Gadodiamide (gadolinium(III) 5,8-bis(carboxylatomethyl)-2-[2-(methylamino)-2-oxoethyl]-10-oxo-2,5,8,11-tetraazadodecane-1-carboxylate hydrate – General Electric firması, Omniscan adıyla) ve Gadoteric acid (gadolinium(+3) cation; 2-[4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]acetate – Guerbet firması, Dotarem adıyla) verilebilir. Bu noktada hücre ayrıştırması ve projede önerilen kemik hücre kültürlenmesi için henüz geliştirilme aşamasında olan bu teknoloji için farklı Gd³⁺ içeren ajanların yaratacağı performans farkları henüz bilinmemektedir.

Tamamlanan projede, hücre ayrıştırması için henüz geliştirilme aşamasında olan manyetik levitasyon teknolojisinin 1) Türkiye'ye transferi yapılmış ve teknikler içselleştirilmiş; 2) ayrıştırma teknolojisi kemik iliği kökenli hücrelere ilk kez uygulanmış; 3) ayrıştırma teknolojisinden farklı olarak hücreler ağırlıksız ortamda kısa ve uzun sürelerle ilk kez yaşatılmış ve 4) teknikler doku mühendisliğinde biyofabrikasyon uygulamaları için adapte edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 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 5. 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 miktatının yüzeyinden uzaklaştıkça azalmaktadır. Buradan paramanyetik tuz solüsyonunda ya da ferro sıvı içerisinde düşük manyetik alanda üretilen manyetik dipole ulaşılabilir (**denklem 3**).

$$\vec{F}_M = (\vec{m} \cdot \nabla) \vec{B} \quad (2) \quad \text{ve} \quad \vec{m} = \frac{V \cdot \Delta \chi}{\mu_o} \vec{B} \quad (3)$$

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 susceptiblity) 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 duygunluk değerine göre değişmektedir. Projemizde yukarıda ayrıntılarıyla açıklanan fiziksel olaylardan yararlanılarak mikroakışkan platform içerisindeki hücrelerin üzerine yerçekimine ters yönde etki eden manyetik kuvvet, besi ortamının manyetik duygunluk değeri (χ_m) değiştirilerek artırılmış ve hücrelerin levitasyonu aracılığı ile ağırlıksız ortam taklidi sağlanmıştır. Hücreleri çevreleyen besi ortamının manyetik duygunluk değeri, besi ortamına farklı konsantrasyonlarda Gd^{3+} (Gadavist) ilave edilerek elde edilmiştir.

3.2 Hücre kültürü

Çalışma boyunca D1 ORL UVA mezenkimal kök hücre (Demiray ve Ozcivici, 2015; Baskan vd., 2017), MC-3T3 osteoblast hücresi (Wang vd., 1999), 7F2 yağ biriktiren adipocyte hücresine dönüşebilen osteoblast (Thompson vd., 1998) hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatlarının seçilme sebebi kemik iliğinin kompozisyonunu deneylerde tam olarak yansıtmaktır. D1 hücreleri çalışma boyunca özelleşmemiş kemik iliği kök hücrelerini temsil etmiştir. Bu hücreler yağ ve kemik yönelimi konusunda herhangi bir seçim göstermeksizin kolaylıkla iki hücre tipine de dönüşebilmektedirler (Balian vd., 2000). MC-3T3 hücreleri osteoblast hücreleri olup yüksek oranda mineralize hücre dışı matris oluşturabilmektedirler. 7F2 hücreleri de osteoblast hücreleridir fakat standart osteoblastlardan farklı olarak uygun şartlarda tüm kemik mRNA belirteçlerini kaybederek kolaylıkla adipocyte hücrelerine dönüşebilmektedirler. Bu üç grup hücre, hücresel anlamda heterojen bir yapıya sahip kemik iliği için kapsayıcı sonuçlar sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada farklı biyofabrikasyon yöntemlerinin uygulamasında meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231) destekleyici olarak kullanılmıştır.

3.3 Manyetik levitasyon ile hücre ayrıştırılması

Normal hücre kültüründe gerektiği kadar çoğaltılan hücreler 50mm uzunlukta 1mm² kesit alana sahip kapiler kanala aktarılmıştır. Bu kanal üzerine ve altına konulacak olan dikdörtgenler prizması şeklindeki neodmiyum mıknatıslar (NdFeB), ve mikroskop ataçman aynaları 3 boyutlu yazıcı (Formlabs Form 2) ile oluşturulmuş parçalarla monte edilmiştir. Hücre transferi öncesi tüm parçalar UV sterilize edilmiş ve kapiller kanallar paramanyetik besiyerinde bulunan hücre transferinden sonra sızdırmazlık için kil hamuru kullanılarak (Critoseal) kapatılmıştır.

Manyetik levitasyona tabi tutulan hücreler 45°'lik mikroskop aynaları aracılığı ile inverted mikroskop (Olympus IX41) yardımıyla görüntülenmiş ve kaydedilmiştir. Hücrelerin yoğunlukları ve morfolojileri Image J aracılığı ile belirlenmiştir. Bu ölçümler için gereken kalibrasyon farklı yoğunluktaki standard polyethylene kürecikler kullanılarak yapılmıştır.

3.4 Manyetik levitasyon ile hücre kültürü

Paramanyetik ortam için hücrelerin besiyerine Gd^{3+} içeren kontrast ajanı farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir. Bu konsantrasyonlar 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM ve 200 mM olmakla beraber diğer ticari kontrast ajanları için de optimize edilmiştir. Ek olarak, kemik iliği hücreleri normal paramanyetik besiyeri yanında yapılacak deneye göre kemik yönelimini (β -glycerol phosphate, askorbik asit), ya da yağ yönelimini (insülin, dexamethasone, indomethacine) destekleyici kimyasallar da besiyerine eklenmiştir.

3.5 mRNA ifade analizleri

Moleküler ifade analizlerinde kullanılmak üzere dizayn edilen primerler (**Tablo 1**) nükleaz içermeyen suda çözülmüş, kullanım solüsyonu 500X'lik stok solüsyonunu 10X'e seyrelterek elde edilmiştir. Toplam mRNA izolasyonu için, kültürü sonlanan hücreler iki kere 1XPBS ile yıkandıktan sonra üzerine 200 μ l lysis buffer eklenip hücreler buzun üzerinde 2-3 dk boyunca bekletilmiştir. Kuyulardaki parçalanmış hücreler 1.5 ml'lik eppendorf tüplerde toplanmış ve insülin iğnesi yardımıyla homojenize hale getirilmiştir. Tüpteki sıvılar, üzerlerine kendi hacimleri kadar etanol eklendikten sonra, toplam mRNA izolasyonu deneye göre PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen) ya da 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. Üç tekrarlı (triplicate) olarak yürütülen RT-PCR deneylerinde numune sayısı da üç olarak kullanılmıştır.

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
OCN	CTG ACA AAG CCT TCA TGT CCA A	GCG CCG GAG TCT GTT CAC TA
ALP	TTT AGT ACT GGC CAT CGG CA	ATT GCC CTG AGT GGT GTT GCA

Tablo 2. qRT-PCR protokolü

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	

Bütün mRNA ifade analizi deneylerinde GAPDH geni içsel kontrol (housekeeping gene) olarak kullanılmıştır. RT-PCR Roche LightCycler® 96 sisteminde gerçekleştirilmiştir.

3.6 Hücre çoğalması ve hücre sağlığı deneyleri

Hücrelerin farklı paramanyetik besi ortamında 2 boyutlu (2B) kültürdeki ya da 3 boyutlu (3B) manyetik levitasyon kültüründeki çoğalmasının ve sağlığının incelenmesi için gerçekleştirilmiştir. Hücre çoğalması deneyleri MTT yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Hücre sağlığı deneyleri live/dead assay yöntemiyle (Calcein-AM ve Ethidium homodimer boyama yapılarak) kontrol edilmiştir.

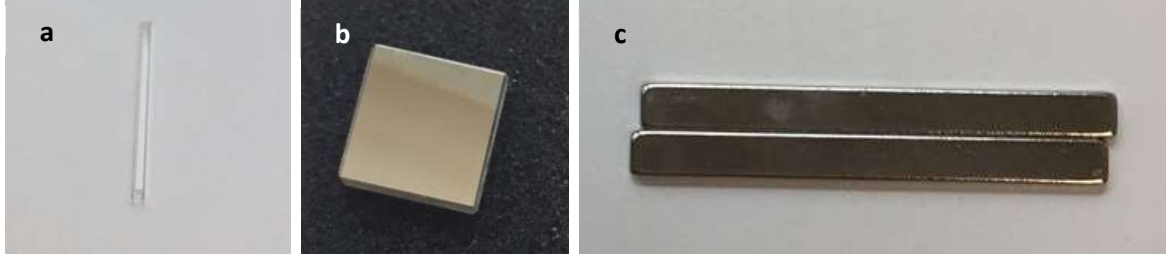
3.7 PI boyaması ve akış sitometrisi ile hücre döngüsü analizleri

Hücre döngüsü evrelerini belirlemek için, deneysel gruplarda toplanan hücreler Propidium iodit (PI) ile boyanarak, akış sitometresi tarafından ölçülmüştür. Hücreler manyetik levitasyon kültüründen ve 2 boyutlu kontrol kültüründen toplandıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 1200 rpmde santrifüj edilmiştir. Oluşan çöküntü 1ml soğuk PBS ve 4 ml soğuk %100 EtOH ile çözülmüş ve -20°C'de saklanmışlardır. Analizin yapılacağı gün, hücreler 4°C'de önce 10 dakika boyunca 1500 rpm ve sonrasında 1 dakika boyunca 2000rpm'de santrifüj edilmiştir. Açığa çıkan çözelti 1ml PBS'de çözüldükten sonra çözelti Eppendorf tüplere alınmıştır. Hücreler daha sonra 4°C'de önce 10 dakika boyunca 1500 rpm santrifüj edilmişlerdir. Oluşan çöküntü 2µl RNase A (200µg/ml) ve 200µl 0,1% Triton X-100 PBS içinde çözülmüş ve 37 C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 20µl PI (1mg/ml) eklenerek karanlıkta 15 dakika kadar daha bekletilmiş ve akabinde BD yazılımıyla, BD FACS Canto flow cytometry cihazında ölçümleri alınmıştır.

4. BULGULAR

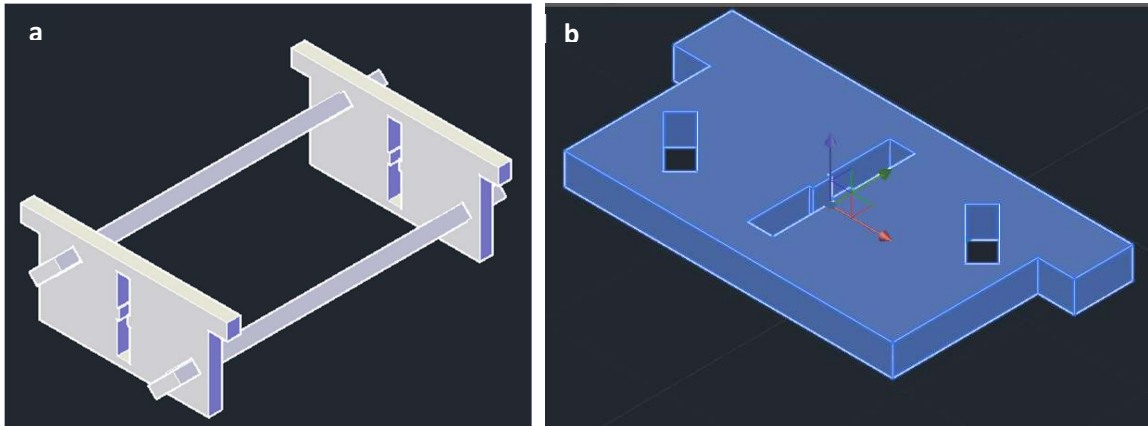
4.1 Manyetik levitasyon cihazının dizaynı ve üretilmesi

Manyetik levitasyon prensibi ile çalışan düzeneğin için i) iki adet 50,8 x 2 x 5 mm Neodmiyum (NdFeB) mıknatıs, ii) bir adet 1 x 1 x 50 mm cam kapiler kanal ve iii) iki adet 12,7 x 12,7 x 3,2 mm alüminyum ayna temin edilmiştir (**Şekil 6**).

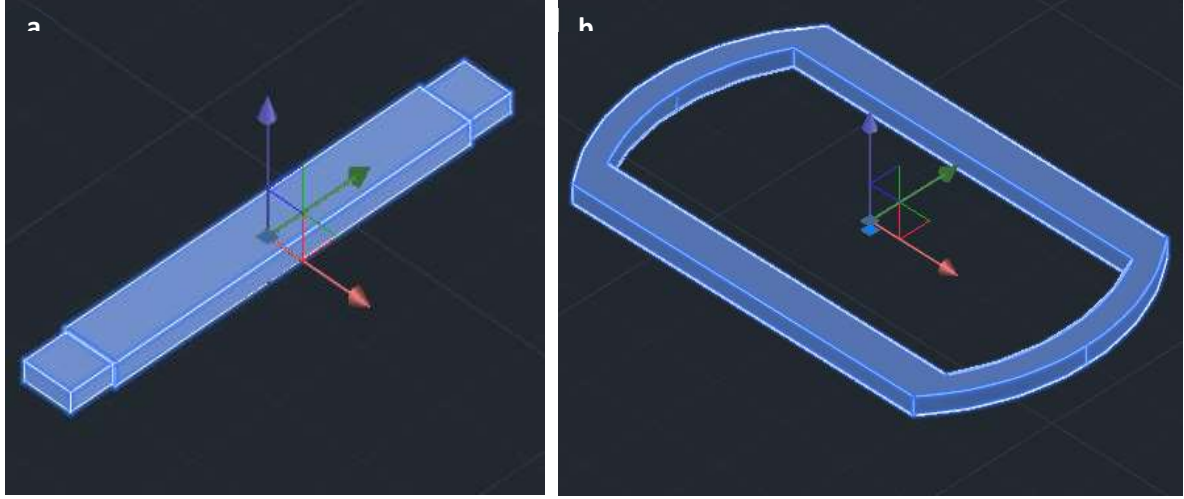


Şekil 6. Manyetik levitasyon prensibi ile çalışan düzeneğin ana parçaları, (a) hücrelerin düzeneğe yüklenmesinde kullanılan cam kapiler kanal, (b) mikroskop yardımıyla görüntü alınabilmesini sağlayan iki adet ayna, (c) ağırlıksız ortam oluşturulmasında kullanılan iki adet mıknatıstan oluşmaktadır.

Düzeneğin ana parçalarını bir araya getirmek ve kapiler kanal içerisini görüntüleyebilmek için gerekli ek parçaların teknik şemaları üç boyutlu çizim programı (AutoCAD 2016) ile “üç boyutlu modelleme” sekmesinde çizilmiştir. Düzeneğin fonksiyonel hale getirilmesinde kullanılacak ek parçalar (i) mıknatısların ve kapiler kanalın monte edileceği iki adet tutucu parça, (ii) aynaların monte edileceği ve 45 derecelik açıyla tutucu parçalara takılacak olan iki ataçman ve (iii) düzeneğin mikroskop yuvasına oturmasını sağlayacak adaptörden oluşmaktadır (**Şekil 7-8**).

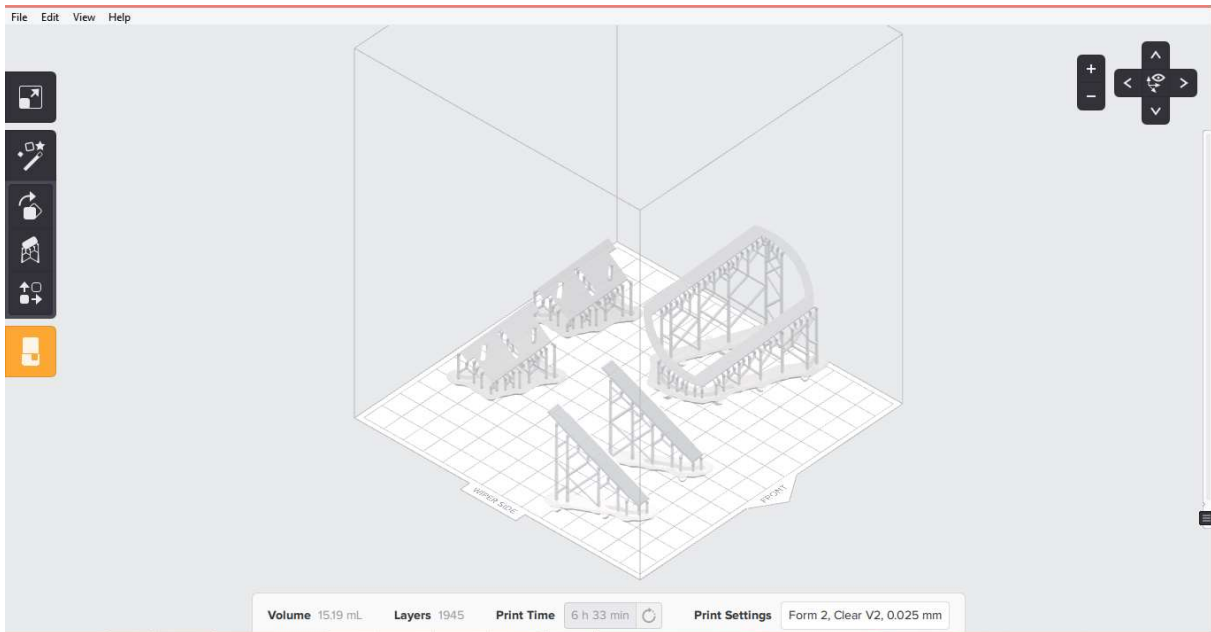


Şekil 7. (a) Manyetik levitasyon düzeneğini bir araya getirecek ek parçaların üç boyutlu çizim programındaki görüntüsü; (b) Mıknatısların ve kapiler kanalın monte edileceği tutucu parçanın üç boyutlu çizim programındaki görüntüsü



Şekil 8. (a) Aynaların monte edileceği ve tutucu parçalara bağlanacak ataçmanın üç boyutlu çizim programındaki görüntüsü; (b) Mikroskop yuvasına yerleştirilerek düzener ile görüntü alınabilmesini sağlayacak adaptörün üç boyutlu çizim programındaki görüntüsü

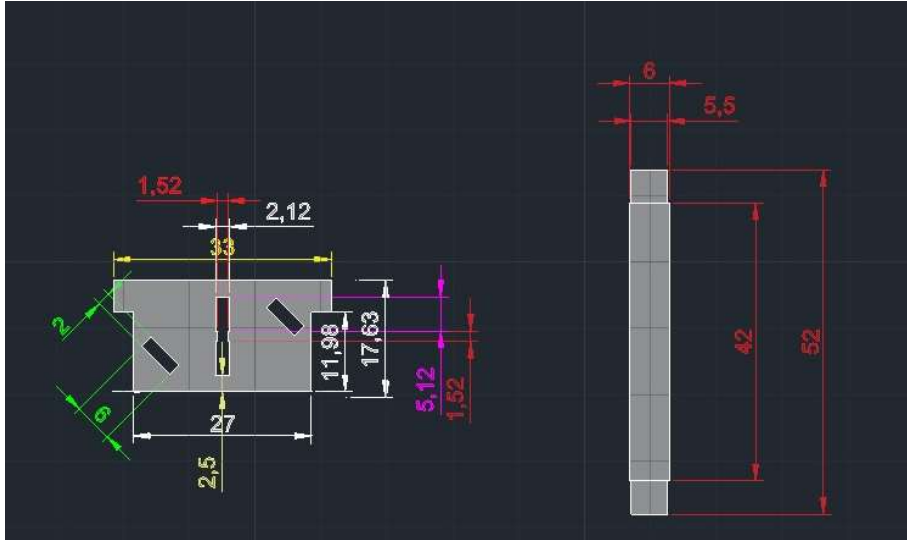
İlgili parçaların teknik şemaları tamamlandıktan sonra çizim dosyası üç boyutlu yazıcıda (Formlabs Form 2) yazdırılmak üzere ilgili formatta (.STL uzantısıyla) kaydedilmiştir. Ardından PreForm yazılımı yardımıyla ek parçalara gereken destek uzantıları eklenmiş ve parçalar basım işlemine hazır hale getirilmiştir (**Şekil 9**). Daha sonra yine aynı ara yüz üzerinden destek uzantıları eklenmiş çizim dosyası (.FORM uzantısıyla) üç boyutlu yazıcıya gönderilmiş ve yazdırma işlemi başlatılmıştır. Üç boyutlu yazdırma işlemi “Clear v2 FLGPCL02” fotoreaktif reçine kullanılarak stereolitografi tekniği ile 0.025 mm çözünürlüğünde gerçekleştirilmiştir. Üç boyutlu yazıcı, fotopolimer reçine üzerine odaklanan UV lazer ile tabandan başlayıp katman katman ürünü oluşturarak basım işlemi tamamlamıştır.



Şekil 9. Parçaların destek kısımları eklenerek üç boyutlu yazdırmaya uygun hale getirilmesinde kullanılan arayüzün (PreForm) ekran görüntüsü.

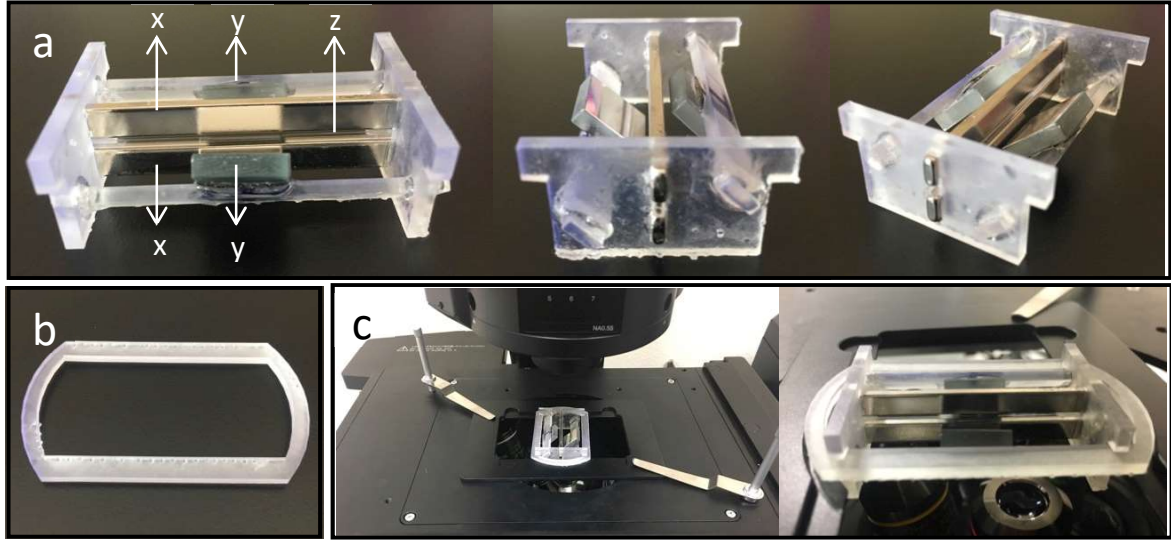
Basım işleminin tamamlanmasının ardından basılan parçalar yazıcı yüzeyinden sıyrılmıştır. Üretici firma önerisi doğrultusunda, yazdırılan parçalar izopropil alkol (2-Propanol, VWR Chemicals) içeren hazneye alınarak 30 saniye boyunca çalkalanmış ve 10 dakika boyunca hazne içerisinde bekletilmiştir. Ardından yine izopropil alkol içeren ikinci bir hazneye alınarak ilk adımdaki işlemler tekrarlanmıştır. İzopropil alkol ile muamele işleminin ardından parçalar filtre kağıdı ile kurutulmuş, destek kısımlarından bir pense yardımıyla kesilerek montaja uygun hale getirilmiştir.

Düzeneğin inşa edilmesinde kullanılacak ek parçaların optimum boyutlarının elde edilebilmesi için muhtelif çizimler yapılmış; düzeneğin en uygun biçimde monte edilmesine olanak sağlayan parçaların boyutları nihai boyutlar olarak belirlenmiştir (**Şekil 10**).



Şekil 10. Manyetik levitasyon düzeneğini oluşturan ek parçaların optimize edilmiş boyutları (mm cinsinden). (Tutucu parçanın kalınlığı: 3 mm, ataçman bağlantı ucu kalınlıkları: 1,7 mm, ataçman gövde kalınlığı: 2 mm.)

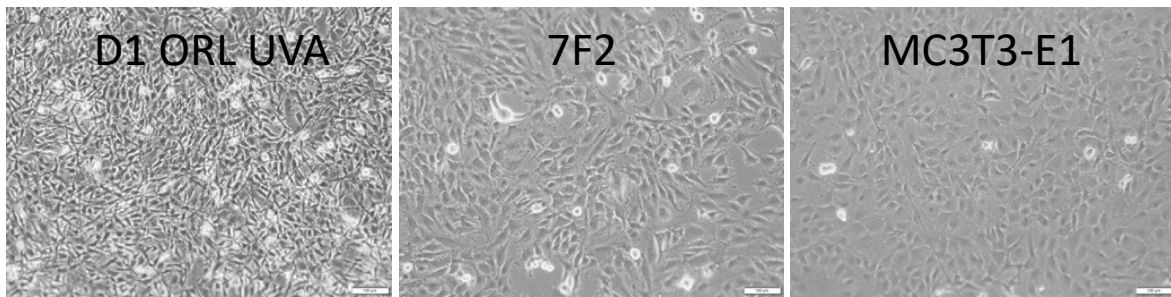
Düzenek monte edilirken kanal içerisinde ağırlıksız ortam oluşturabilmek amacıyla, mıknatıslar aynı kutupları birbirine bakacak şekilde karşı karşıya getirilmiş; her mıknatısın iki ucuna da tutucu parçalar yerleştirilmiştir. Daha sonra ataçmanlar tutucu parçalara monte edilmiş ve orta noktalarına aynalar yapıştırılmıştır. Son olarak, cam kapiler kanal iki mıknatıs arasına yerleştirilmiş ve düzenek hücre görüntüleme işlemine hazır hale getirilmiştir (**Şekil 11**).



Şekil 11. (a) Manyetik levitasyon düzeneğinin farklı açılardan görünümü; x: magnetik alan oluşturulmasını sağlayan neodymium mıknatıslar, y: kültürlenen hücrelerin mikroskop altında görüntülenmesini sağlayan aynalar, z: hücrelerin kültürlendiği kapiler kanal, (b) düzeneğin mikroskopa yerleştirilmesine olanak sağlayan adaptör parça, (c) düzeneğin adaptör ile birlikte mikroskop üzerindeki yerleşimi.

4.2 Projede kullanılan hücre tiplerinin karakterizasyonu

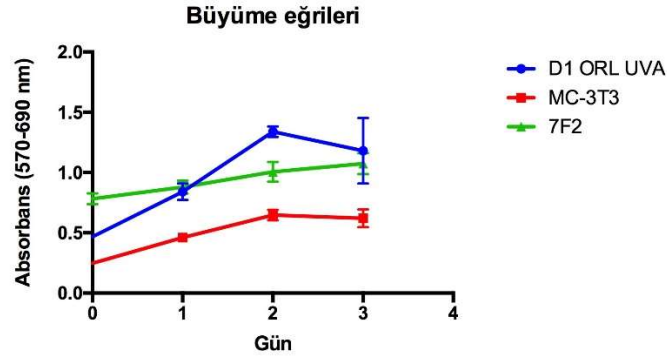
Manyetik levitasyon prensibi ile kültürlenmek için seçilen fare kaynaklı kemik iliği hücreleri teminini takiben açılarak pasajlanmış ve stok oluşturmak üzere dondurulmuştur. Bu hücre hatlarının tamamı (D1-ORL-UVA, 7F2 ve MC3T3-E1) plastiğe sağlıklı yapışma göstermiş ve kullanılan koşullarda çoğalmışlardır (**Şekil 12**).



Şekil 12. Proje kapsamında kullanılan hücrelerin ışık mikroskobu (faz) görüntüleri; D1 ORL UVA kemik iliği kök hücreleri (ATCC), 7F2 fare osteoblast hücreleri (ATCC), MC3T3-E1 Subclone 14 fare preosteoblast hücreleri (ATCC) (Scale bar: 100 µm).

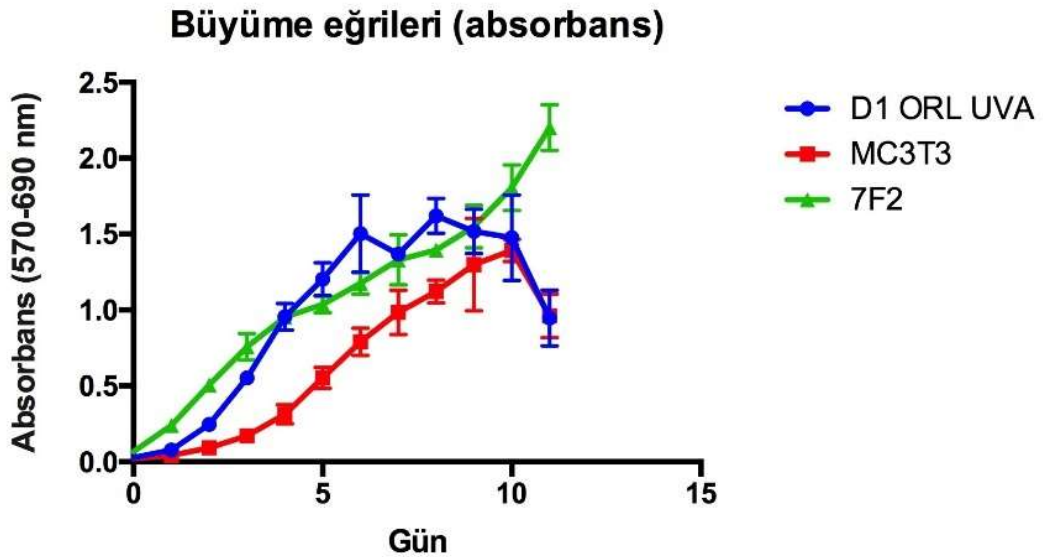
Stoklanan ve sağlıklı bir fenotip gözlemlenen hücrelerde bir sonraki adımda büyüme eğrilerinin gözlemlenmesi hedeflenmiştir. Her bir kuyuya 2000 hücre düşecek şekilde 96 kuyucuklu plastiğe ekilen (DMEM + %10 FBS + %1 P/S) hücrelerin canlılıkları MTT testi ile belirlenmiştir.

Kültürün 3. gününde plastik yüzeyin tamamen kapladığının görülmesinin ardından büyüme eğrisi takibi durdurularak hücrelerin seyreltilmesine karar verilmiştir (**Şekil 13**).



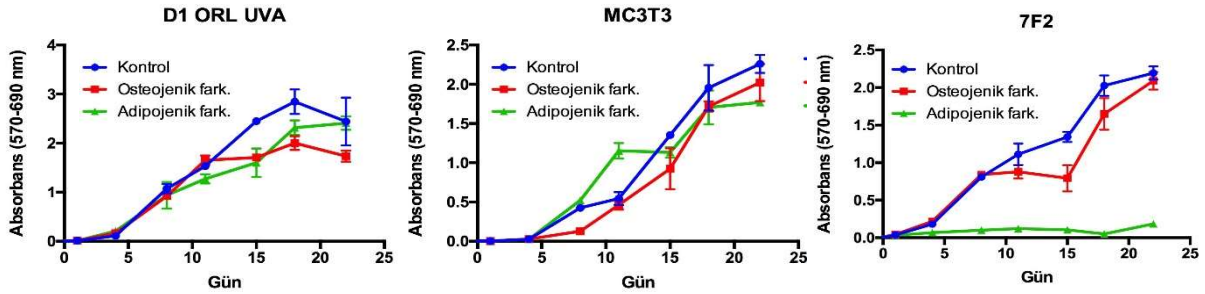
Şekil 13. 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plastiğe ekilen D1 ORL UVA, MC3T3 ve 7F2 hücrelerine ait 3 gün süre ile takip edilen büyüme eğrileri.

Tekrarlanan deneyde 96 kuyucuklu plastik kaptaki 200 hücre/kuyucuk olacak şekilde aynı şartlarda ekilmiş ve MTT testi ile canlı hücre miktarı takip edildi ve büyüme eğrileri oluşturulmuştur. Deney şartlarında bir haftanın sonunda D1 hücreleri için, 10. günden sonra 3T3 hücreleri için büyüme fazının durduğu tespit edilerek deney sonlandırılmış ve daha geniş alanlı plastik kuyucukların kullanılmasına karar verilmiştir (**Şekil 14**).



Şekil 14. 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plastiğe ekilen D1 ORL UVA, MC3T3 ve 7F2 hücrelerine ait 3 gün süre ile takip edilen büyüme eğrileri.

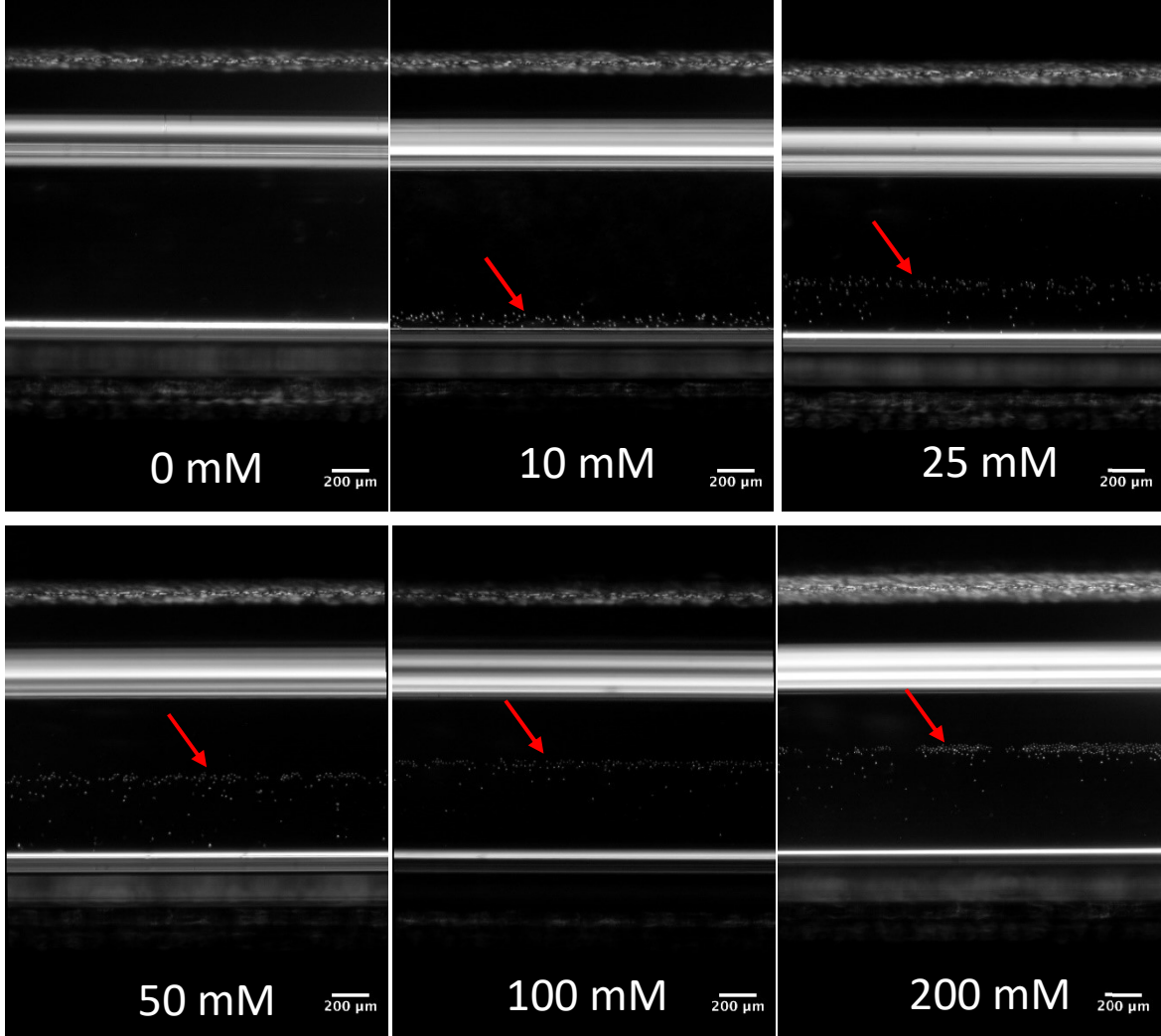
D1 ORL UVA, MC3T3 ve 7F2 hücreleri 200 hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu plastiğe standart büyüme ortam (DMEM + %10 FBS + %1 P/S) ve buna ek olarak, kemik ve yağ oluşumunu tetikleyecek kimyasalların bulunduğu ortam içerisinde büyütülmüştür. Kemik farklılaştırma ortamı olarak standart büyüme ortamına 50 mg/ml askorbik asit ve 2.16 mg/ml β -gliserolfosfat eklenerek kullanılmıştır. Benzer şekilde yağ farklılaştırma ortamı olarak standart büyüme ortamına 50 μ M indometasin, 10 nM dekzametazon ve 5 μ g/ml insülin eklenmiştir. Hücre canlılıkları 3 hafta boyunca MTT ile takip edilmiştir (**Şekil 15**).



durumun tek istisnası 7F2 hücrelerinin yağ yönelimine girme durumunda gözlenmiştir. Bu hücrelerin yağ yönelim ortamına maruz kalır kalmaz çoğalmalarını durdurdukları gözlenmiştir.

4.3 Manyetik levitasyonun mikroakışkan kanalda doğrulanması

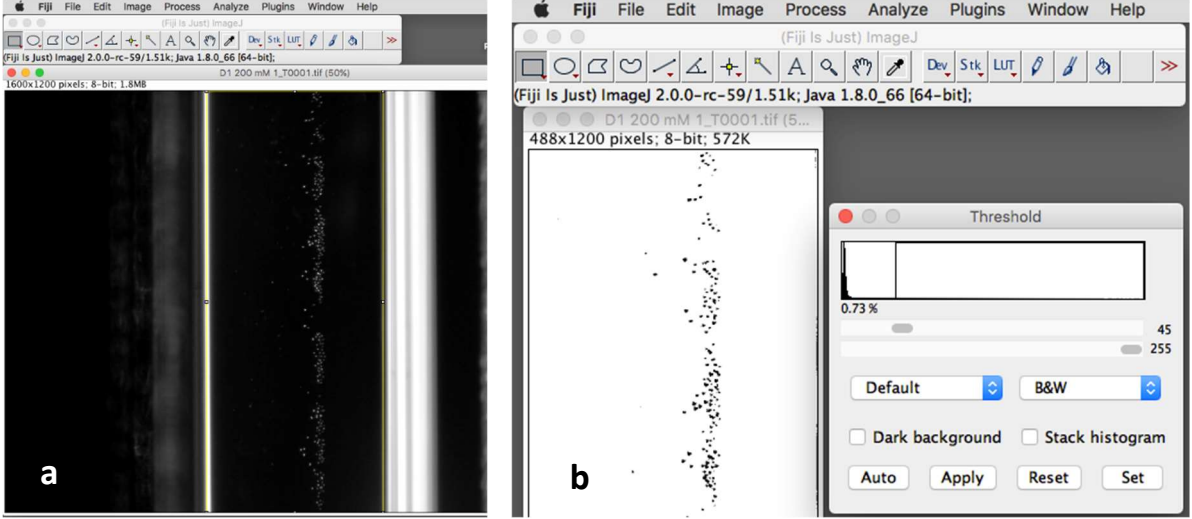
Manyetik levitasyon cihazının üretimini takiben levitasyon doğrulanması yapılmıştır. Önceden hazırlanarak dondurulmuş D1 ORL UVA hücreleri deney öncesi çözülerek büyüme ortamında askılanmıştır. Daha sonra çözeltiye MRI kontrast ajanı olan **Gadavist** farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 25, 50, 100 ve 200 mM) eklenmiştir. Hücreler 105 hücre/ml olacak şekilde manyetik levitasyon düzeneğinin içerisindeki kapiller kanala yüklenmiş, ardından inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile 10 dakika boyunca (1'er dakika aralıklarla) görüntülenmiştir (**Şekil 16**).



Şekil 16. Farklı Gadavist konsantrasyonları içeren besi ortamları ile süspansiyon edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğindeki 10. dakika sonundaki levitasyon görüntüleri. Oklar levitasyon seviyelerini göstermektedir. Scale bar: 200µm.

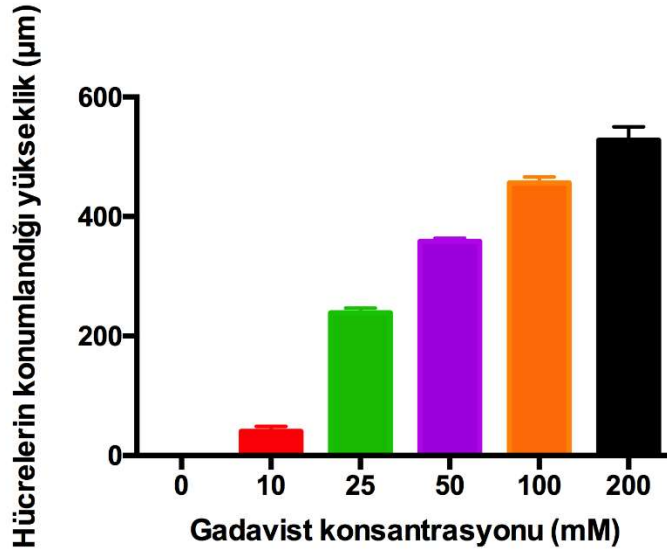
4.4 Gadavist ajanı ile manyetik levitasyon deneyleri

Hücrelerin kapiler kanal içerisinde konumlandığı koordinatların analizi için Image J - FIJI programı kullanılmıştır. Kısaca, mikroskop kamerası aracılığı ile çekilen resimler (.TIFF) uzantısıyla kaydedildikten sonra kayıtlı dosyalar analiz edilecekleri bilgisayara transfer edilmiş ve FIJI programında açılmıştır (**Şekil 17**). Dikdörtgen seçme aracı ile hücrelerin içerisinde bulunduğu kapiler kanal seçildikten sonra bu kısım kırılmış (crop) ve arka plan çıkarılmıştır (subtract background). Ardından hücreleri temsil eden pikseller threshold uygulanarak seçilmiş ve hücre dağılımları belirlenmiştir (**Şekil 17**).



Şekil 17. (a) Mikroskop görüntüsünün FIJI programında açılması (b) Hücreleri izole edebilmek için threshold uygulanması.

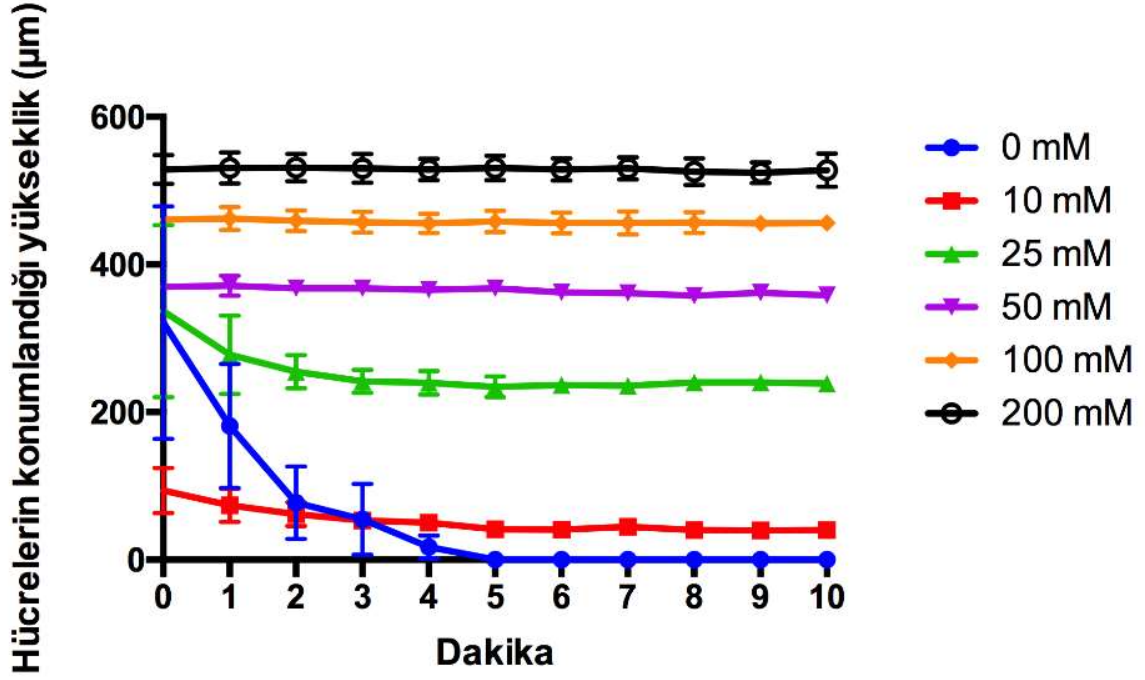
Threshold sonrası oluşan parçacıklar, analiz seçeneği ile boyut ve dairesellik parametreleri kısıtları girilerek analiz edilmiştir. Analiz sonucunda hücrelere ait yükseklik koordinatları kapiler tüpün alt yüzeyine bağlı olarak elde edilmiş ve bu verilerden istatistiki değerler hesaplanmıştır. Sonuçlara göre D1 ORL UVA hücreleri farklı konsantrasyonlardaki Gadavist kontrast ajanı varlığındaki çözeltilerde artan konsantrasyonla beraber daha yüksek bir noktada konumlanmışlardır (**Şekil 18**).



Şekil 18. Farklı Gadavist konsantrasyonları içeren besi ortamları ile süspansiyon edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğindeki 10. dakika sonundaki ortalama levitasyon konumu

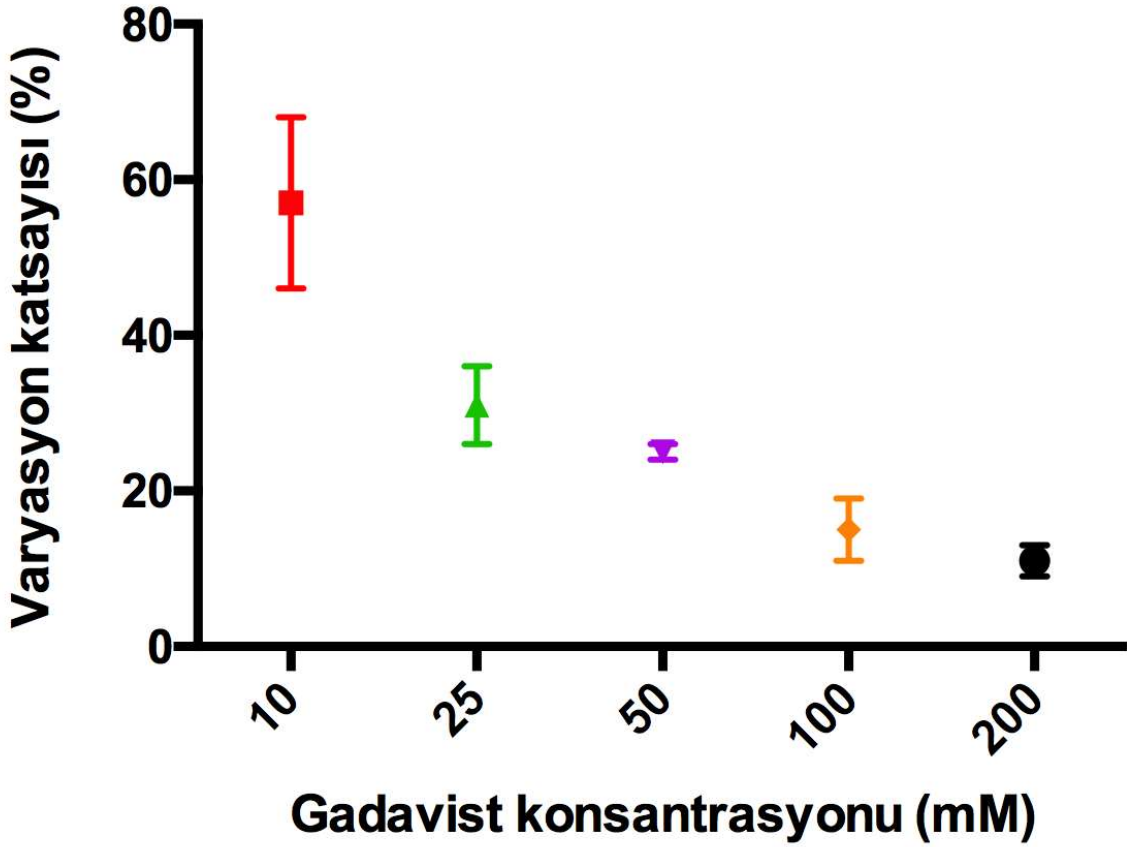
Bu konumlanma işlemi görece olarak hızlı gerçekleşmekte ve hücreler 10 dakikalık deney süresinin çoğunu yükseklik açısından kararlı durumda (steady state) geçirmektedirler

(Şekil 19). Ayrıca rapor ekinde bu analizi desteklemesi için mikroskop tarafından elde edilen görüntülerin farklı konsantrasyonlar için videoları da eklenmiştir (Video 1-6).



Şekil 19. Farklı Gadavist konsantrasyonları içeren besi ortamları ile süspansiyon edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğindeki ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi.

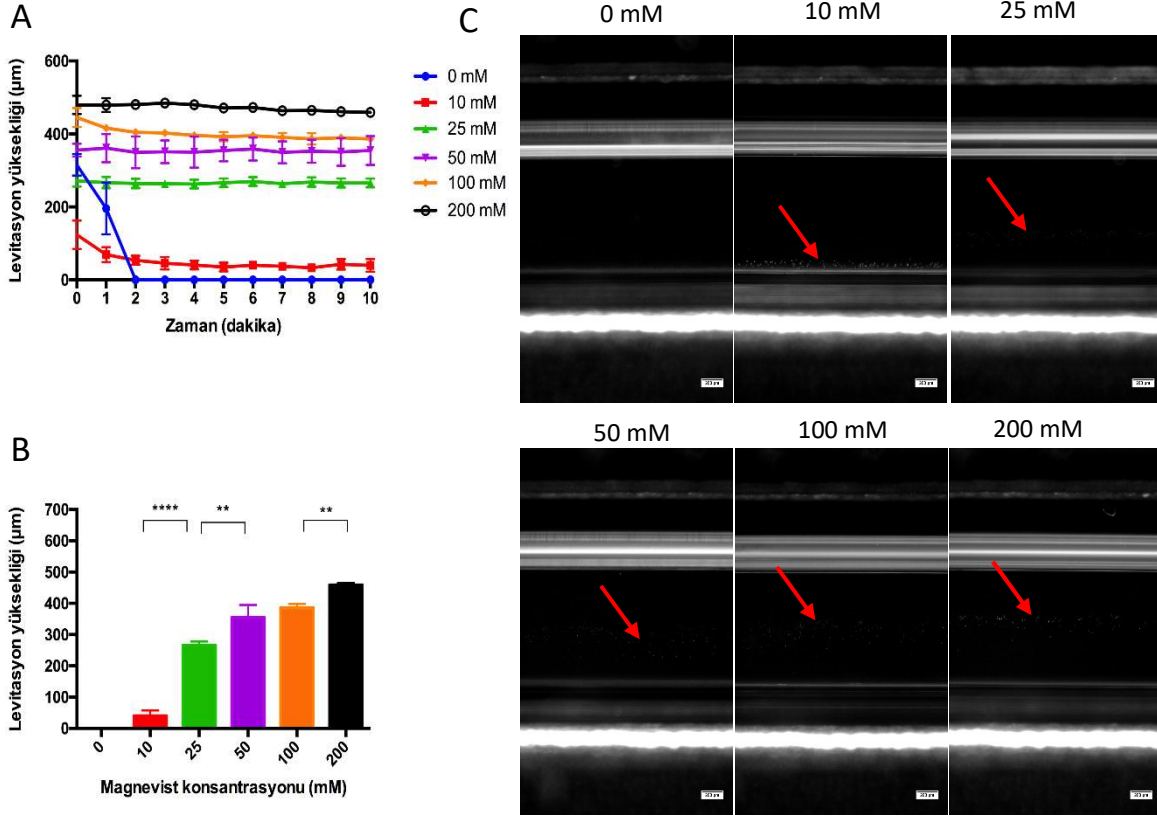
Deneylerde kullanılan Gadavist konsantrasyonunun yükselmesi hücreleri daha yüksek bir pozisyona konumlandırmanın yanı sıra hücre konum dağılımları arasındaki varyasyonların azalmasına da yol açmıştır. Standard sapmanın ortalama değere olan oranı şeklinde tanımlanan varyasyon katsayısı (coefficient of variation) yükselen konsantrasyonlarda azalmakla kalmayıp aynı zamanda farklı numuneler arasında oluşan varyasyon farklarını da azaltmıştır (Şekil 20).



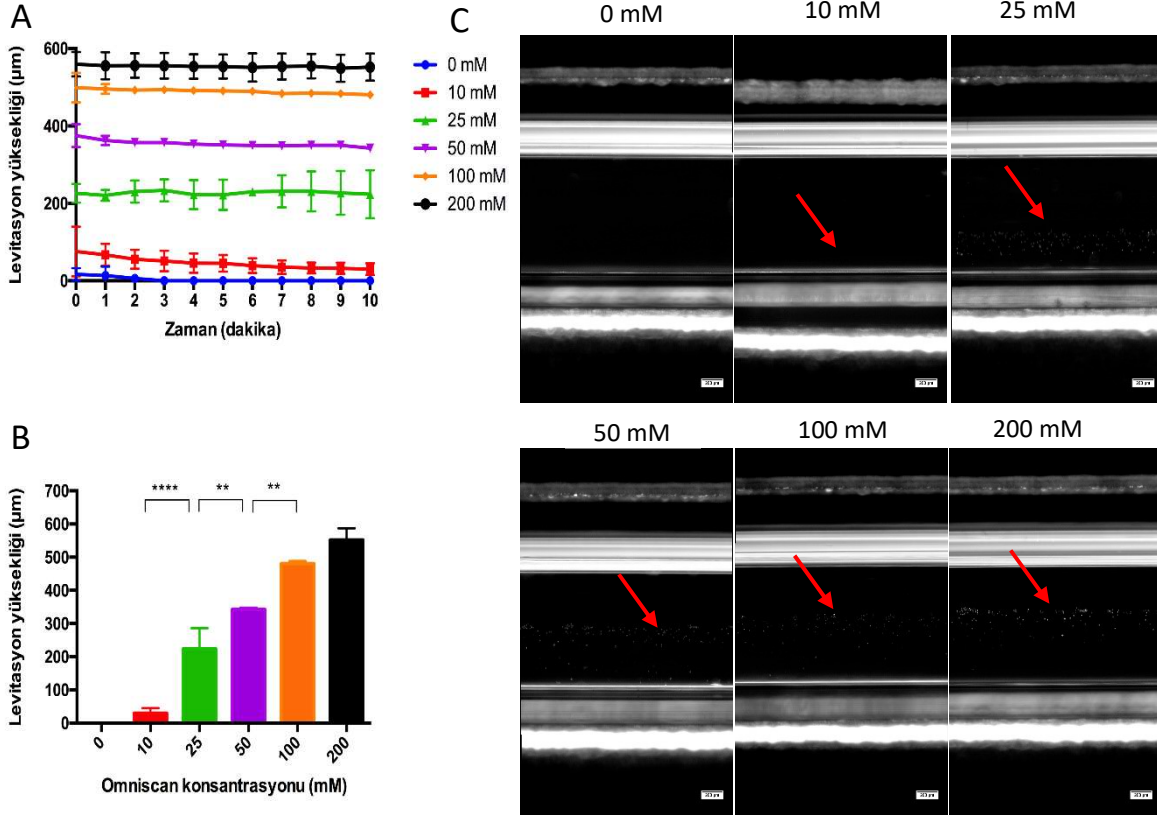
Şekil 20. Farklı Gadavist konsantrasyonları içeren besi ortamları ile süspansiyon edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğinde 10. dakika sonundaki ortalama levitasyon konumlarının varyasyon katsayıları.

4.5 Diğer MRI kontrast ajanları ile manyetik levitasyon deneyleri

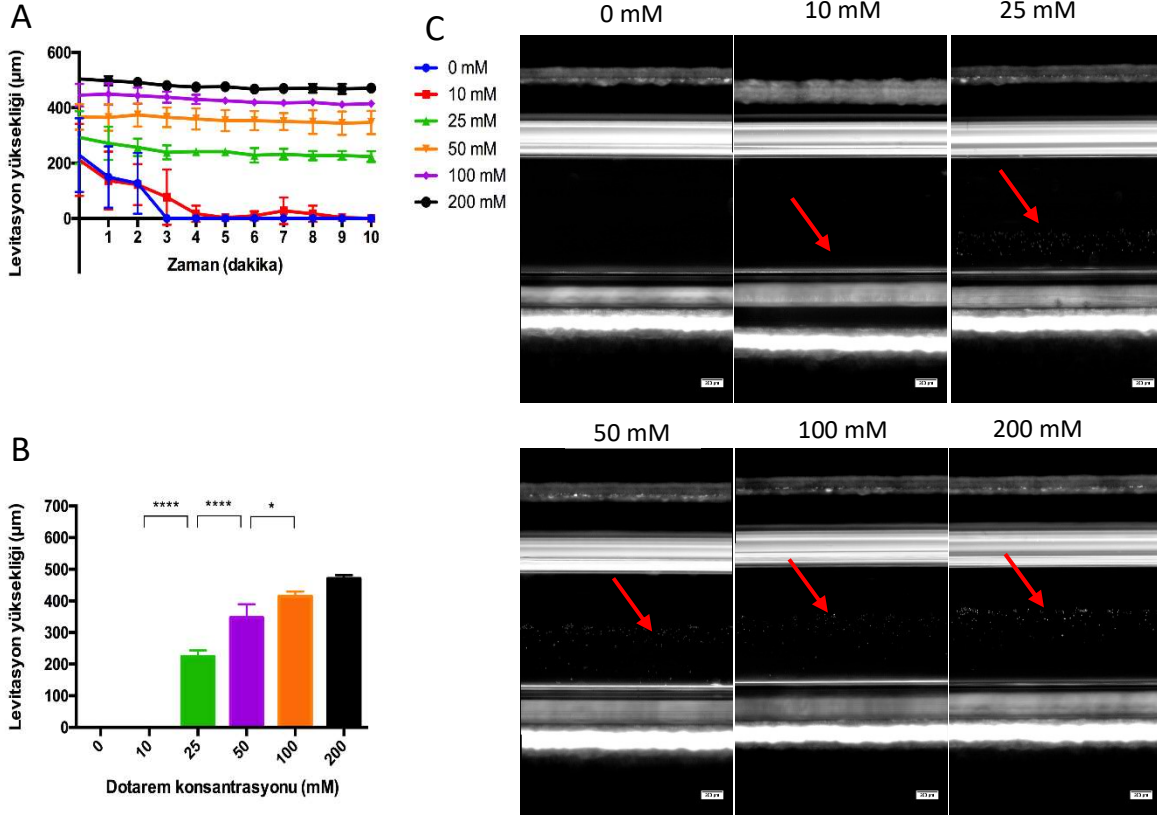
Piyasada Gadavist ajanına alternatif olarak bulunan ticari kontrast ajanlarının levitasyon potansiyellerinin testi ve karşılaştırılması için benzer şekilde önceden dondurulmuş olan D1 ORL UVA hücreleri deney öncesi çözülerek büyüme ortamında süspansiyon edilmiştir. Hücre süspansiyonuna MRI kontrast ajanları (Magnevist, Omniscan, Dotarem ve Multihance) farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 25, 50, 100 ve 200 mM) eklenmiştir. Tüm deneyler hücrelerin süspansiyon içerisindeki son konsantrasyonları 10^5 hücre/ml olacak şekilde düzenlenmiştir. Hücre süspansiyonları manyetik levitasyon düzeneğinin içerisindeki kapiler kanala yüklenmiştir ve inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile 10 dakika boyunca 1'er dakika aralıklarla görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler FIJI programı aracılığıyla daha önce ayrıntılarıyla açıklanan yöntem ile analiz edilmiş ve hücrelerin kapiler kanal zeminine olan uzaklıkları tespit edilmiştir (**Şekil 21-24**).



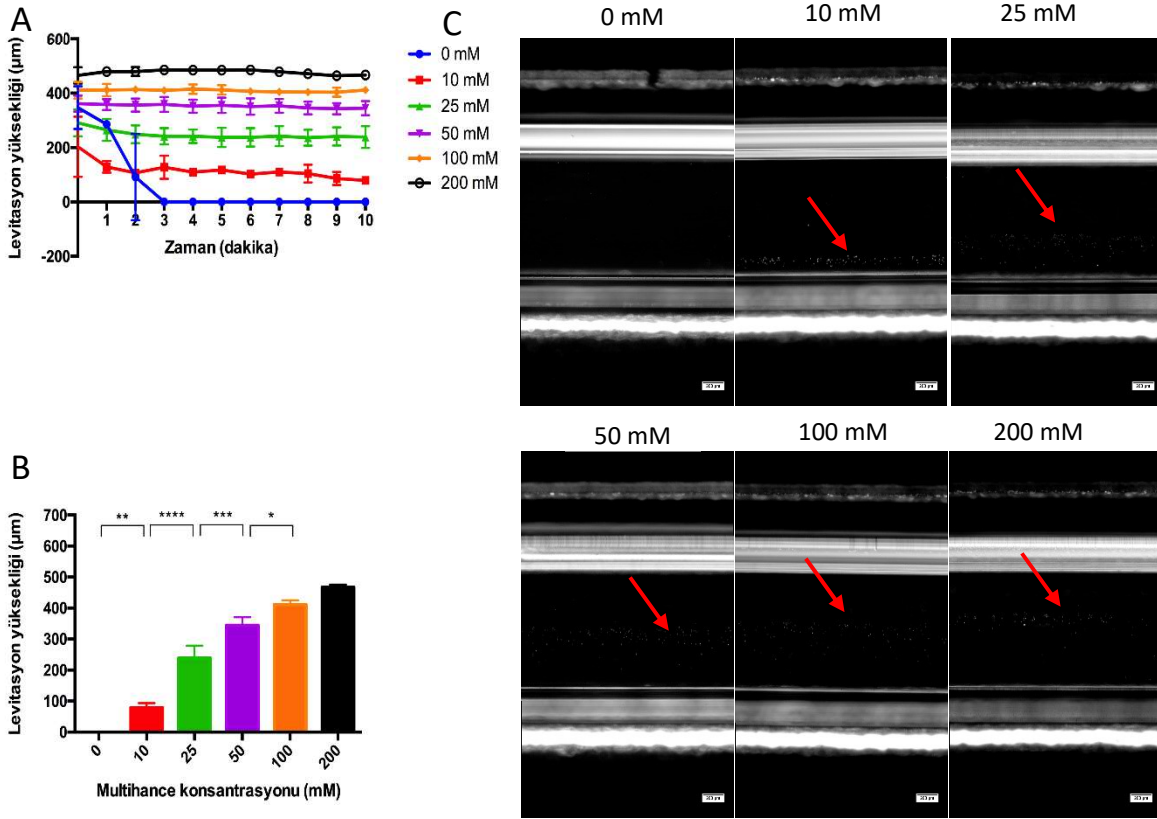
Şekil 21. Farklı konsantrasyonlarda Magnevist içeren besi ortamları ile süspansiyon edilen D1 ORL UVA hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki (A) ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi ve (B) 10. dakika ortalama levitasyon konumu. (C) hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki 10. dakika levitasyon görüntüsü. Veriler one-way analyses of variance (ANOVA) ve Tukey's multiple comparisons test kullanılarak analiz edilmiştir. Oklar levitasyon seviyelerini göstermektedir. Scale bar: 200µm. **p < 0.01; ****p < 0.0001



Şekil 22. Farklı konsantrasyonlarda Omniscan içeren besi ortamları ile süspansiyon edilen D1 ORL UVA hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki (A) ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi ve (B) 10. dakika ortalama levitasyon konumu. (C) hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki 10. dakika levitasyon görüntüsü. Veriler one-way analyses of variance (ANOVA) ve Tukey's multiple comparisons test kullanılarak analiz edilmiştir. Oklar levitasyon seviyelerini göstermektedir. Scale bar: 200µm. **p < 0.01; ****p < 0.0001

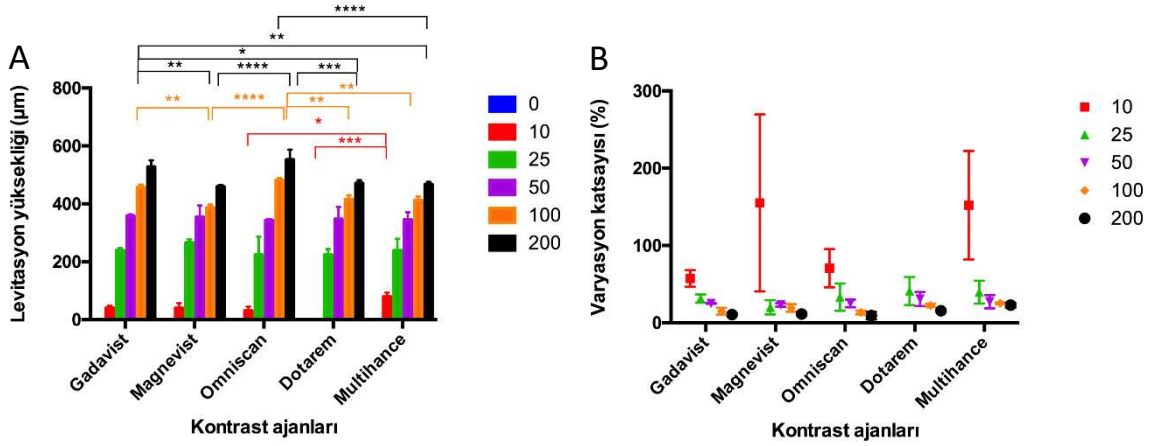


Şekil 23. Farklı konsantrasyonlarda Dotarem içeren besi ortamları ile süspansiyon edilen D1 ORL UVA hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki (A) ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi ve (B) 10. dakika ortalama levitasyon konumu. (C) hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki 10. dakika levitasyon görüntüsü. Veriler one-way analyses of variance (ANOVA) ve Tukey's multiple comparisons test kullanılarak analiz edilmiştir. Oklar levitasyon seviyelerini göstermektedir. Scale bar: 200µm. **p < 0.01; ****p < 0.0001



Şekil 24. Farklı konsantrasyonlarda Multihance içeren besi ortamları ile süspansiyon edilen D1 ORL UVA hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki (A) ortalama levitasyon konumunun zamana göre değişimi ve (B) 10. dakika ortalama levitasyon konumu. (C) hücrelerinin magnetik levitasyon düzeneğindeki 10. dakika levitasyon görüntüsü. Veriler one-way analyses of variance (ANOVA) ve Tukey's multiple comparisons test kullanılarak analiz edilmiştir. Oklar levitasyon seviyelerini göstermektedir. Scale bar: 200µm. **p < 0.01; ****p < 0.0001

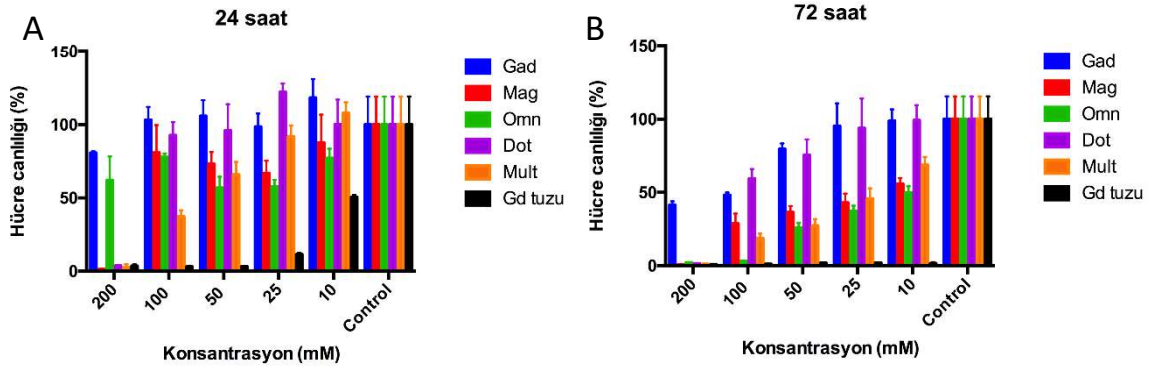
Sonuçlara göre denenen tüm MRI kontrast ajanlarının 200 mM'a kadar artan konsantrasyonlarının levitasyon düzeneğinde askıda kalan D1 ORL UVA hücrelerinin levitasyon yüksekliğini artırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Hücrelerin levitasyon yüksekliğinin dengeye gelme sürecinin ise denenen tüm ajan ve konsantrasyonlar için 10 dakikalık deney sürecinden daha kısa olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca deneylerde kullanılan kontrast ajanlarının konsantrasyonunun yükselmesi hücre konum dağılımları arasındaki varyasyonların azalmasına da yol açmıştır (**Şekil 25**).



Şekil 25. Farklı kontrast ajanlarını değişen konsantrasyonlarda içeren besi ortamları ile süspense edilen D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon düzeneğinde 10. dakika sonundaki ortalama (A) levitasyon konumları ve (B) varyasyon katsayıları. Veriler two-way analyses of variance (ANOVA) ve Tukey's multiple comparisons test kullanılarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

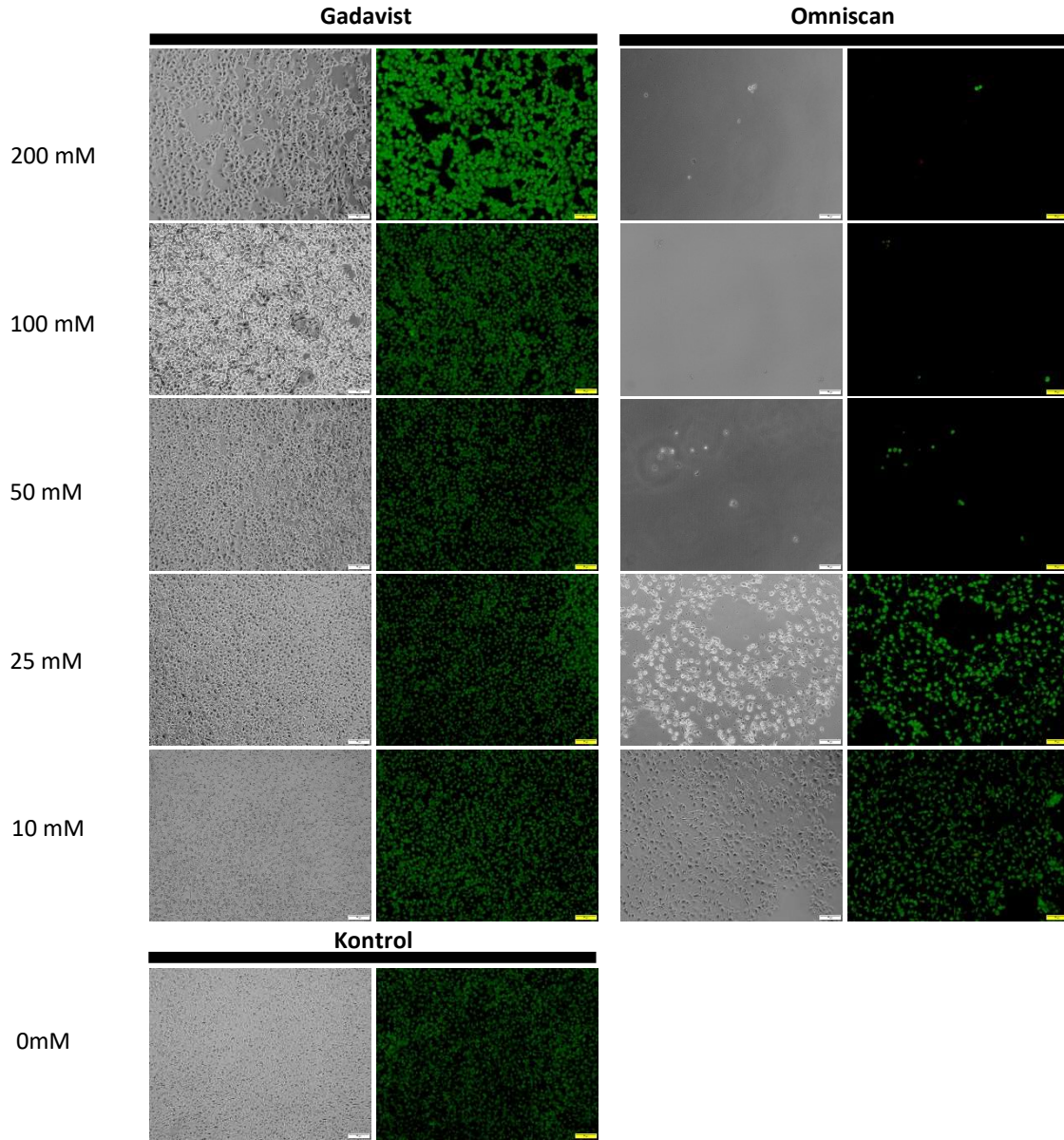
4.6 Manyetik levitasyon için kullanılan ajanların hücre canlılığına etkisi

Tüm MRI kontrast ajanlarının benzer bir levitasyon profili oluşturduğunun gözlemlenmesinden sonra, bu ajanların kısa ve uzun süreli hücre kültürü için uygunluklarını test etmek üzere hücre canlılık testleri yapılmıştır. D1 ORL UVA hücreleri 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara ekilmiş ve standart büyüme ortamı (DMEM + %10 FBS + %1 P/S) içerisinde büyütülmüştür. Kültürün başlangıcından 48 saat sonra besi ortamı uzaklaştırılarak farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 25, 50, 100 ve 200 mM) Gadavist, Magnevist, Omniscan, Dotarem, Multihance ve Gadolinyum (Gd) tuzu içeren besi ortamları hücrelerin üzerine eklenmiştir. Bu ortamlarda 24 saat ve 72 saat kültürlenmiş hücrelere MTT testi uygulanmış ve spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go) ile örnekler analiz edilmiştir (**Şekil 26**). Veriler two-way analyses of variance (ANOVA) ve Tukey's multiple comparisons test kullanılarak analiz edilmiştir. 24 saat sonunda sadece Gadavist ajanının denenen hiçbir konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı derecede hücre canlılığını etkilemediği ($p > 0.05$) saptanmıştır. 72 saat sonunda ise denenen en yüksek konsantrasyonda (200 mM) kontrole oranla en yüksek hücre canlılığı Gadavist içeren besi ortamında kültürlenmiş hücrelerde gözlenmiştir.

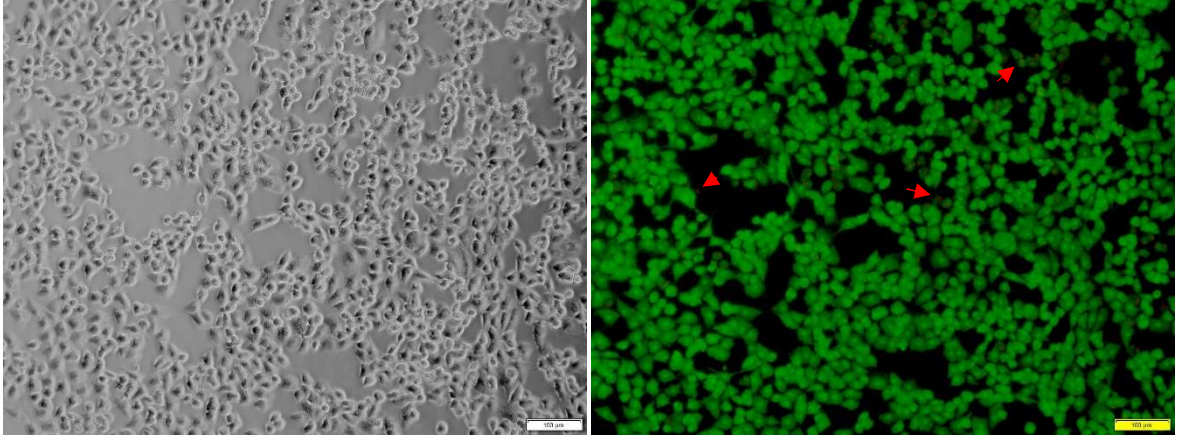


Şekil 26. Farklı kontrast ajanlarının değişen konsantrasyonlarda içeren besi ortamlarında (A) 24 ve (B) 72 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin MTT analizi sonucunda elde edilen canlılık oranları.

Hücrelerin 72 saat MRI kontrast ajanlarıyla muamelesinin ardından gerçekleştirilen MTT analizi sonucunda test edilen ajanlar arasında hücre canlılığını negatif yönde en az etkileyen ajanın Gadavist ve en fazla etkileyenin ise Omniscan olduğu görülmüştür. Bu deneyin ardından bu iki kontrast ajanının hücre canlılığına etkisi LIVE/DEAD assay ile de test edilmiştir (**Şekil 27**). D1 ORL UVA hücreleri 4×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu plastiğe ekilmiş ve standart büyüme ortamı (DMEM + %10 FBS + %1 P/S) içerisinde büyütülmüştür. Kültürün başlangıcından 48 saat sonra besi ortamı uzaklaştırılarak farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 25, 50, 100 ve 200 mM) Gadavist ve Omniscan içeren besi ortamları hücrelerin üzerine eklenmiştir. Bu ortamlarda 72 saat kültürlenmiş hücrelere üreticinin protokolüne uygun biçimde LIVE/DEAD assay (Sigma) uygulanmış ve inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile hücreler görüntülenmiştir. Sonuçlara göre 100 mM'a kadar artan Gadavist konsantrasyonlarında kültürlenmiş hücrelerin yoğunluğunun ve morfolojilerinin kontrol grubuna benzer olmasına rağmen, Omniscan ajanının denenen en düşük konsantrasyonu (10 mM) bile hücre yoğunluğunu azaltıcı etki göstermiştir. Ayrıca 200 mM Gadavist içeren besi ortamında kültürlenmiş hücrelerin canlılık oranının da daha düşük konsantrasyonlarda kültürlenmiş hücrelere oranla düştüğü gözlemlenmiştir (**Şekil 28**).



Şekil 27. Farklı konsantrasyonlarda Gadavist ve Omniscan içeren besi ortamlarında 72 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin LIVE/DEAD assay sonucu elde edilen görüntüleri (scale bar 100 μ m).

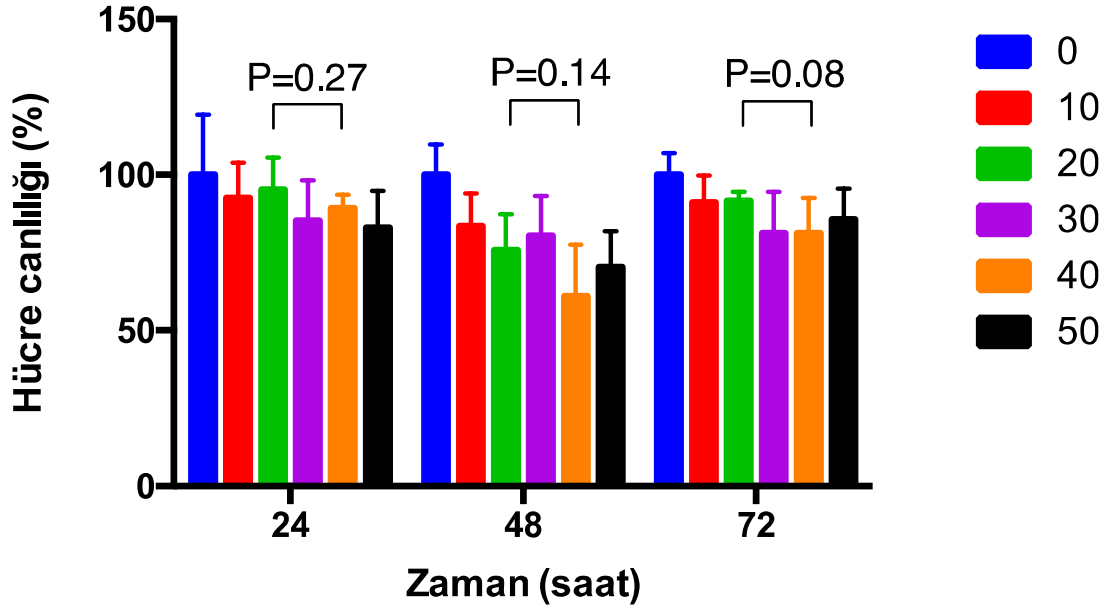


Şekil 28. 200 mM Gadavist içeren besi ortamlarında 72 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin LIVE/DEAD assay sonucu elde edilen görüntüleri. Calcein-AM ile boyanan canlı hücreler yeşil, Propidium Iodide (PI) ile boyanan ölü hücre nükleusları ise kırmızı olarak görüntülenmektedir. (Oklar, ölü hücrelere ait olan ve kırmızı olarak görüntülenmiş nükleus örneklerini işaret etmektedir.)

Negatif magnetoferez prensibi ile levite edilerek kültürlenecek hücrelerin besi ortamlarına eklenen ticari MRI kontrast ajanları besi ortamını değişen oranlarda seyreltmektedir (**Tablo 1**). Çalışma kapsamında kullanılan MRI kontrast ajanlarının konsantrasyonları 1000 mM (Gadavist) ve 500 mM (Magnevist, Omniscan, Dotarem, Multihance) olup deneyler süresince kullanılan en yüksek konsantrasyonda (200 mM) besi ortamlarının sırasıyla %20 ve %40'ını oluşturmaktadırlar. Ticari ürünlerin sunumlarından kaynaklanan bu farkın deneysel bir etkisi olup olmadığını değerlendirmek için D1 ORL UVA hücreleri 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plastiğe ekilmiş ve standart büyüme ortamı (DMEM + %10 FBS + %1 P/S) içerisinde büyütülmüştür. Kültürün başlangıcından 48 saat sonra besi ortamı uzaklaştırılarak farklı oranlarda (% hacim/hacim) PBS içeren (% 0, 10, 20, 30, 40, 50) besi ortamları hücrelerin üzerine eklenmiştir. Bu ortamlarda 24, 48 ve 72 saat kültürlenmiş hücrelere MTT testi uygulanmış ve spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go) ile örnekler analiz edilmiştir. Veriler student's t-test kullanılarak analiz edilmiştir ve deneyler süresince kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 200 mM ajan konsantrasyonunu taklit eden %20 ve %40 PBS içeriğine sahip besi ortamlarında büyütülen hücrelerin canlılıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) görülmemiştir (**Şekil 29**).

Tablo 3. Deneylerde kullanılan ticari kontrast ajanlarının konsantrasyonları ve besi yerine eklendiklerinde kapladıkları hacim.

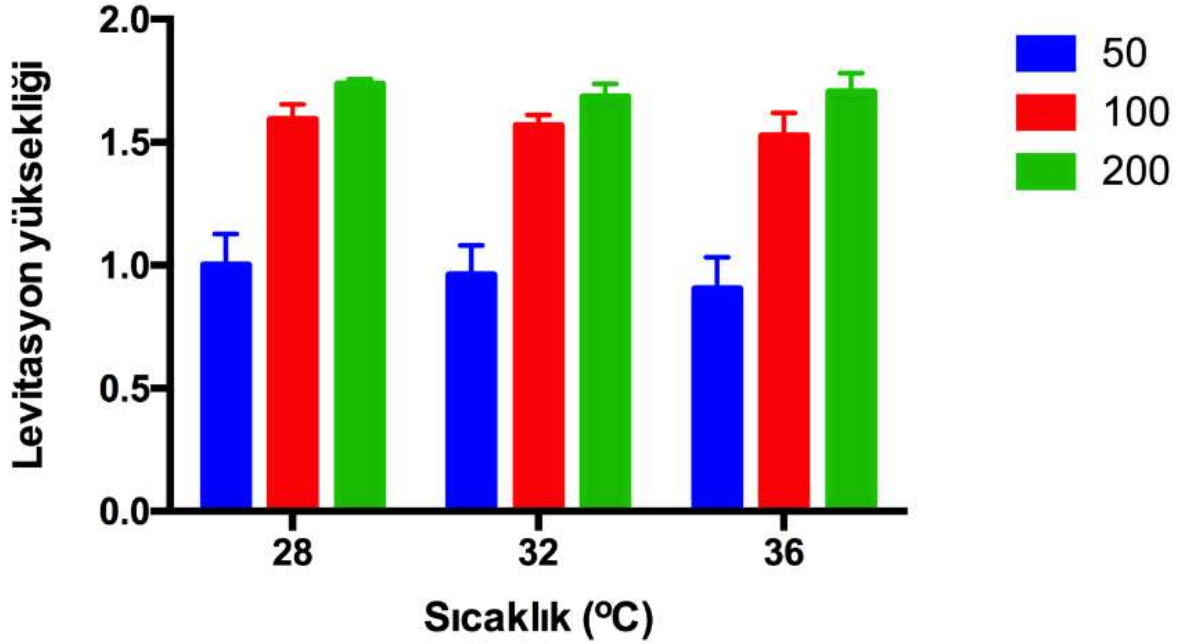
Kontrast ajanları	Kontrast ajanlarının Gd konsantrasyonu	200 mM Gd solüsyonu için gerekli seyreltme	200 mM Gd solüsyonun besi ortamı içeriği % (v/v)	200 mM Gd içeren solüsyon için besi ortamına eklenmesi gereken % solüsyon miktarı (v/v)
Gadavist	1000 mM	1:5	80	20
Magnevist, Omniscan, Dotarem, Multihance	500 mM	1:2,5	60	40



Şekil 29. Farklı miktarlarda PBS içeren besi ortamlarında (% hacim/hacim) 24, 48 ve 72 saat kültürlen D1 ORL UVA hücrelerinin MTT analizi sonucunda elde edilen canlılık oranları.

4.7 Ortam sıcaklığının manyetik levitasyona etkisi

Hücrelerin kısa süreli deneylerde buldukları ortam sıcaklığı ile uzun süreli olarak bulunmaları planlanan inkübatör sıcaklığı arasında levitasyon yüksekliği açısından fark olup olmadığı test edilmiştir (**Şekil 30**). Veriler student's t-test kullanılarak analiz edilmiştir ve D1 ORL UVA hücrelerinin levitasyon yüksekliklerinin tüm konsantrasyonlar için (50, 100 ve 200 mM) değişen sıcaklıklardan istatistiksel olarak anlamlı derecede etkilenmediği saptanmıştır ($p>0.05$).



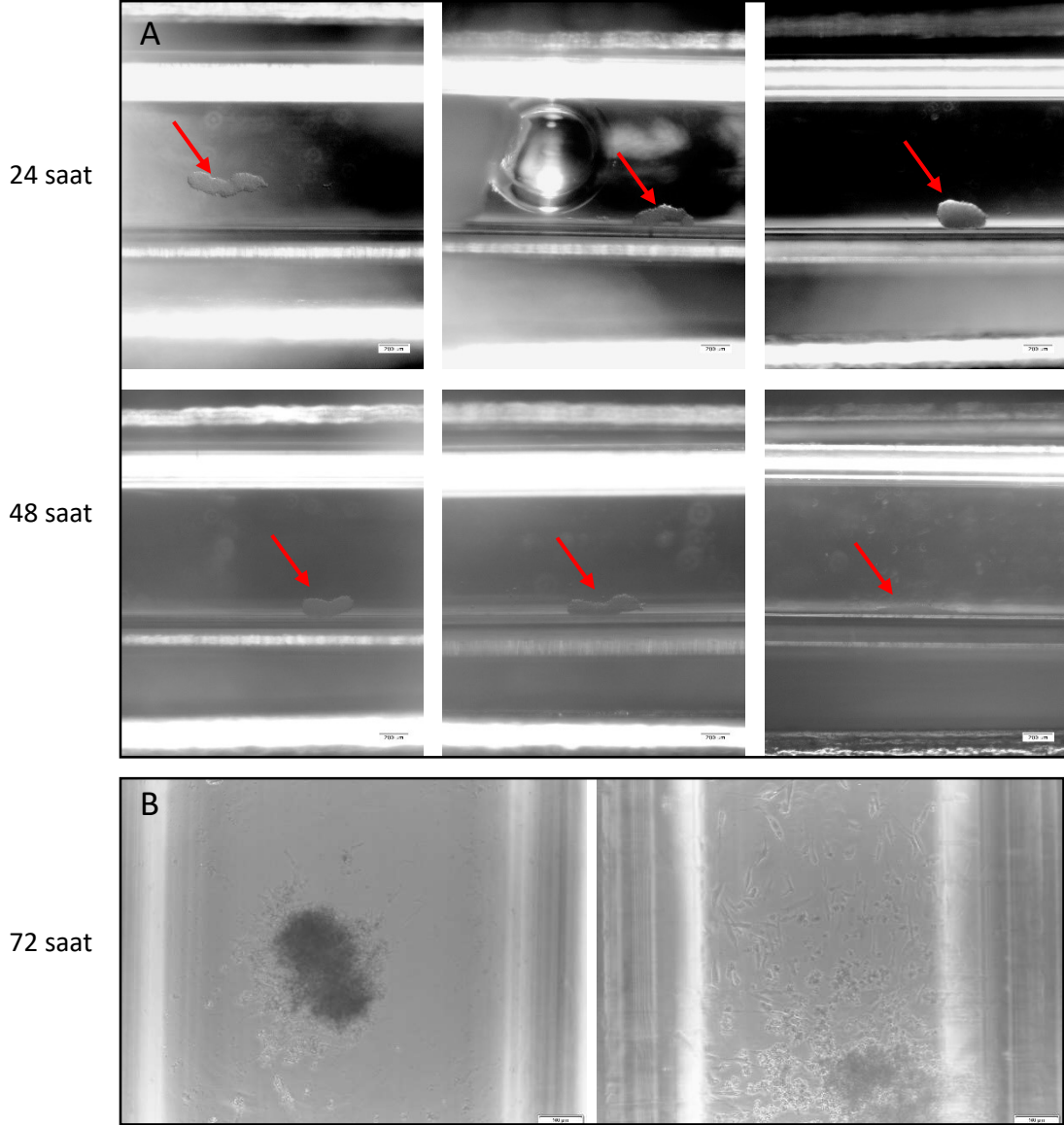
Şekil 30. D1 ORL UVA hücrelerinin 50, 100 ve 200 mM Gadavist içeren besi ortamı ile magnetik levitasyon düzeneğinde farklı sıcaklıklarda (28, 32 ve 36°C) 3 dakika levitasyonu ile elde edilmiş konumlanma yükseklikleri. Tüm levitasyon yükseklikleri 50 mM Gadavist içeren besi ortamında 28°C'de levite edilmiş hücrelerin yüksekliklerine normalize edilmiştir.

4.8 Manyetik levitasyon ile uzun süreli hücre kültürü

Kısa süreli deneylerin ardından hücrelerin manyetik levitasyonda uzun süreli kültürlenme potansiyelleri test edilmiştir. Kültürü devam eden D1 ORL UVA hücreleri tripsinize edilerek 50 mM Gadavist içeren besi ortamında 10^5 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon edilmiştir. Bu ajan ve konsantrasyon önceki çalışmalar sonucunda uygun bulunmuştur. Bu süspansiyon düzeneği içerisine yerleştirilecek kapılara yüklenmiştir ve standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat sonunda inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile görüntülenmiştir.

Kültürün 24. saatinde hücrelerin askıda kümelenmediği gözlemlenmiştir (**Şekil 31**). Fakat kültürün hem 24. hem de 48. saatinde levitasyonu süren hücre kümelerinin yanı sıra kültür ortamının zeminine çökmüş hücre kümelerine de rastlanmıştır. Kültürün 72. saatinde ise hücre

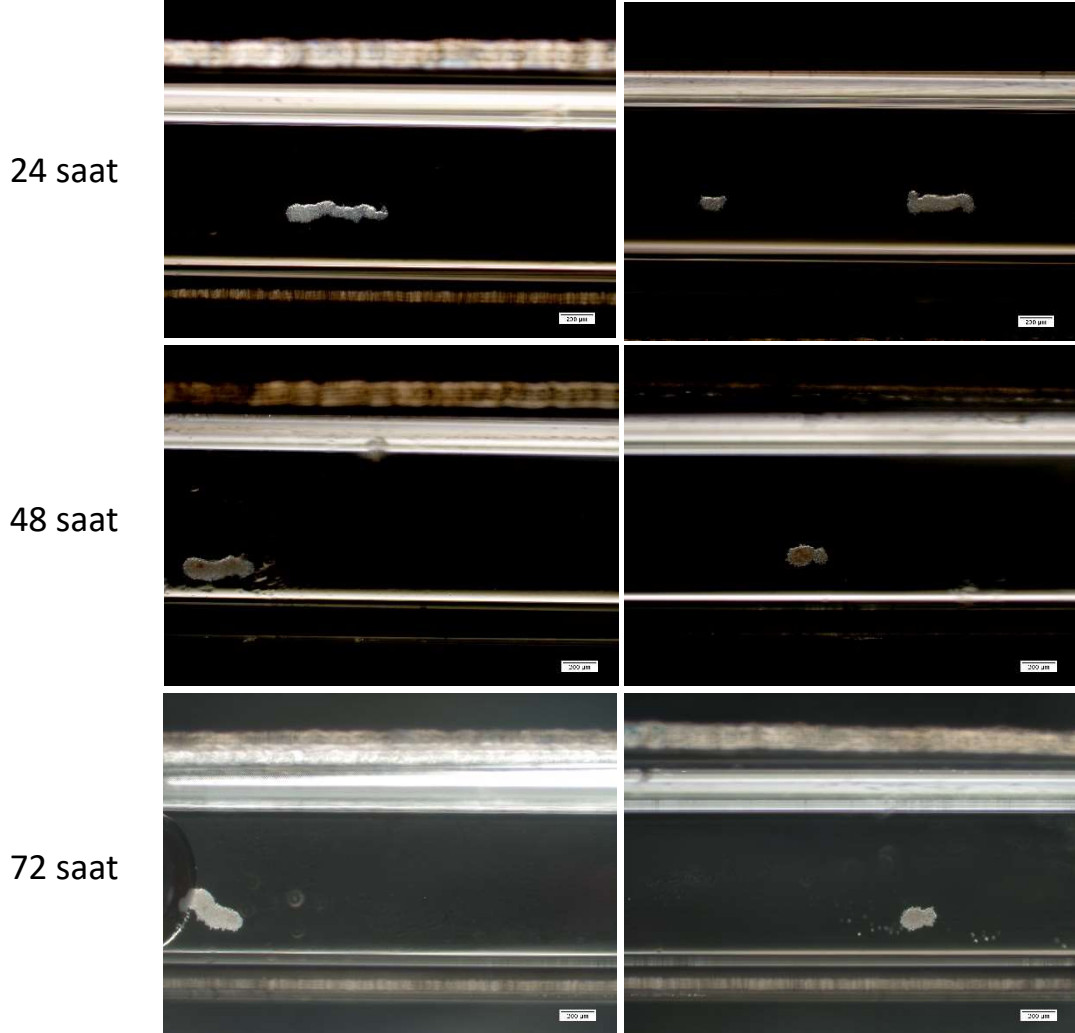
kümelere kapiler zemine yayılmaya başladığı gözlemlenmiştir. Bu aşamada Gadavist konsantrasyonunun daha önce hücre canlılığı açısından güvenli olduğu tespit edilmiş olan 100 mM'a yükseltilmesine karar verilmiştir.



Şekil 31. 50 mM Gadavist içeren besi ortamlarında (A) 24 ve 48 saat manyetik levitasyon düzeneği içerisinde kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin horizontal görüntüsü (kırmızı oklar hücre gruplarını göstermektedir) ve (B) 72 saat sonra kapilerin vertikal görüntüsü.

Kültürü devam eden D1 ORL UVA hücreleri tripsinize edilerek 100 mM Gadavist içeren besi ortamında 10^5 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon edilmiştir ve düzenek içerisine yerleştirilecek kapilere yüklenmiştir. Levitasyon düzeneği içerisindeki hücreler standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat sonunda inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile

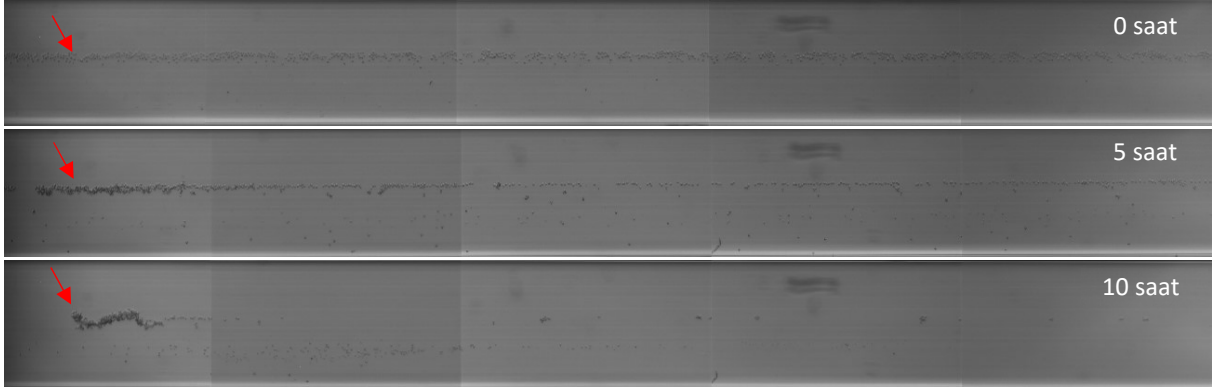
görüntülenmiştir. Kültürün 24 ve 48. saatinde olduğu gibi 72. saatinde de levitasyonunu sürdüren hücre kümelerinin varlığı gözlemlenmiştir (**Şekil 32**).



Şekil 32. 100 mM Gadavist içeren besi ortamlarında 24, 48 ve 72 saat manyetik levitasyon düzeneği içerisinde kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin görüntüsü.

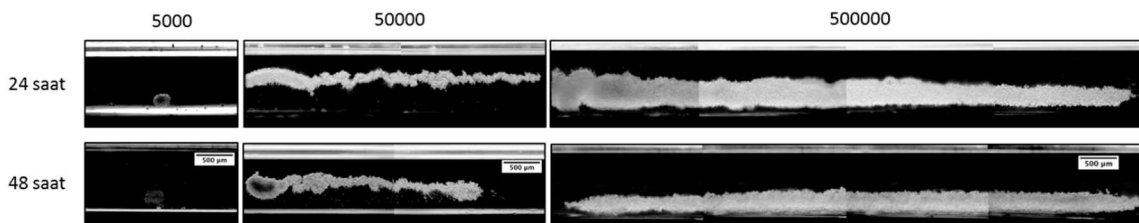
Ayrıca hücre kümelenmesinin incelenebilmesi amacıyla hücreler inkübasyon sırasında görüntülenmişlerdir. Bunun için kültürü devam eden D1 ORL UVA hücreleri tripsinize edilerek 100 mM Gadavist içeren besi ortamında 10^5 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon edilmiştir ve düzenek içerisine yerleştirilecek kapılara yüklenmiştir. Hücrelerin yüklendiği levitasyon düzeneği sıcaklığı 37°C olacak şekilde önceden ayarlanmış mikroskop gözlem haznesine yerleştirilmiştir. Hücreler 10 saat boyunca 15'er dakika aralıklarla inverted mikroskop (ZEISS)

ile görüntülenmiştir (**Şekil 33**, ayrıca **Video 7**). Sonuçlara göre hücreler ortalama 6 saat içerisinde kümelenip biraraya gelmekte ve oluşturdukları gruplara tutunmaktadırlar.



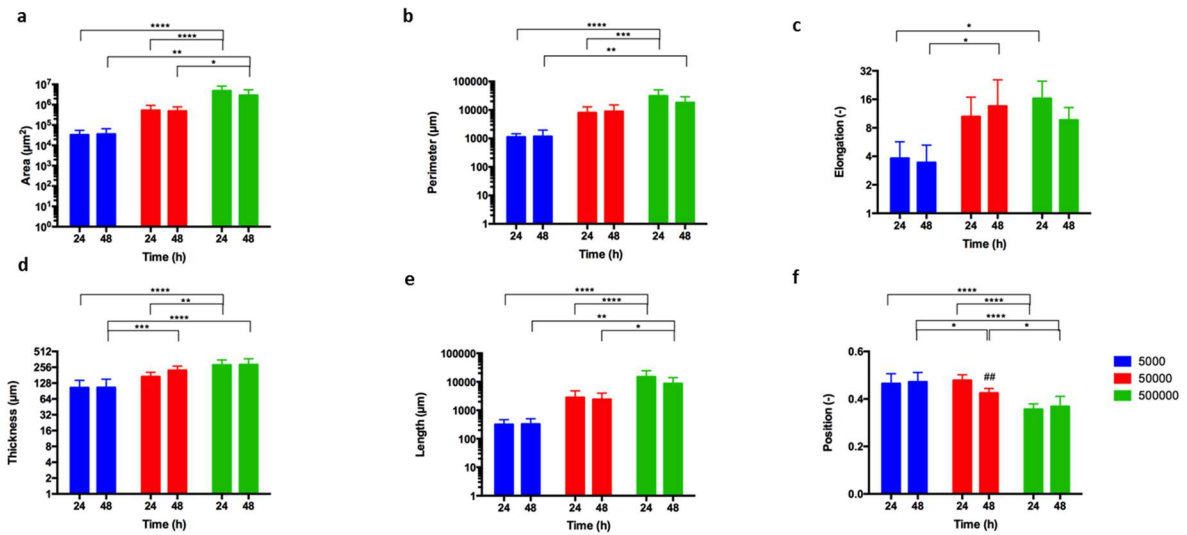
Şekil 33. 100 mM Gadavist içeren besi ortamında manyetik levitasyon düzeneği içerisinde kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin 0., 5. ve 10. saat levitasyon görüntüsü (kırmızı ok hücre seviyelerini gösterir).

Levitasyon kültürü sırasında kullanılan hücre sayılarındaki parametrik artışların oluşan hücre kümesinin fiziksel özelliklerin etkisinin incelenmesinin ilerleyen deneyler için (hücre döngüsü, mRNA miktarı) önemli olduğu düşünülmüştür. Bu anlamda, kültürü devam eden D1 ORL UVA hücreleri tripsinize edilerek 100 mM Gadavist içeren besi ortamında 10^5 , 10^6 ve 10^7 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon edilmiştir (sırasıyla 5000, 50000 ve 500000 hücre/kapiler) ve manyetik levitasyon sistemine yüklenmiştir. Levitasyon düzeneği içerisindeki hücreler standart kültür koşullarda inkübe edilmiştir. Hücre kümeleri 24 ve 48 saat sonunda inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile görüntülenmiştir (**Şekil 34**).



Şekil 34. Farklı yoğunluklarda (5000, 50000 ve 500000 hücre/kapiler) hücre ekimi gerçekleştirilen D1 ORL UVA hücrelerinin 100 mM Gadavist içeren besi ortamında ve manyetik levitasyon düzeneği içerisinde 24 ve 48. saat kültür görüntüleri.

Hücre kümelerinin tüm geometrik özellikleri FIJI ile belirlenmiştir. Görüntülenen hücre kümelerinin toplam alanı (area, A), çevre uzunluğu (perimeter, P) ve ağırlık merkezlerinin koordinatları program aracılığıyla doğrudan elde edilmiştir. Elongasyon (E) değeri; $E = P^2 / (4\pi \times A)$ formülü ile hesaplanmıştır. Hücre kümelerinin pozisyonunun belirlenmesi için; hücre kümelerinin görüntülediği alan hem hücre kümeleri hem de mıknatıslar odaklanarak iki kez fotoğraflanmıştır ve hücre kümesinin kütle merkezinin iki mıknatıs arasındaki konumu (kapilerin altında kalan mıknatısın üst sınırı=0, üstünde kalan mıknatısın alt sınırı=1 olarak kabul edilerek) belirlenmiştir. Hücre kümelerinin ortalama kalınlığının belirlenmesi için; hücre kümelerinin üstüne grid eklenmiş, birbirine eşit uzaklıkta 5 farklı nokta için kalınlık değerleri ölçülmüş ve ortalama değerleri hesaplanmıştır. Hücre kümelerinin uzunluğunun belirlenmesi için ise; kümenin başladığı ilk noktanın üzerine düştüğü düzlem ile bittiği son noktanın üzerine düştüğü düzlem arasındaki uzaklık ölçülmüştür. Veriler two-way analyses of variance (ANOVA) ve Sidak post hoc test kullanılarak analiz edilmiştir (**Şekil 35**).



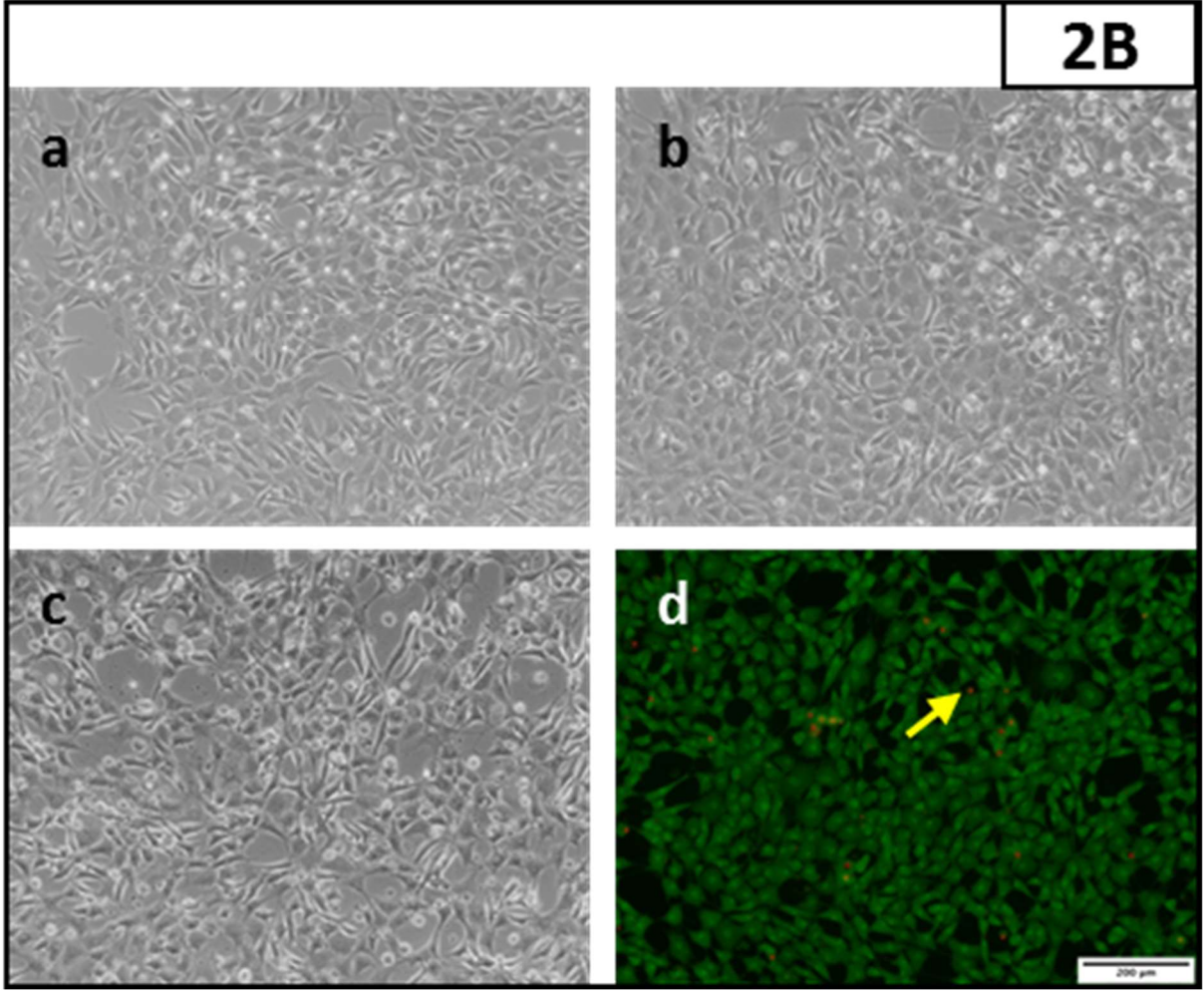
Şekil 35. Farklı yoğunluklarda (5000, 50000 ve 500000 hücre/kapiler) hücre ekimi gerçekleştirilen D1 ORL UVA hücrelerinin 100 mM Gadavist içeren besi ortamında ve manyetik levitasyon düzeneği içerisinde 24 ve 48. saat kültür sonucunda oluşturduğu hücre kümelerinin (a) alanı, (b) çevre uzunluğu, (c) elongasyon değeri, (d) kalınlığı, (e) uzunluğu ve (f) mıknatıslar arasındaki pozisyonu.

Sonuçlara göre D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon sisteminde 24 veya 48 saat kültürlenmesi sonucunda gözlemlenen hücre kümelerinin alanı, çevre uzunluğu, elongasyon değeri, kalınlığı ve uzunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Fakat, ekilen hücre sayısının artırılması şekil parametrelerinde değişikliklere neden olmuştur. Manyetik levitasyon sisteminde 500000 hücre kültürlendiğinde (24 saat) oluşan hücre kümelerinin alanı, çevre uzunluğu, elongasyon değeri, kalınlığı ve

uzunluğu 5000 hücre ile başlatılan kültür sonucunda oluşan hücre kümelerine kıyasla sırasıyla 87.6, 16.1, 2.5, 2.8 ve 21.1-kat fazla olduğu belirlenmiştir. Hücre kümelerinin boyutundaki bu artış, hücrelerin düşük manyetik alanda kalma eğilimi sebebiyle kümelerin kalınlığından ziyade uzunluğu yönünde olmuştur. Kümelerin uzunluğundaki artışın kalınlığındaki artışa oranla 9.9 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Hücre kümelerinin mıknatıslar arasındaki pozisyonu ise hücre sayısı arttıkça düşmüştür. Bunun sebebinin daha sıkı hücre kümelerinin oluşması olabileceği düşünülmektedir.

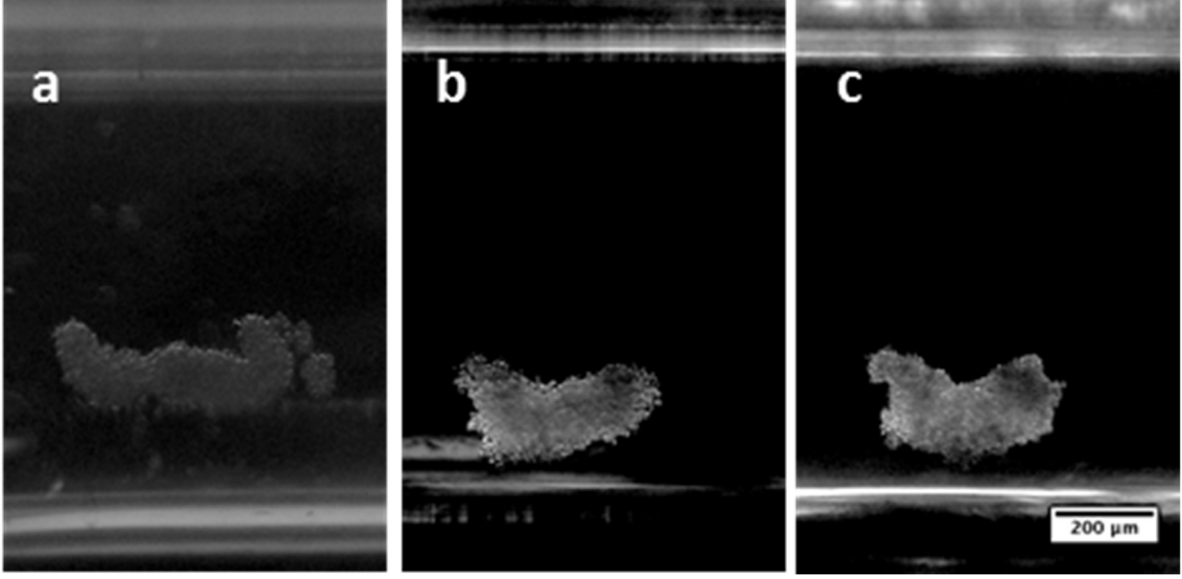
Gadavist kontrast ajanının 72 saat boyunca 100mM konsantrasyonlarda hücre canlılığı için olumsuz bir etki oluşturmadığı gözlemlenmişti. Fakat bu deneyler 2 boyutlu kültür koşullarında yapıldığı için üç boyutlu ve ağırlıksız ortam varlığının 100mM kontrast ajanı ile beraber uzun vadeli deneylerde hücre canlılığına olumsuz etki yapıp yapmayacağı sorusunu cevapsız bırakmıştır. Bu soruyu cevaplayabilmek için, D1 ORL UVA hücreleri hem 2 boyutlu kültürde hem de 3 boyutlu manyetik levitasyon sisteminde (5000 hücre/kapiler) 100 mM Gadavist ile 120 saat boyunca kültürlenmiştir. Kültürün 120. saatinde hücrelere protokole uygun biçimde LIVE/DEAD assay (Sigma) uygulanmış ve inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile hücreler görüntülenmiştir. 3 boyutlu hücre kümelerinin canlılığı hem küme şeklini koruyarak hem de pipetleme yolu ile tek hücre süspansiyonu haline getirilerek gerçekleştirilmiştir.

İki boyutlu kültürde 100 mM Gadavist ile kültürlenmiş hücrelerin kültürün 24., 72. ve 120. saatinde sağlıklı morfolojilerini koruduğu ve 120 saat sonunda kültürde az sayıda ölü hücrenin bulunduğu gözlemlenmiştir (**Şekil 36**).



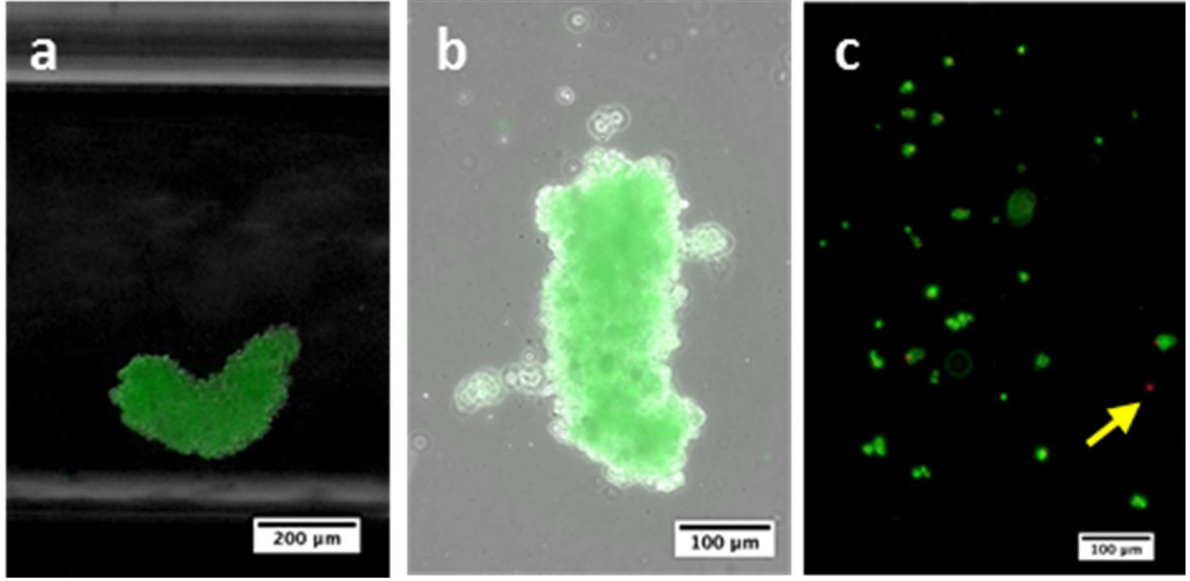
Şekil 36. 100 mM Gadavist içeren besi ortamı ile (a) 24, (b) 72 ve (c) 120 saat kültürlenmiş (2 boyutlu; 2B) D1 ORL UVA hücrelerinin kültür görüntüleri ve 120 saat sonunda LIVE/DEAD assay sonucu elde edilen görüntüsü. Calcein-AM ile boyanan canlı hücreler yeşil, Propidium Iodide (PI) ile boyanan ölü hücre çekirdekleri ise kırmızı olarak görüntülenmektedir. (Ok, ölü hücreye ait olan ve kırmızı olarak görüntülenmiş bir hücre çekirdeği örneğini işaret etmektedir).

Üç boyutlu manyetik levitasyon kültüründe ise hücrelerin kültürün 24., 72. ve 120. saatinde kümelenmiş şekillerini koruduğu ve 120 saat sonunda hücre kümelerini oluşturan hücrelerin yapılarını korudukları gözlemlenmiştir (**Şekil 37**).



Şekil 37. Manyetik levitasyon ile oluşturulan (100 mM Gadavist); D1 ORL UVA hücre kümelerinin (a) 24, (b) 72 ve (c) 120 saat kültür görüntüleri. Görüntüler aynı hücre kümesine aittir.

Ayrıca kümeler 120 saat sonunda kapiler içerisindeyken calcein-AM ile boyanmış ve yeşil sinyal vererek canlılıklarını yüksek oranda koruduklarını göstermişlerdir (**Şekil 38a-b**). Son olarak kümelerin içerisindeki ölü hücrelerin daha iyi gözlemlenmesi amacıyla kümelerin yumuşak pipetleme ile disasosiyeye hale getirilerek tek hücre süspansiyonu haline getirilmesi ve LIVE/DEAD assay uygulanması sonucunda hücrelerin büyük çoğunluğunun canlı olduğu gözlemlenmiştir (**Şekil 38c**).

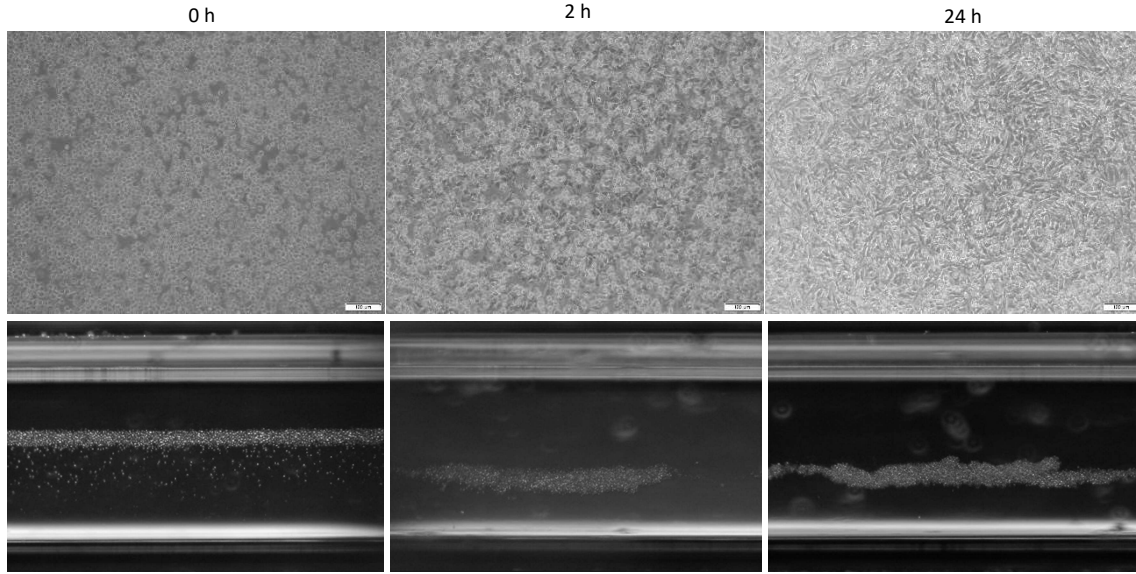


Şekil 38. Manyetik levitasyon ile oluşturulan (100 mM Gadavist, 120 saat); D1 ORL UVA hücre kümelerinin manyetik levitasyon düzeneğinin (a) içerisinde ve (b) dışarısında Calcein-AM boyaması sonucunda elde edilen görüntüleri ve (c) hücre kümelerinden elde edilen tek hücre süspansiyonunun LIVE/DEAD assay sonucu elde edilen görüntüsü. Calcein-AM ile boyanan canlı hücreler yeşil, Propidium Iodide (PI) ile boyanan ölü hücre çekirdekleri ise kırmızı olarak görüntülenmektedir. (Ok, ölü hücreye ait olan ve kırmızı olarak görüntülenen bir çekirdek örneğini işaret etmektedir.

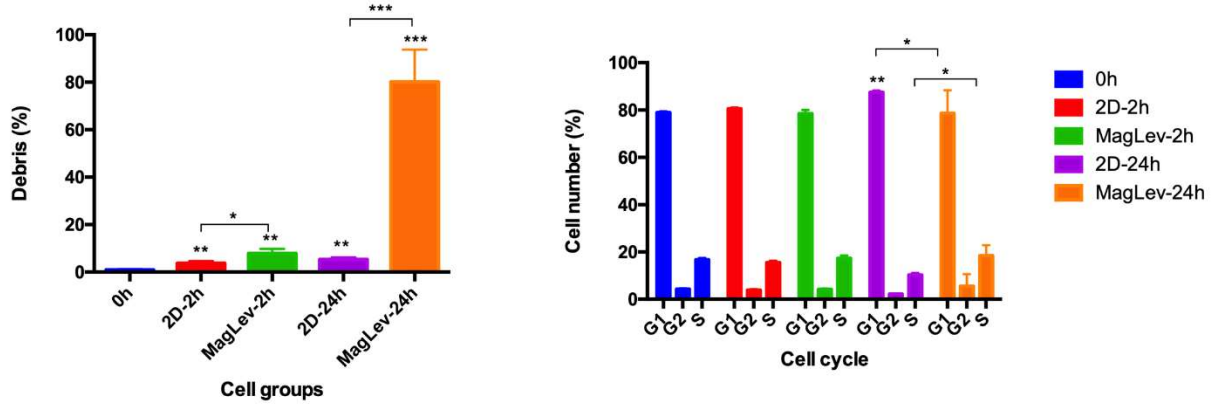
4.9 Manyetik levitasyon ile hücre kültürünün hücre canlılığına etkisi

Manyetik levitasyon kültürünün hücre döngüsü evreleri üzerine etkilerini test etmek için, D1 ORL UVA kemik iliği kök hücreleri, paramanyetik ortamda (100 mM Gd^{3+}) 10^6 hücre/mL konsantrasyonunda süspansiyon edilmiş ve standart manyetik levitasyon cihazımızda levite edilmiştir. Kontrol hücre grubu olarak ise, hücreler 100 mM Gd^{3+} içeren besi ortamı içerisinde 48 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 250000 hücre/kuyucuk (250 μ l/kuyucuk) konsantrasyonunda ekilmiştir. Kültürün başlangıcından 2 saat sonra ve 24 saat sonra hücreler manyetik levitasyon kültüründen ve 2 boyutlu kontrol kültüründen toplanmıştır. Kontrol grubu olarak ise hücreler kültürün başlatıldığı anda da toplanmıştır (0 saat) (**Şekil 39**). Levitasyon kültür gruplarında tek bir deneysel örnek elde etmek amacıyla 5 adet levitasyon kültür örneği birleştirilmiş (pooling) ve böylece bir örnekteki hücre sayısı deney için yeterli sayıda arttırılmıştır. Hücre döngüsü evrelerini belirlemek için, tüm deneysel gruplara ait hücreler Propidium iodit (PI) ile boyanarak, akış sitometresi tarafından ölçülmüştür (**Şekil 40**). Tüm örneklerde ölü hücreler ve diğer çökeltilerden oluşan debris miktarı 0. saat örneğine kıyasla anlamlı derecede artmıştır. Ayrıca manyetik levitasyonda kültürlen hücrelerin debris miktarlarının 2 boyutlu kültürde kültürlen hücrelere göre de daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Hücre döngüsü evreleri için ise, 24 saatlik 2 boyutlu kültür hariç diğer tüm deney

gruplarında gözlemlenen G1, G2 ve S fazı oranları ile 0. saat kontrol gözlemlenen evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark gözlemlenmemiştir. Fakat 24 saatlik kültür sonucunda manyetik levitasyonda kültürlenen hücrelerin 2 boyutlu kültüre kıyasla G1 evresindeki hücre oranının daha az, S evresindeki hücre oranının ise daha fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 39. 100 mM Gd^{+3} içeren besi ortamları ile süspansede edilen ve 2 boyutlu kültürde ya da manyetik levitasyon düzeneğinde (50,000 hücre/kapiler kanal) kültürlenen D1 ORL UVA hücrelerinin 0, 2 ve 24. saatinde kültür görüntüsü.



Şekil 40. 100 mM Gd^{+3} içeren besi ortamları ile süspansede edilen ve 2 boyutlu kültürde ya da manyetik levitasyon düzeneğinde (50,000 hücre/kapiler kanal) kültürlenen D1 ORL UVA hücrelerinin kültürün 0, 2 ve 24. saatinde hücre döngüsü evre oranları (%) ve debris oranları (%). Veriler tekrarlı deneylerin standart sapma ($\pm SD$) ile birlikte ortalaması şeklinde sunulmuştur. Debris (%) verisi Student's t-test kullanılarak, hücre döngüsü evre oranları verisi two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test (0. saat kontrolü ile kıyas için) ve Tukey's multiple comparisons test (2B-MagLev kontrolü ile kıyas için) kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ şeklinde tanımlanmıştır.

4.10 Manyetik levitasyon kültürlerinden mRNA eldesi

Manyetik levitasyon tarafından yaratılan ağırlıksız ortamın hücrelerde osteojenik ve adipojenik tanımlayıcı genlerinin ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi için öncelikle manyetik levitasyonda kültürlenmiş hücre gruplarından mRNA elde edilmesi gerekmektedir. Manyetik levitasyonda kültürlenmiş hücrelerden mRNA izole edilip edilemeyeceğini test etmek için, D1 ORL UVA hücreleri 100 mM Gd^{3+} içeren besi ortamında süspansiyon edilerek 5,000-500,000 hücre/kapiler arasında değişen hücre ekim yoğunlukları ile manyetik levitasyon cihazına yüklenmiştir. Ayrıca hücreler 0-7 gün arasında değişen kültür süresi, farklı besi ortamı tazeleme ve havuzlama (pooling) sayıları kullanılarak kültürlenmiştir. Burada, hücre ekim yoğunluğunun ve havuzlama sayısının artırılması ile elde edilecek mRNA miktarının artırılması, besi ortamı tazeleme sayısının artırılması ile manyetik levitasyon cihazının küçük hacimli hücre kültürü haznesinde (yaklaşık 50 μ l) kültürlenmiş hücrelere yeterli besinin sağlanması hedeflenmiştir (**Tablo 4**). Fakat muhtemelen kültürlenmiş hücrelerin miktarının yeterli olmaması sebebiyle neredeyse tüm deneysel gruplardan RT-PCR için yeterince mRNA izole edilemediği görülmüştür. Hücreler manyetik levitasyon cihazına oldukça yoğun (500000 hücre/kapiler) ekildiğinde ve ağırlıksız ortamda kısa süre kültürlendiğinde (2 saat) yeterli ve sağlıklı RNA izolasyonu elde edilebilmiştir. Fakat aynı yüksek hücre ekim yoğunluğu ile başlatılan kültürde kültür süresi 7 güne uzatıldığında başarılı bir şekilde mRNA izole edilememiştir. Bu da göstermektedir ki başarılı bir şekilde mRNA izolasyonu yapılabilmesi amacıyla gerekli olan yüksek hücre miktarı, manyetik levitasyonu sağlayan bu konfigürasyon ile kök hücrelerin osteojenik ya da adipojenik yönde farklılaşması için yetebilecek kadar uzun süre kültürlenmemektedir. Hücrelerin sağlıklı biçimde kültürlenmesine olanak sağlayan hücre ekim yoğunluğu kullanıldığında ise mRNA izolasyonu başarılı bir biçimde gerçekleştirilememektedir. Sonuçlara göre izole edilen mRNA miktarının ve saflığının RT-PCR için uygun görünmemesine rağmen, 5000 (**Tablo 5**) ya da 50000 (**Tablo 6**) hücre/kapiler hücre ekim yoğunluğunun kullanıldığı deneysel gruplarda housekeeping gen (GAPDH) ve osteojenik genlerin (Runx2, OCN) ifadesi RT-PCR ile test edilmiştir. GAPDH yaklaşık olarak 30. döngüde gözlemlenmiş, osteojenik genlerin ifadesi ise 2 boyutlu kontrol kültürlerinin aksine manyetik levitasyon ile kültürlenmiş hücrelerde hiç gözlemlenememiştir. Ayrıca, manyetik levitasyon ile sağlıklı bir şekilde kültürlenebilen görece az sayıda hücreden yeterli mRNA izolasyonunu sağlayabilmek amacıyla, az sayıda hücreden RNA izolasyonu için üretilmiş RNAqueous-Micro kit kullanılarak izolasyon denenmiştir (**Tablo 7**). Bu amaçla D1 ORL UVA hücreleri 100 mM Gd^{3+} içeren besi ortamında süspansiyon edilerek 5,000-10,000 hücre/kapiler arasında değişen hücre ekim yoğunlukları ile manyetik levitasyon cihazına yüklenmiştir ve 48 saat kültür sonrası mRNA izolasyonu için 6 adet örnek havuzlanmıştır. RNAqueous-Micro kit ile gerçekleştirilen mRNA izolasyonu sonucunda GAPDH geni 30 üzeri döngüde gözlemlenmiş, osteojenik

genlerin ifadesi ise gözlemlenememiştir. Bu sonuç göstermiştir ki manyetik levitasyon ile yaratılan ağırlıksız ortamın hücre farklılaşmasına etkisinin gen ifadesi açısından incelenmesi için mikroakışkan esaslara dayanmayan daha büyük hacimde bir manyetik levitasyon düzeneğinin tasarlanması, üretilmesi ve faaliyete alınmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Tablo 4. Farklı hücre ekim yoğunluğu, kültür süresi, havuzlama (pooling) ve besi ortamı tazeleme sayıları kullanılarak manyetik levitasyon ile kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinden mRNA izolasyonu. Sonuçlar NanoDrop ile ölçülmüştür.

Hücre sayısı/kapiler kanal	Zaman	Havuzlama	Besi ortamı tazeleme sayısı	RNA (ng/µl)	260 nm'de pik
5,000	0-24 saat	Yok	Yok	<54	x
50,000	3 gün	3	Her gün	7	x
	7 gün	Yok	1	<15	x
	7 gün	3	Her gün	4.3	
100,000	3 gün	3	Her gün	5.6	x
	7 gün	3	1	<18	x
	7 gün	3	Her gün	9.9	x
200,000	3 gün	3	Her gün	3.6	x
	7 gün	3	Her gün	8.3	x
400,000	3 gün	3	Her gün	2.8	x
	7 gün	3	Her gün	5	x
500,000	2 saat	1, 2 or 3	Yok	>170	✓
	7 gün	3	2	<1.8	x

Tablo 5. Manyetik levitasyon ile 0 dakika, 2 saat ve 24 saat kültürlenmiş (100 mM Gd³⁺) D1 ORL UVA hücrelerinden (5,000 hücre/kapiler kanal) mRNA izolasyonu ve GAPDH geni için RT-PCR sonucu.

Deneysel grup	RNA (ng/μl)	GAPDH için döngü
0 dakika	48.2±5.37	30.75±0.92
2 dakika sonra	49.9±4.67	30.95±0.49
1 saat sonra	18±18.38	29.65±1.63
24 saat sonra	20.05±10.96	30.4±1.56

Tablo 6. Manyetik levitasyon ya da 2 boyutlu kültürde 7 gün boyunca kültürlenmiş (100 mM Gd³⁺) D1 ORL UVA hücrelerinin (50,000 hücre/kapiler kanal) RT-PCR sonuçları (havuzlama yapılmamıştır).

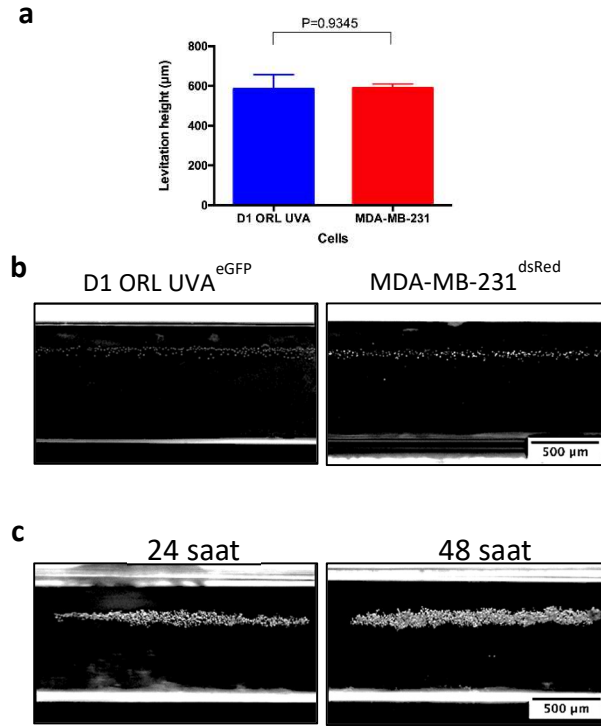
Gen	Osteo		Büyüme		
	Deney Grubu	LEV	LEV	2B	
GAPDH		31.22±0.24	31.85±0.44	19,76±0.04	20.05±0.52
Runx2		-	-	29.09±0.34	29.68±0.08
OCN		-	-	29.68±0.90	28.82±0.59

Tablo 7. Manyetik levitasyon (100 mM Gd³⁺) ile standart büyüme ortamında ya da osteojenik farklılaştırma ortamında 48 saat kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin (ekim sayısı: 5,000 ya da 10,000 hücre/kapiler kanal) RT-PCR sonuçları.

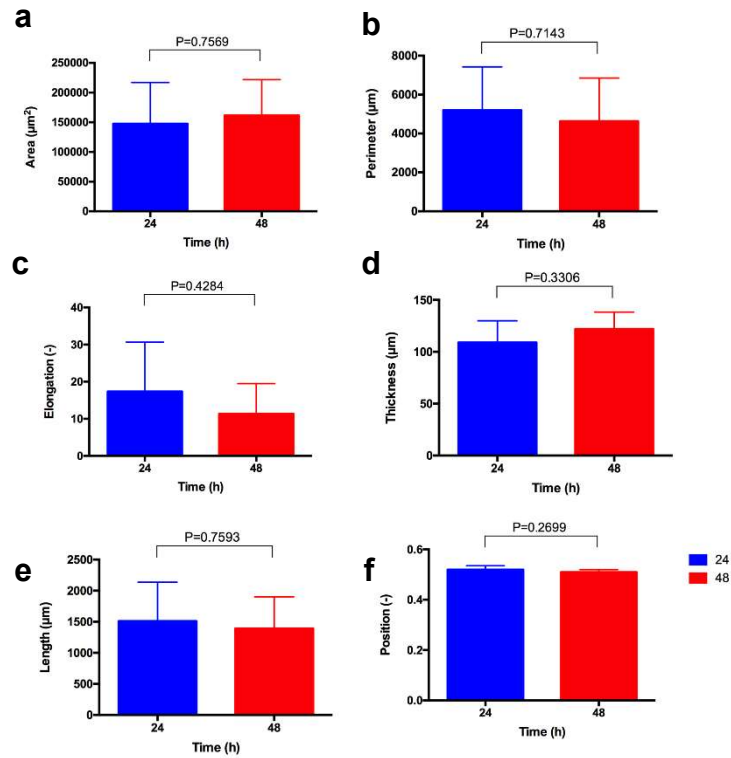
Uygulama	Hücre sayısı /kapiler	RNA (ng/μl)	260 nm'de pik	Döngü	
Büyüme Osteo	5,000	38 84	X	GAPDH: 32.76 35.6	Runx2: Çalışmadı
Büyüme Osteo	10,000	34.9 19.7	X ✓	GAPDH, Runx2, ALP, OCN <40 döngü ya da döngü okunamadı	

4.11 Manyetik levitasyon ile biyofabrikasyon ve çok fazlı yapılar oluşturulması

Farklı hücre-hücre adezyon karakterine sahip farklı tip hücrelerin manyetik levitasyon ile bir araya gelme ve küme oluşturma özelliklerinin incelenmesi için sıkı hücre kümeleri oluşturan D1 ORL UVA^{eGFP} hücreleri (kemik iliği kök hücreleri) ve sadece gevşek hücre kümeleri oluşturan MDA-MB-231^{dsRed} hücreleri (meme kanseri hücre hattı) seçilmiştir. İlk önce bu iki hücre tipinin manyetik levitasyon kültüründe birbirine yakın yükseklik seviyelerinde toplanıp toplanmadığı araştırılmış, ardından MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin de D1 ORL UVA^{eGFP} hücreleri için yapıldığı gibi önce tek başına oluşturduğu hücre kümeleri incelenmiştir. Bu amaca yönelik olarak kültürü devam eden D1 ORL UVA^{eGFP} ve MDA-MB-231^{dsRed} hücreleri tripsinize edilerek 100 mM Gadavist içeren besi ortamında 10⁵ hücre/ml olacak şekilde süspansiyon edilmiştir ve düzenek içerisine yerleştirilecek kapilere yüklenmiştir (**Şekil 41**). Levitasyonları görüntülenmiş, elde edilen görüntüler FIJI programı aracılığıyla daha önce ayrıntılarıyla açıklanan yöntem ile analiz edilmiş ve hücrelerin kapiler kanal zeminine olan uzaklıkları belirlenmiştir. Daha sonra; MDA-MB-231^{dsRed} hücreleri manyetik levitasyon ile (10⁵ hücre/ml, 100 mM Gadavist) kültürlenmiş ve oluşan hücre kümeleri 24 ve 48 saat sonunda inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile görüntülenmiştir. Hücre kümelerinin tüm geometrik özellikleri FIJI aracılığıyla daha önce açıklanan yöntem ile belirlenmiştir (**Şekil 42**). Veriler student's t-test kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlara göre, D1 ORL UVA^{eGFP} ve MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin levitasyon sisteminde (100 mM Gadavist) toplandıkları yükseklik seviyeleri arasında bir farklılık görülmemiştir (P=0.94). Kültür esnasında MDA-MB-231^{dsRed} hücre kümeleri de D1 ORL UVA^{eGFP} hücrelerine benzer şekilde 24 saat sonunda stabil bir morfoloji ve pozisyona (yükseklik açısından) ulaşmıştır. Fakat, 24 saat levitasyon kültürü sonunda oluşan MDA-MB-231^{dsRed} hücre kümelerinin D1 ORL UVA^{eGFP} hücre kümelerine kıyasla daha yüksek alan, çevre uzunluğu, elongasyon değeri ve uzunluğuna (sırasıyla 4.5, 4.6, 4.5 ve 4.8 kat fazla) sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin daha gevşek kümeler oluşturduğunu destekler niteliktedir.

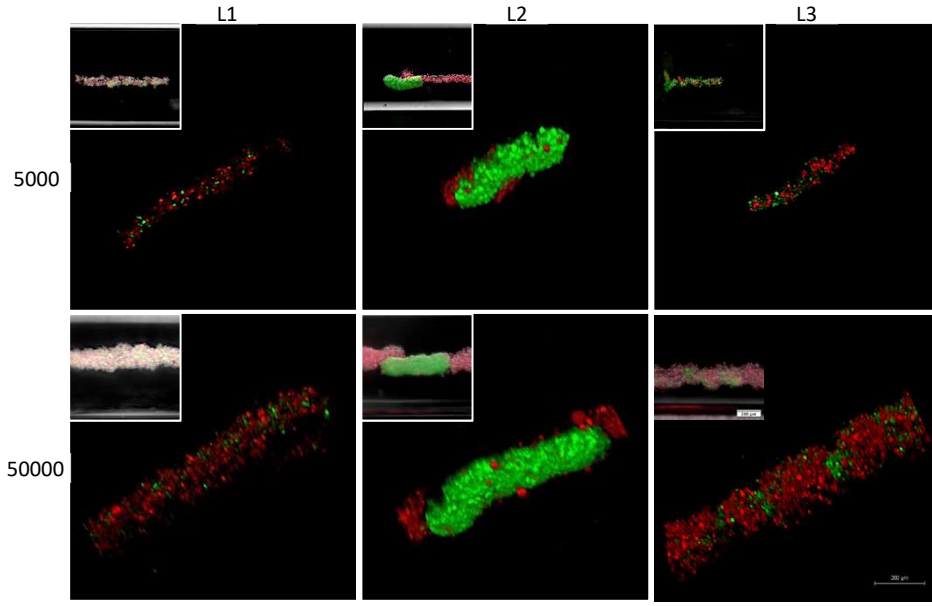


Şekil 41. D1 ORL UVA^{eGFP} ve MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin manyetik levitasyonu sonucunda (100 mM Gadavist, 5000 hücre/kapiler); (a) levitasyon yükseklikleri (kapilerin zemininden uzaklık), (b) levitasyon görüntüleri. c, MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin 100 mM Gadavist içeren besi ortamında ve manyetik levitasyon düzeneği içerisinde 24 ve 48. saat kültür görüntüleri.

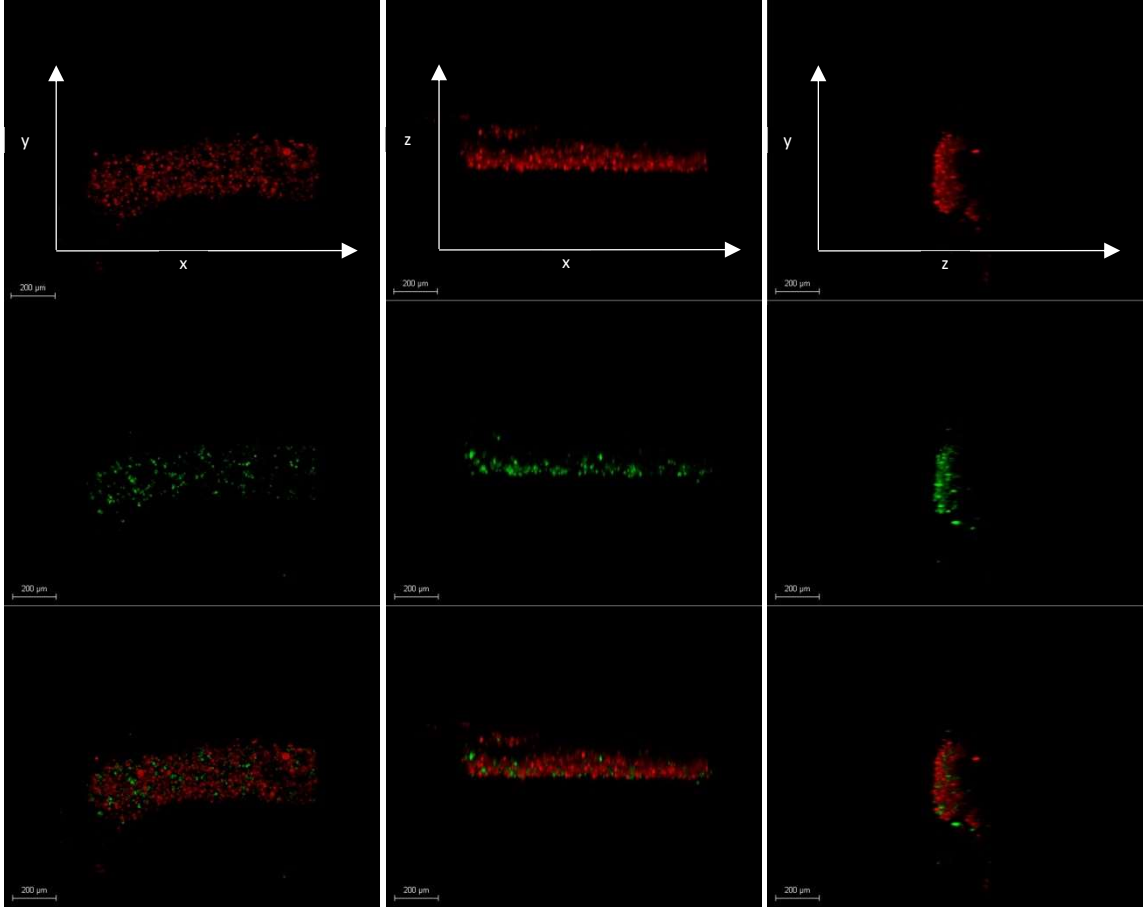


Şekil 42. *MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin 100 mM Gadavist içeren besi ortamında ve manyetik levitasyon düzeneği içerisinde 24 ve 48 saat kültür sonucunda oluşturduğu hücre kümelerinin (a) alanı, (b) çevre uzunluğu, (c) elongasyon değerleri, (d) kalınlığı (e) uzunluğu ve (f) miknatıslar arasındaki pozisyonu.*

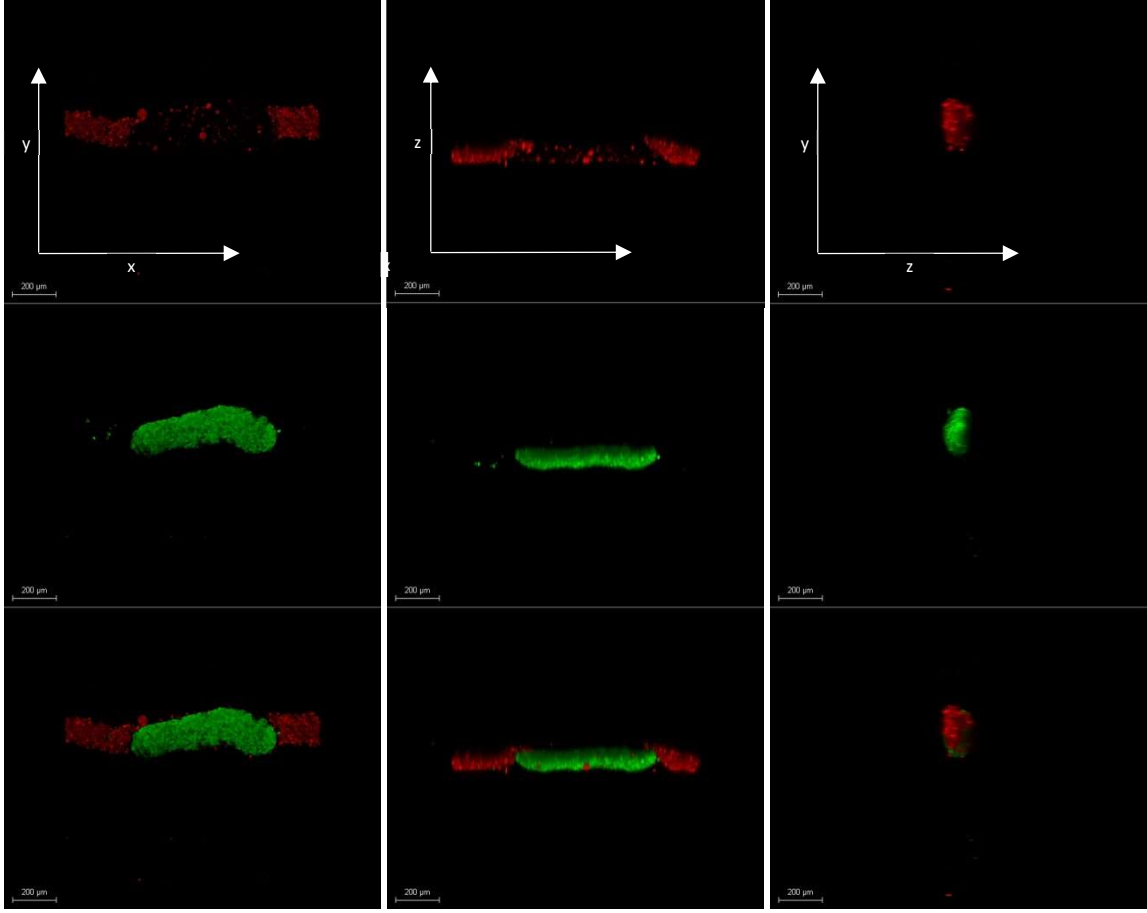
D1 ORL UVA^{eGFP} (yeşil) ve MDA-MB-231^{dsRed} (kırmızı) hücrelerinin manyetik levitasyon (100 mM Gadavist) ile ko-kültürlerinin oluşturulması için üç farklı hücre yükleme stratejisi (L1, L2 ve L3) kullanılmıştır (**Şekil 43**). L1 stratejisinde, D1 ORL UVA^{eGFP} ve MDA-MB-231^{dsRed} birlikte 100 mM Gadavist içeren besi ortamında süspansedilmiş ($\approx 50 \mu\text{l}$ içerisinde toplam ≈ 5000 ya da 50000 hücre, 1:1 hücre oranı) ve manyetik levitasyon sistemine yüklenerek 28 saat kültürlenmiştir (**Şekil 44**). L2 stratejisinde, D1 ORL UVA^{eGFP} hücreleri ($\approx 25 \mu\text{l}$ içerisinde toplam ≈ 2500 or 25000 hücre) manyetik levitasyon (100 mM Gadavist) ile 24 saat kültürlenmiş ve sonra bu kültürün üzerine 100 mM Gadavist içerisinde süspansedilmiş MDA-MB-231^{dsRed} hücreleri ($\approx 25 \mu\text{l}$ içerisinde toplam ≈ 2500 or 25000 hücre) eklenmiştir. Ko-kültür yapılarının oluşmasına izin vermek için hücreler 4 saat daha kültüre alınmıştır (**Şekil 45**). L3 stratejisinde, MDA-MB-231^{dsRed} hücreleri ($\approx 25 \mu\text{l}$ içerisinde toplam ≈ 2500 or 25000 hücre) manyetik levitasyon (100 mM Gadavist) ile 24 saat kültürlenmiş ve sonra bu kültürün üzerine 100 mM Gadavist içerisinde süspansedilmiş D1 ORL UVA^{eGFP} ($\approx 25 \mu\text{l}$ içerisinde toplam ≈ 2500 or 25000 hücre) eklenmiş ve 4 saat daha kültür sürdürülmüştür (**Şekil 46**). Manyetik levitasyon kültürleri standart kültür koşullarında (37 °C, 5% CO₂) gerçekleştirilmiştir. Oluşan hücresel yapılar konfokal (Leica DMI8) ve floresan mikroskobu (Olympus IX-83) ile incelenmiştir. L1 stratejisi sonucunda oluşan hücre kümelerinin içerisindeki D1 ORL UVA^{eGFP} ve MDA-MB-231^{dsRed} hücreleri tamamen rastlantısal biçimde birbiriyle karışmış durumdadır. L2 stratejisi ise MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin sıkı bir küme oluşturması ve D1 ORL UVA^{eGFP} hücrelerinin üzerini kaplaması ile sonuçlanmıştır. Son olarak L3 stratejisi ise D1 ORL UVA^{eGFP} hücrelerinin nispeten gevşek yapılar olan MDA-MB-231^{dsRed} kümeleri içerisindeki boşluklara entegre olması ile sonuçlanmıştır.



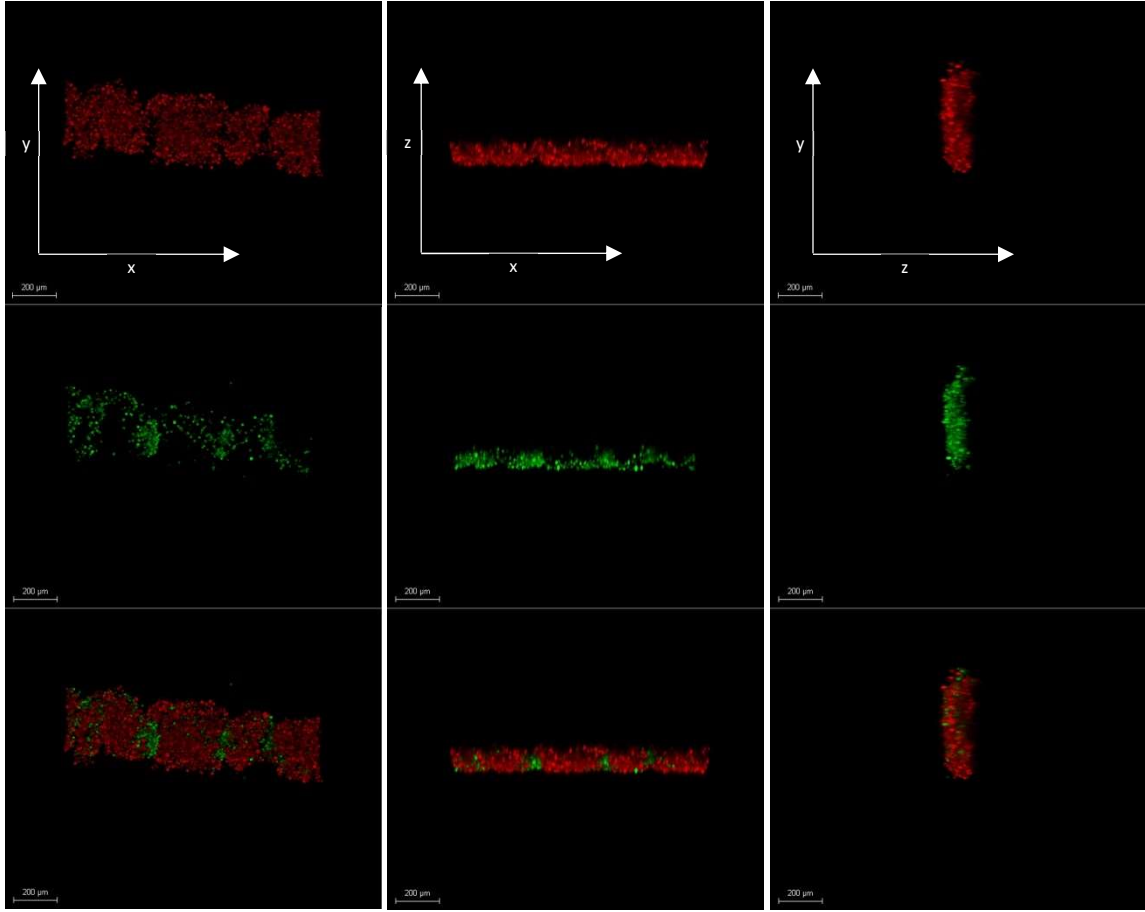
Şekil 43. Farklı yoğunluklarda (toplam 5000 ve 50000 hücre/kapiler) ve farklı yükleme stratejileri (L1, L2 ve L3) kullanılarak manyetik levitasyon ile (100 mM Gadavist) kültürlenmiş D1 ORL UVA^{eGFP} (yeşil) ve MDA-MB-231^{dsRed} (kırmızı) hücrelerinin konfokal mikroskop ve floresan mikroskop (sol üst) ile elde edilmiş ko-kültür görüntüleri; L1: D1 ORL UVA^{eGFP} ve MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin birlikte süspansiyon edilmesi ve kültüre alınması, L2: manyetik levitasyon ile oluşturulan D1 ORL UVA^{eGFP} hücre kümelerinin üzerine süspansiyon edilmiş MDA-MB-231^{dsRed} hücrelerinin ekimi ve L3: manyetik levitasyon ile oluşturulan MDA-MB-231^{dsRed} hücre kümelerinin üzerine süspansiyon edilmiş D1 ORL UVA^{eGFP} hücrelerinin ekimi.



Şekil 44. D1 ORL UVA^{eGFP} (yeşil) ve MDA-MB-231^{dsRed} (kırmızı) hücrelerinin L1 stratejisi ile manyetik levitasyonu sonucunda oluşan bir hücre kümesinin (toplam 50000 hücre, 1:1 hücre oranı) konfokal mikroskop görüntüsü.



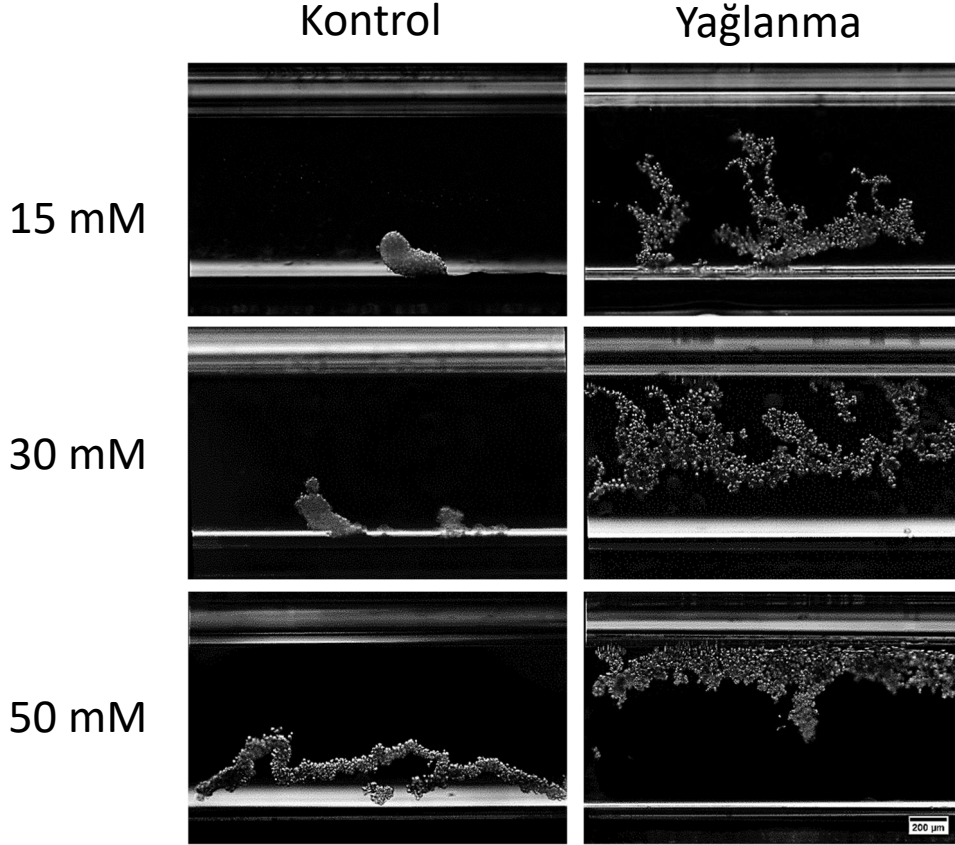
Şekil 45. D1 ORL UVA^{eGFP} (yeşil) ve MDA-MB-231^{dsRed} (kırmızı) hücrelerinin L2 stratejisi ile manyetik levitasyonu sonucunda oluşan bir hücre kümesinin (toplam 50000 hücre, 1:1 hücre oranı) konfokal mikroskop görüntüsü.



Şekil 46. D1 ORL UVA^{eGFP} (yeşil) ve MDA-MB-231^{dsRed} (kırmızı) hücrelerinin L3 stratejisi ile manyetik levitasyonu sonucunda oluşan bir hücre kümesinin (toplam 50000 hücre, 1:1 hücre oranı) konfokal mikroskop görüntüsü.

Manyetik levitasyon sistemi ile bir başka ko-kültür modeli oluşturmak amacı ile yağ (adipoz) dokunun içeriğini oluşturan önemli hücre tipleri olan yağ hücreleri ve mezenkimal kök hücreleri içeren 3 boyutlu adipoz doku fabrikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, 7F2 hücreleri 6 kuyulu kültür kaplarına 2500 hücre/mL konsantrasyonlarda ekilerek 10 gün boyunca daha önce belirtilen farklılaşma ortamı kullanılarak adipojenik farklılaşmaya yönlendirilmiştir. 10 günün ardından hücreler kültür kabından toplanarak 10⁵ hücre/mL konsantrasyonda süspansiyon edilmiş ve farklı konsantrasyonlarda Gd³⁺ (15, 30 ve 50 mM) kullanarak 5000 hücre/kapiler olacak şekilde kapiler kanallara yüklenmiştir (50 µl). 24 saat boyunca inkübatörde kültür edilen hücreler inverted mikroskop ile görüntülenerek (**Şekil 47**) oluşan 3 boyutlu kümelerin yapıları ve levitasyon cihazı içindeki konumlanmaları gözlenmiştir. Levitasyon cihazında kültür edilen farklılaşmamış hücreler tüm konsantrasyonlarda kapilerin taban yüzeyine tutunma göstermiştir, ancak 50 mM Gd³⁺ konsantrasyonunda sadece 3B yapının yüzeye daha zayıf bir teması

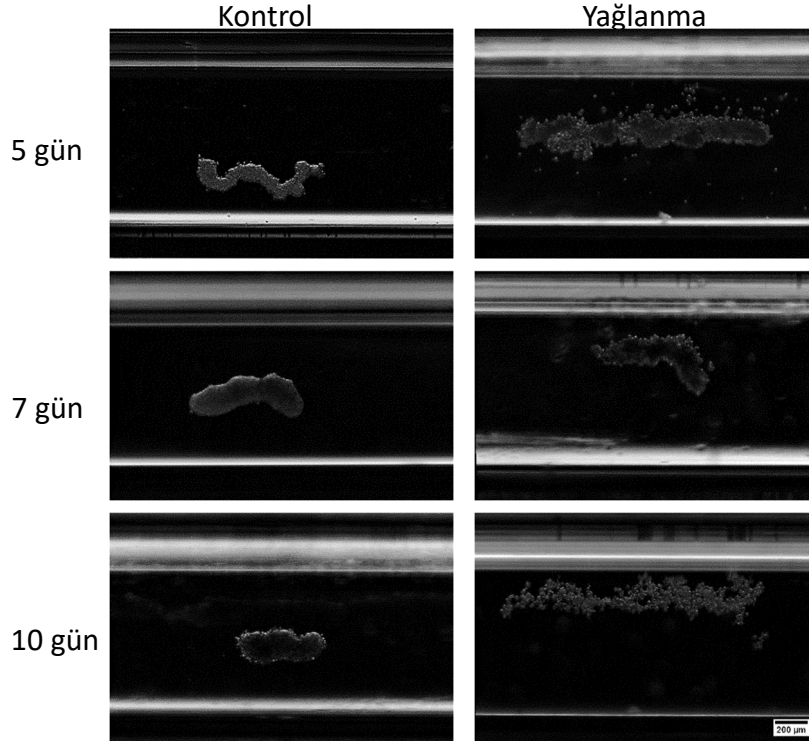
şeklinde gözlemlenmiştir. 10 gün boyunca adipojenik farklılaşmaya uğrayan hücrelerin kültüründe ise 50 mM Gd^{3+} kullanılan grupta hücreler tamamen kapilerin üst yüzeyine tutunurken, hücrelerin kapilere tutunması 30 mM'da azalmış, 15 mM'da ise farklılaşmamış hücrelerdeki gibi tabana tutunma gerçekleşmiştir. Oluşan 3B yapılara bakıldığında ise, farklılaşmayan hücreler daha sıkı yapılar oluştururken, adipojenik hücrelerin daha gevşek ve büyük yapılar oluşturduğu görülmüştür.



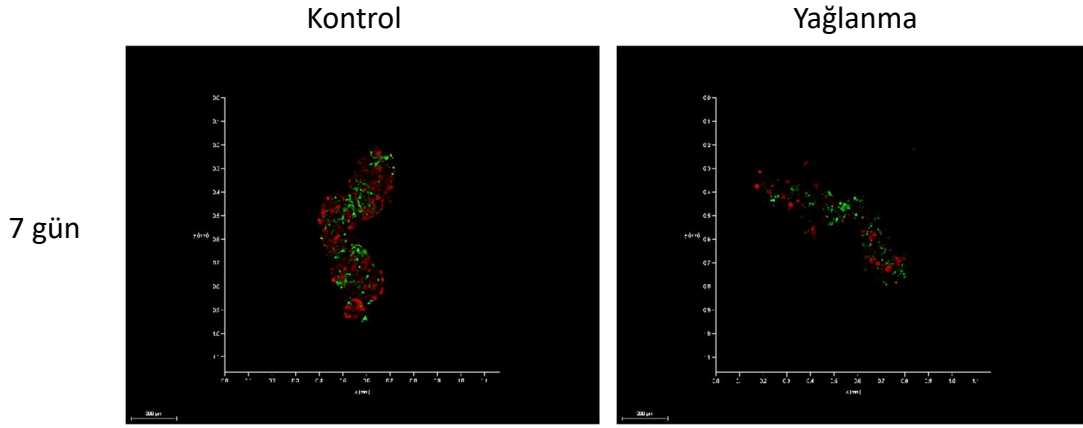
Şekil 47. Farklı Gd^{3+} konsantrasyonları (15, 30 ve 50 mM) kullanılarak 10 gün boyunca adipojenik ve standart besi ortamında büyütülen 7F2 hücrelerinin manyetik levitasyon cihazında 24 saatlik kültür görüntüleri. Scale bar: 200 μ m

7F2 hücrelerinin farklı Gd^{3+} konsantrasyonlarında yapılan 3B hücre kültürü çalışmasında, farklılaşmamış hücrelerin uzun süreli levitasyonunda düşük konsantrasyonların 3B yapıları kaldırmada yeterli etkiyi gösteremediği görülmüştür. Aynı şekilde daha önce **Şekil 31**'de de bahsedildiği gibi D1 ORL UVA hücrelerinin 50 mM konsantrasyonda bile çöken örnekleri gözlenmiştir. Ancak adipojenik yönde farklılaştırılmış 7F2 hücreleri bu konsantrasyonda kapilerin tavan yüzeyine yapışmıştır. 7F2 ve D1 ORL UVA hücre tiplerinin birlikte kültüründe kapiler kanalın taban ve taban sınırından uzakta konumlanan 3B yapılar oluşturulması amacıyla 50 mM Gd^{3+} kullanılması tercih edilmiştir. Bu amaçla, 7F2 ve D1 ORL UVA hücreleri

6 kuyulu kültür kaplarına 2500 hücre/mL konsantrasyonda ekilip, D1 ORL UVA hücreleri standart besi ortamında, 7F2 hücreleri ise standart ve adipojenik besi ortamlarında 5, 7 ve 10 gün boyunca kültür edilmiştir. Daha sonra, tripsin ile kaldırılan hücreler 10^5 hücre/mL konsantrasyon olacak şekilde süspansiyon edilerek 50:50 oranında karıştırıp kapilerlere yüklenmiştir. Manyetik levitasyon sisteminde gerçekleştirilen 24 saatlik kültür ardından 3B yapılar inverted mikroskop ile görüntülenmiştir (**Şekil 48**). İki hücre tipinin karıştırılmasıyla elde edilen 3B yapılar, tek 7F2 kültüründen farklı olarak, serbest şekilde ortada konumlanmıştır (10 günlük adipojenik grup hariç). Ayrıca, adipojenik 7F2 kültüründe elde edilen 3B yapıların aksine, adipojenik farklılaştırılmış 7F2 hücreleri ile farklılaşmamış D1 ORL UVA hücrelerinin birlikte kültür edilmesiyle daha sıkı kümeler olduğu görülmüştür. Kırmızı floresan protein ifade eden 7F2 hücreleri ve yeşil floresan protein ifade eden D1 ORL UVA hücrelerinin konfokal mikroskop görüntülerinden de görüldüğü gibi oluşan 3B yapılar iki hücre tipini de içinde barındırmaktadır (**Şekil 49**). Birbirine tutunma eğilimi yüksek olan D1 ORL UVA hücrelerinin adipojenik hücreler ile birlikte kültürlenmesi, bu ko-kültür kümelerinin sadece adipojenik hücrelerden oluşan 3B yapılar kadar gevşek olmaması ile sonuçlanmıştır. Bu çalışmanın ardından, 10 günlük farklılaştırma uygulanan hücreler kapiler yüzeyine tutunduğu için 7 günlük indüksiyon sonucu farklılaştırılmış hücreler ile çalışmalara devam edilmiştir.

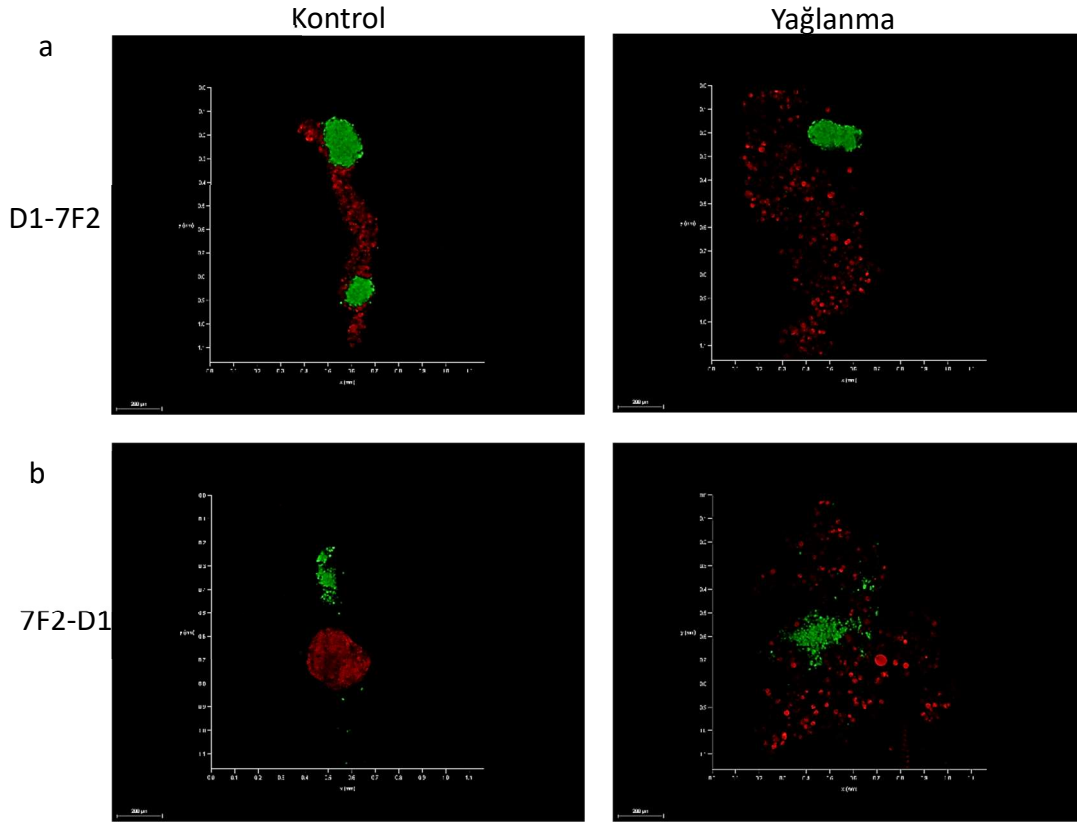


Şekil 48. Standart besi yeri ve adipojenik besi yerinde farklı günler boyunca kültür edilen kontrol ya da yağlanmış 7F2 hücrelerinin, kontrol D1 ORL UVA hücreleri ile 50:50 oranda karıştırılması sonucunda oluşan 3B yapıların mikroskop görüntüleri. (Scale bar: 200 µm)



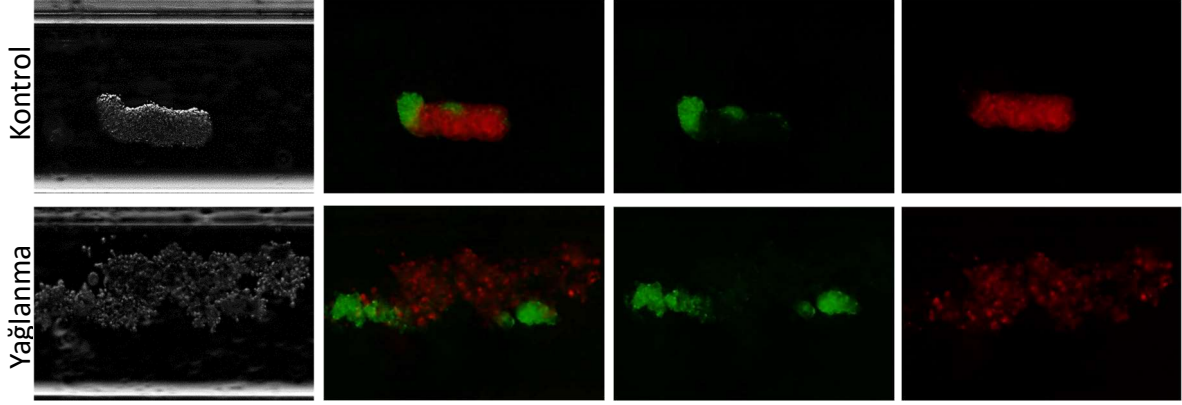
Şekil 49. Eşit oranda, heterojen karıştırılan 7F2 (kırmızı) ve D1 ORL UVA (yeşil) hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri.

Çeşitli 3B desenler oluşturmak amacıyla, farklı yükleme stratejileri kullanılarak 3B yapılar oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla, önceki çalışmalarda olduğu gibi 7F2 ve D1 ORL UVA hücreleri kültür kaplarına ekilmiş ve 7 gün boyunca çoğaltılmıştır. 7F2 hücreleri bu kültür sürecinde adipojenik uyarım bileşenleri içeren ya da içermeyen besi ortamı ile muamele edilmiştir. İlk stratejide, 10^5 hücre/mL konsantrasyonda hazırlanan D1 ORL UVA hücreleri 50 mM Gd^{3+} ile kapilerin yarısını dolduracak şekilde (25 μ m) kapilerlere yüklenmiş ve 24 saat boyunca manyetik levitasyon sisteminde inkübe edilmiştir. 24 saatin ardından, adipojenik farklılaşmış ve farklılaşmamış 7F2 hücreleri aynı oranda kapilere yüklenerek, 4 saat inkübe edilip, sonrasında konfokal görüntüleri alınmıştır (**Şekil 50A**). Yapılan konfokal görüntülemesinde, oluşan 3B yapılarda D1 ORL UVA hücrelerinin yapının alt bölümünde bulunduğu ve 7F2 hücrelerinin D1 ORL UVA hücrelerinin bir bölümüne tutunarak iki katmanlı yapı oluşturdukları görülmüştür. İkinci stratejide ise aynı işlem önce 7F2 sonra D1 ORL UVA hücrelerinin yüklenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir (**Şekil 50B**). Burada, ilk stratejinin aksine adipojenik hücreleri içeren 3B yapıda D1 ORL UVA hücreleri adipojenik 7F2 hücreleri tarafından sarılmış bir şekilde kümelenme göstermiştir.



Şekil 50. 3B adipojenik kültür için farklı desenlerin oluşturulması. (a) 24 saat boyunca manyetik levitasyon sisteminde kültür edilen D1 ORL UVA hücrelerinin (yeşil) üzerine 7F2 hücrelerinin (kırmızı) eklenerek 4 saat daha inkübe edilmesi ardından oluşan yapıların konfokal görüntüleri (b) 24 saat boyunca levitasyon sisteminde kültür edilen 7F2 hücrelerinin (kırmızı) üzerine D1 ORL UVA hücrelerinin (yeşil) eklenerek 4 saat daha inkübe edilmesi ardından oluşan yapıların konfokal görüntüleri.

Farklı desen oluşturmaya yönelik üçüncü stratejide ise manyetik levitasyon cihazının 180° döndürülmesi ile vertikal olarak 3 katmanlı yapı oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla, D1 ORL UVA hücreleri 10⁵ hücre/mL konsantrasyonla 50 mM paramanyetik ortam içinde 8 saat boyunca kültür edilip, üzerine 7F2 hücreleri eklenmiştir. Eklemenin ardından 8 saat daha kültür edilen hücrelerin bulunduğu manyetik levitasyon sistemi 180° döndürülerek yeniden D1 ORL UVA hücreleri 40 mM Gd³⁺ içeren besi ortamı içinde eklenmiştir. Floresan mikroskopu ile yapılan görüntülemelerde, hedeflenen 3 tabakalı yapıların oluşmadığı görülmüştür (**Şekil 51**). Bu strateji, hücre tiplerinin ardışık olarak yüklenmesi farklı hücrelerden oluşan hücre bloklarını içeren büyük 3B yapıların oluşumu ile sonuçlanmıştır.

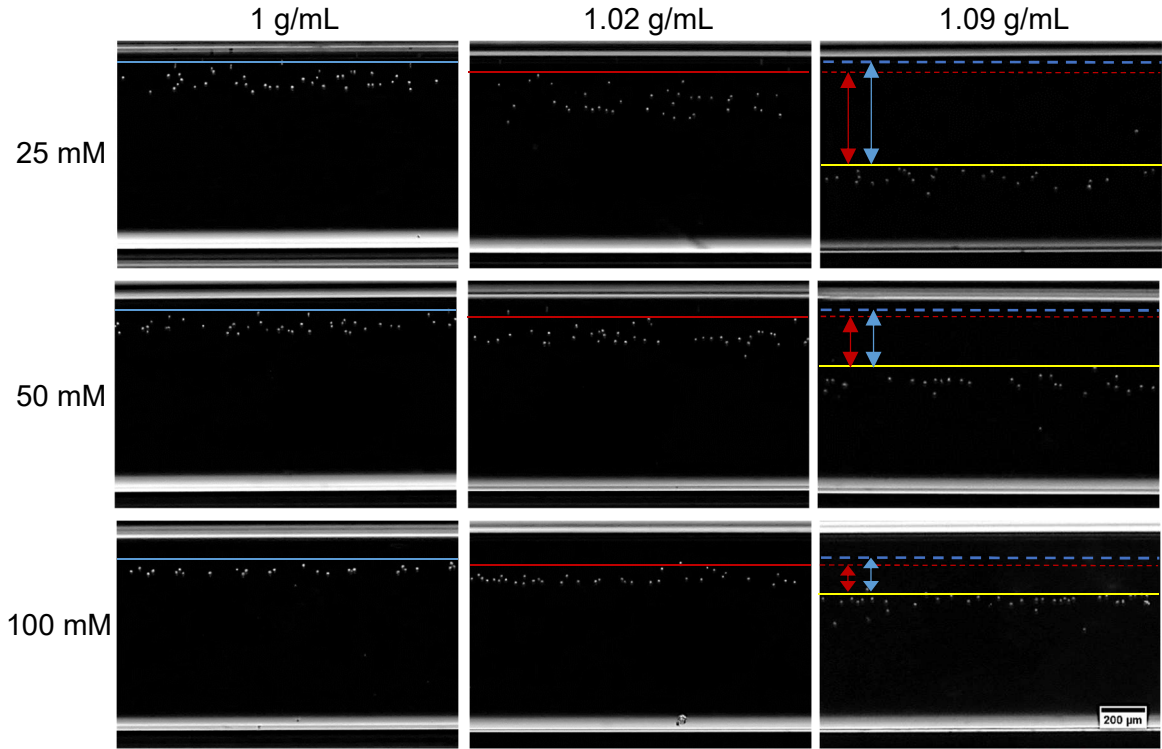


Şekil 51. 7 Gün boyunca adipojenik farklılaşmaya uyarılan 7F2 hücrelerinin, farklılaşmamış D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon cihazına D1 (50 mM) + 7F2 (50 mM) + D1 (40 mM) yükleme stratejisiyle oluşturduğu 3B yapıların floresan görüntüleri.

4.12 Manyetik levitasyon ile kemik iliği kökenli hücrelerin özkütlelerine göre ayrıştırılması

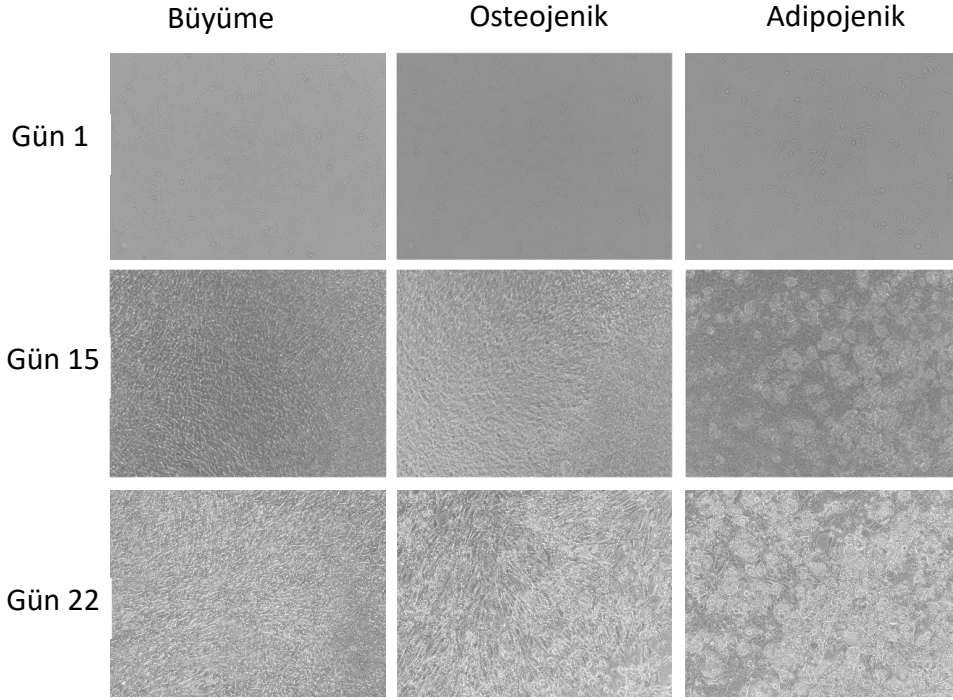
Projenin temel hedeflerinden biri olarak, durgun (quiescent), yağ doku yönelimine girmiş (adipogenic) ya da kemik doku yönelimine girmiş (osteogenic) kök hücrelerde oluşabilecek olan yoğunluk farklarının tespit edilmesi planlanmıştır. Bu sayede levitasyon sırasında kültürlenmiş farklı yönelimdeki hücre kümelerinin konumları arasındaki farkların anlaşılması bu yapıların manipülasyonu hedeflenmektedir.

Manyetik levitasyon sisteminde yüksekliği belirlenen hücrelerin yoğunluk değerlerinin belirlenebilmesi için farklı yoğunluklardaki polietilen mikrokürelerin manyetik levitasyon sisteminde konumlandığı levitasyon yüksekliği belirlenmiştir. Yoğunluğu bilinen (1, 1.02 ve 1.09 gr/mL) mikroküreler 25, 50 ve 100 mM Gadavist içerisinde levite edilmiştir (**Şekil 52**). Parçacık süspansiyonları manyetik levitasyon düzeneğinin içerisindeki kapiler kanala yüklenmiş ve parçacıklar denge pozisyonuna geldiğinde inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler FIJI programı aracılığıyla analiz edilmiş ve parçacıkların kapilerin altında bulunan miknatısın üst sınırına olan uzaklıkları belirlenmiştir. Belirlenmiş olan yükseklik değerleri ve parçacıkların yoğunlukları arasındaki korelasyon lineer regresyon ile hesaplanmıştır ve aynı Gadavist konsantrasyonu ile manyetik levitasyonu gerçekleştirilen hücrelerin konumlandığı levitasyon yüksekliklerinin denk geldiği yoğunluk değerlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.



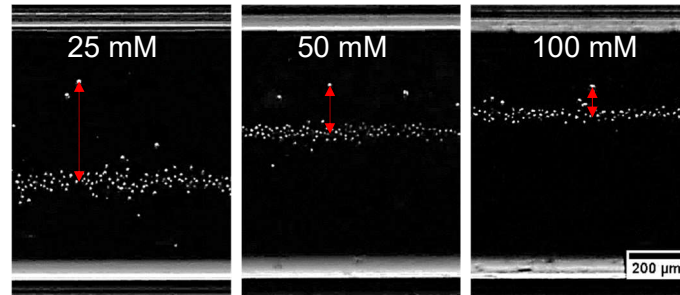
Şekil 52. Yoğunluğu bilinen polimer parçacıkların (1, 1.02 ve 1.09 g/mL) manyetik levitasyon (25, 50 ve 100 mM Gadavist) görüntüleri. Mavi çizgi 1 g/mL, turuncu çizgi 1.02 g/mL, sarı çizgi 1.09 g/mL yoğunluğundaki parçacıkların levitasyon sisteminde oluşturduğu bantın üst seviyesini göstermektedir. Oklar ise 1.09 g/mL ile 1 ve 1.02 g/mL yoğunluğundaki parçacıkların levitasyon yükseklikleri arasındaki farkı göstermektedir.

Sonuçlara göre parçacıkların yoğunluğu arttıkça denenen tüm Gadavist konsantrasyonları için (25, 50 ve 100 mM) levitasyon yüksekliği azalmıştır. Fakat, 25 mM Gadavist ile gerçekleştirilen manyetik levitasyonda 1.09 g/mL ile 1 ve 1.02 g/mL yoğunluğundaki parçacıkların levitasyon yükseklikleri arasındaki fark oldukça yüksek iken Gadavist konsantrasyonu arttıkça (50 ve 100 mM) bu fark azalmıştır (**Şekil 52**). Farklılaşması uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerin levitasyon yüksekliklerinin ve boyutlarının belirlenmesi ve yoğunluklarının hesaplanması için D1 ORL UVA hücreleri 100 hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu plastiğe ekilmiş ve standart büyüme ortamı (α -MEM+ %10 FBS + %1 P/S) içerisinde büyütülmüştür. Kültürün başlangıcından 48 saat sonra hücreler tarafından kullanılan besi ortamı uzaklaştırılarak hücreler, içerisine adipojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler eklenen besi ortamı (50 µM indometasin, 10 nM deksametason, 5×10^{-3} mg/ml insülin) veya osteojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler eklenen besi ortamı (50 mg/ml askorbik asit ve 2.16 mg/ml β -gliserolfosfat) ile muamele edilmiştir. Kontrol olarak ise hücrelerin standart besi ortamı ile ortam tazelenmesi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 53**).



Şekil 53. Farklı sürelerde (1, 15 ve 22 gün) adipojenik ve osteojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamlarında ve standart büyüme ortamında kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin kültür görüntüleri.

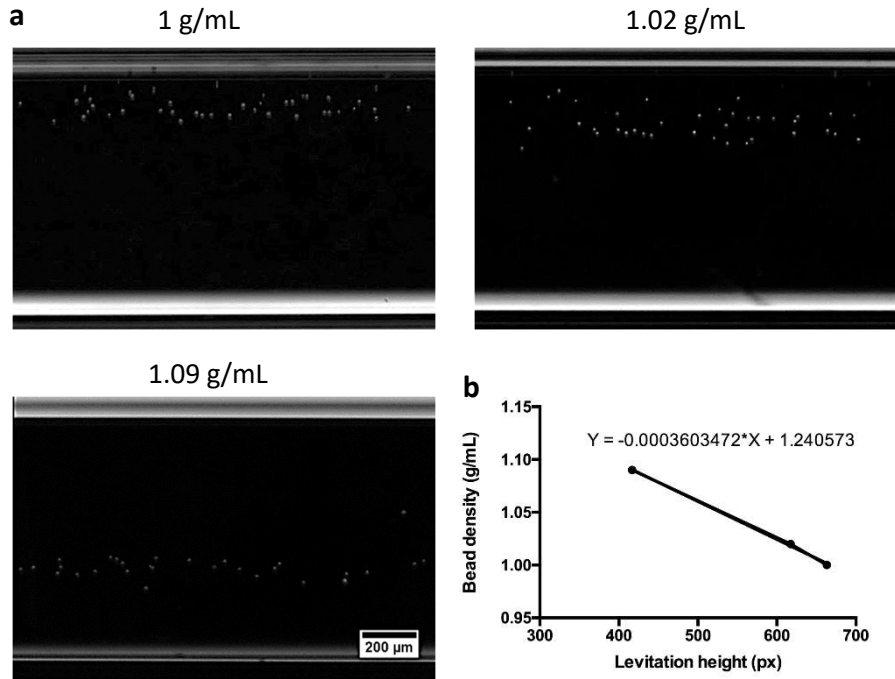
D1 ORL UVA hücrelerinin adipojenik farklılaşmanın uyarıldığı durumda kültürün 8. gününden itibaren mikroskopik gözlem ile gözlemlenebilir düzeyde yağ vesikülleri biriktirmeye başladığı görülmüştür. Osteojenik farklılaşmanın uyarıldığı durumda ise kültürün 22. gününde hücrelerin morfolojilerinin belirgin biçimde değiştiği ve mineral biriktirdiği gözlemlenmiştir. Hücreler adipojenik kültürün 1, 5, 8, 12 ve 15. Günlerinde tripsinize edilerek 25, 50 ve 100 mM Gadavist içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir. Tek hücre süspansiyonu haline getirilen hücreler manyetik levitasyon düzeneğinin içerisindeki kapiler kanala yüklenmiştir ve hücreler denge pozisyonuna geldiğinde inverted mikroskop (Olympus IX-83) ile görüntülenmiştir (**Şekil 54**).



Şekil 54. 15 gün boyunca adipojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon (25, 50 ve 100 mM Gadavist) görüntüleri. Kırmızı oklar ortalama hücre kümelenmesi ile düşük yoğunluklu hücreler arasındaki yükseklik seviyesi farkını göstermektedir.

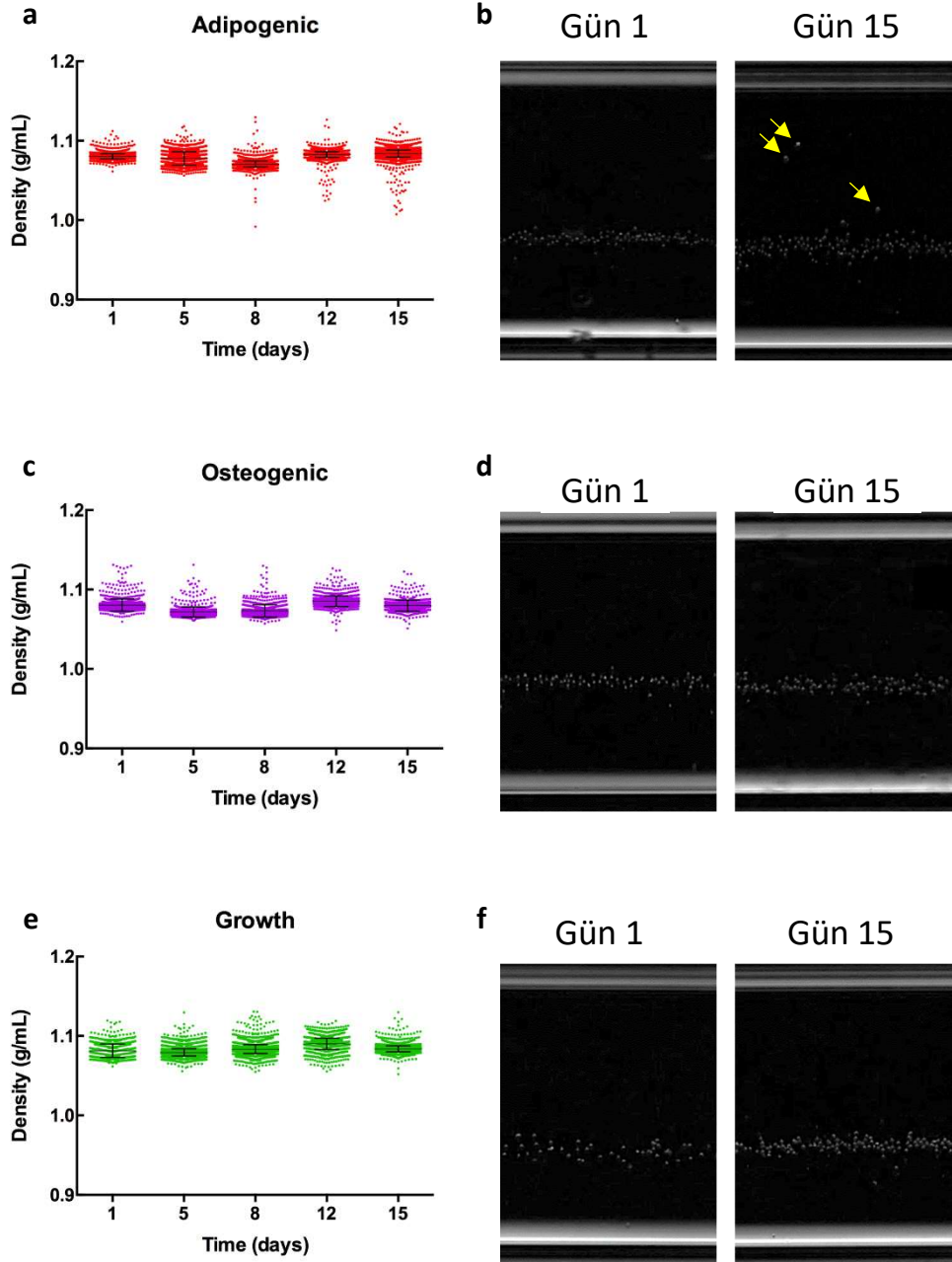
25 mM Gadavist ile gerçekleştirilen manyetik levitasyonda ana hücre popülasyonunun levitasyon sisteminde oluşturduğu bantın üst seviyesi ile düşük yoğunluklu hücrelerin ulaştığı maksimum yükseklik seviyesi arasındaki fark oldukça yüksektir. Gadavist konsantrasyonu arttıkça (50 ve 100 mM) bu fark azalmıştır. Yoğunluğu bilinen parçacıkların levitasyonu deneyinde de olduğu gibi heterojen hücre topluluğu ile gerçekleştirilen bu deneyde de Gadavist konsantrasyonu azaltıldıkça (25 mM) manyetik levitasyon yönteminin partiküllerin/hücrelerin yoğunluk değişimine olan hassasiyetinin arttığı belirlenmiştir. Bu sebeple hücrelerin manyetik levitasyon sisteminde yoğunluk tabanlı ayrımı için 25 mM Gadavist konsantrasyonu seçilmiştir ve takip eden deneyler bu konsantrasyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen görüntüler FIJI programı aracılığıyla analiz edilmiş ve parçacıkların kapilerin altında bulunan mıknatısın üstüne olan uzaklıkları ve hücrelerin boyut (alan, μm^2) değerleri belirlenmiştir. Belirlenmiş olan levitasyon yükseklik değerlerine göre hücrelerin yoğunlukları, yoğunluğu bilinen parçacıkların aynı Gadavist konsantrasyonu ile levitasyonu sonucunda elde edilmiş levitasyon yüksekliği-yoğunluk denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (**Şekil 55**).



Şekil 55. Yoğunluğu bilinen polimer parçacıklarının (1, 1.02 ve 1.09 g/mL) (a) manyetik levitasyon (25 mM Gadavist) görüntüleri ve (b) levitasyon yüksekliği ile parçacık yoğunluğu arasındaki korelasyon.

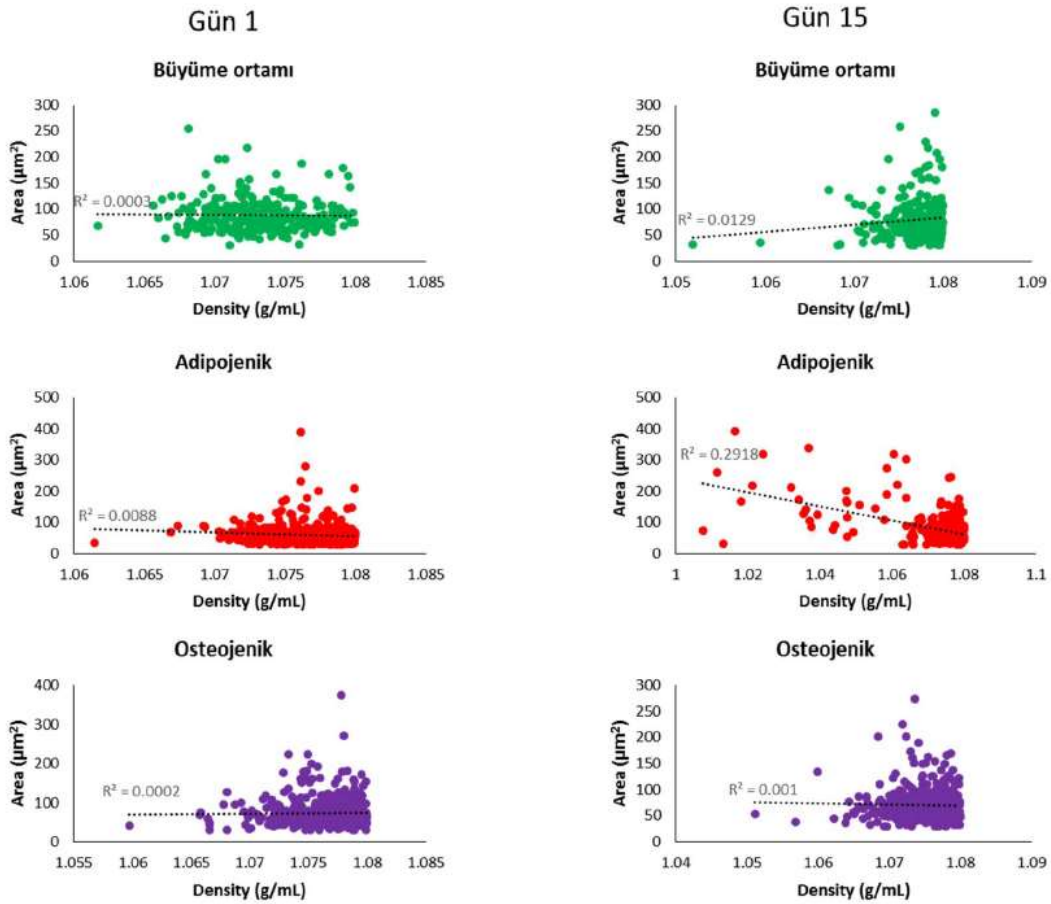
Yağ ve kemik doku oluşumuna yönlendirilmiş ya da atıl kontrol olarak kültürlenmiş olan D1 ORL UVA hücrelerinin farklı günlerde gösterdikleri yoğunluk değişimleri manyetik levitasyon sistemi ile tespit edilmiştir (**Şekil 56**)



Şekil 56. Farklı sürelerde (1, 5, 8, 12 ve 15 gün) (a, b) adipojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında, (c, d) osteojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında ve (e, f) standart büyüme ortamında kültürlenmiş D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon sistemindeki (25 mM Gadavist) levitasyon yüksekliklerine göre hesaplanmış yoğunluk değişimleri ve levitasyon görüntüleri. Oklar yoğunluğu düşük olan hücreleri göstermektedir.

Sonuçlara göre, adipojenik yönde uyarılmış hücre grubunda kültürün 8. gününden sonra levitasyon sisteminde ana popülasyona kıyasla daha düşük yoğunluğa sahip hücre grupları gözlemlenmeye başlamıştır ve bu gruba ait hücre sayısı kültürün 15. gününe kadar artmıştır. Osteojenik yönde uyarılmış ya da standart büyüme ortamında kültürlenmiş hücrelerin içerisinde ise bu şekilde düşük yoğunlukta bir hücre grubu gözlenmemiştir.

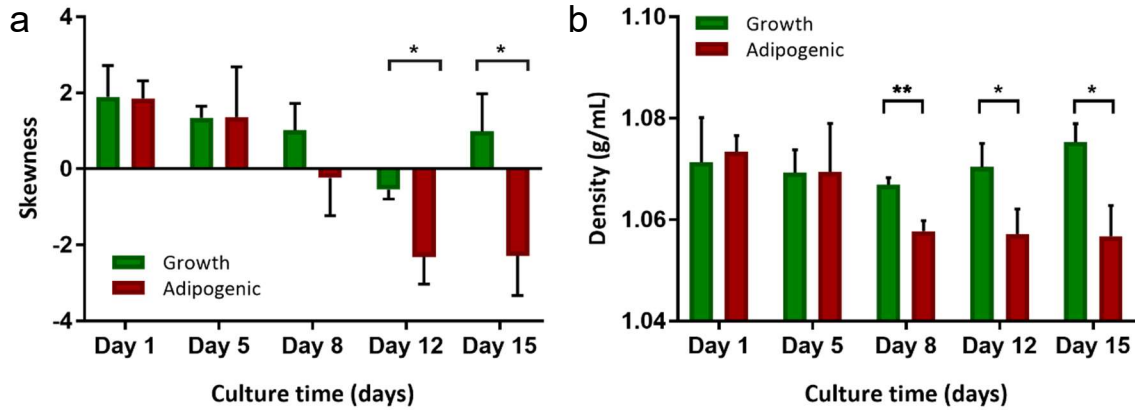
Adipojenik farklılaşmayı uyarıcı besi ortamında kültürlenen D1 ORL UVA hücreleri manyetik levitasyon sisteminde levite edildiğinde ana popülasyona göre daha yüksek konumlanan hücrelerin boyut parametreleri de incelenmiştir. Bu hücre popülasyonunun yoğunluğu ile hücrelerin boyutu (alan, μm^2) arasında bir korelasyon olup olmadığının belirlenmesi için 1.08 g/mL ve daha düşük yoğunluk değerine sahip hücrelerin (ana popülasyondan ayrılan hücreler) yoğunluk değerleri ve boyutları arasındaki ilişki incelenmiştir (**Şekil 57**).



Şekil 57. Adipojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında, osteojenik farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında ve standart büyüme ortamında kültürlenen (1 ve 15 gün) D1 ORL UVA hücrelerinin manyetik levitasyon sistemindeki (25 mM Gadavist) levitasyon yüksekliklerine göre hesaplanmış yoğunluk değişimleri ve hücrelerin boyutları (alan, μm^2) arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler. Sadece 1.08 g/mL ve altındaki yoğunluk değerlerine sahip hücreler değerlendirilmiştir.

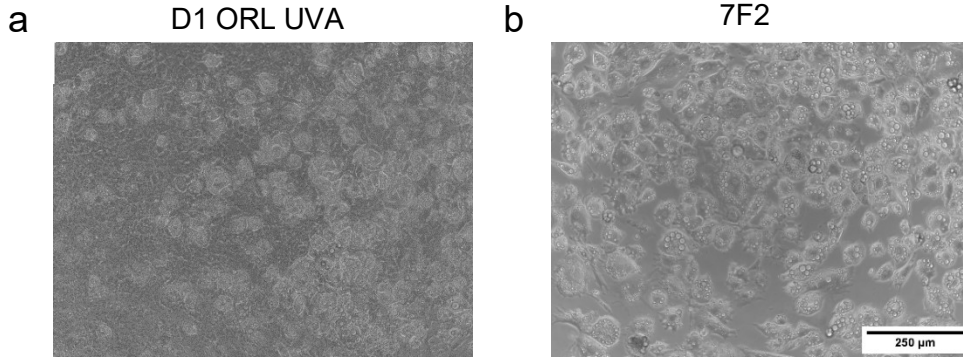
Sonuçlara göre 1 günlük kültür sonucunda besi ortamından bağımsız olarak (büyüme ortamı, adipojenik ya da osteojenik uyarım besi ortamları) hücrelerin boyutu ve yoğunluğu arasında bir korelasyon gözlemlenmemiştir ($R^2 < 0.001$). 15 günlük kültür sonucunda ise adipojenik uyarım ortamında kültürlenmiş hücreler diğer gruplara kıyasla daha yüksek R^2 değeri (belirleme katsayısı) vermiştir ($R^2 = 0.2918$). Bu sonuca göre, manyetik levitasyon sistemi yağ hücrelerinin oluşumunu kolay, hassas ve herhangi bir hücre işaretçisine ihtiyaç olmadan gösterebilmiştir.

Hücrelerin yoğunluk farkından yola çıkarak farklı hücre soylarının tespitine yönelik manyetik levitasyon sisteminin kullanımı için yapılan çalışmaların devamında D1 ORL UVA hücrelerinin adipojenik kültürünün 1, 5, 8, 12 ve 15. günlerinde yapılan levitastonda hücrelerin kapiler içindeki çarpıklıklarının (skewness) ve popülasyonun minimum %5'ini oluşturan hücrelerin yoğunluk değerlerinin günlere bağlı olarak değişimi **Şekil 58**'de gösterilmiştir. Farklılaşmanın ilk haftasında kontrol ve adipojenik gruplar arasında istatistiksel anlamda bir farklılık görülmemiştir. 8, 12 ve 15. günlerde ise deney grubu hücrelerinin kapiler içindeki dağılımının negatif çarpıklık gösterdiği, ayrıca, popülasyonun minimum %5'i incelendiğinde hücre yoğunluğunun 1.052 g/mL'ye kadar azaldığı görülmüştür.



Şekil 58. D1 ORL UVA hücrelerinin 25 mM Gd^{3+} içeren besiyeri ile gerçekleştirilen levitasyona sonucuna göre levitasyon ve yoğunluk profili. (A) Kontrol ve adipojenik farklılaştırılmış D1 ORL UVA hücre yoğunluklarının 1, 5, 8, 12 ve 15. Günlerdeki çarpıklık değerleri. (B) Kontrol ve adipojenik hücre popülasyonlarının minimum %5'ine ait yoğunluk ortalamaları. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiş ve unpaired t-test analiz metodu kullanılmıştır. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

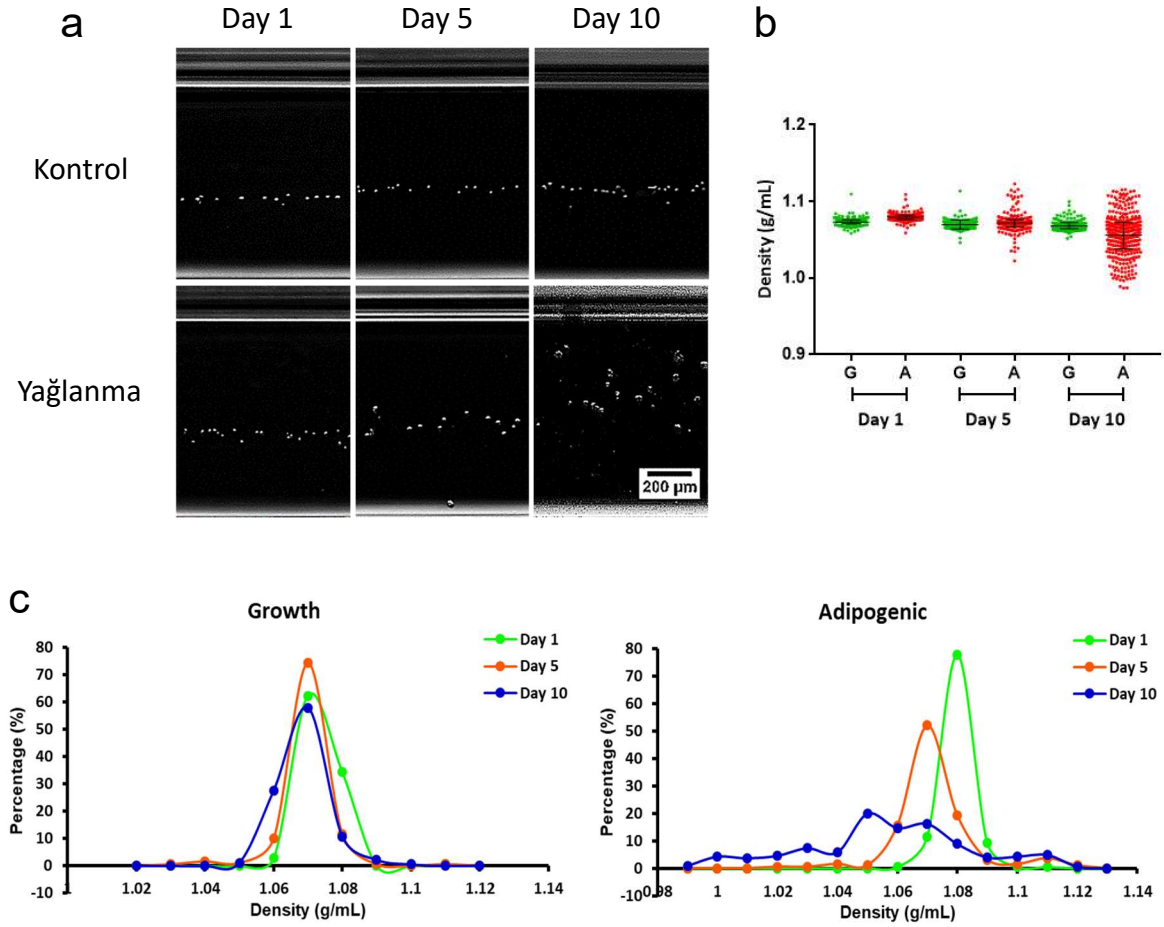
D1 ORL UVA hücrelerinde, indüklenen adipojenik farklılaşmanın gerçekleşmesi için gereken kültür süresinin fazla olması sebebiyle, kısa sürede farklılaşma özelliği olduğu bilinen başka bir kemik iliği hücresi olan 7F2 hücre hattı kullanılmaya başlanmıştır. D1 ORL UVA hücreleri adipojenik farklılaştırma için farklılaşmayı uyarıcı bileşenler içeren besi ortamında 15 gün kültür etmek gerekirken, 7F2 hücreleri 10 günde D1 ORL UVA hücrelerine kıyasla daha fazla lipid birikimi göstermiştir (**Şekil 59**).



Şekil 59. Adipojenik farklılaşma uygulanan (A) D1 ORL UVA hücrelerinin 15. gündeki ve (B) 7F2 hücrelerinin 10. gündeki 2D kültür görüntüleri (scale bar: 250 µm)

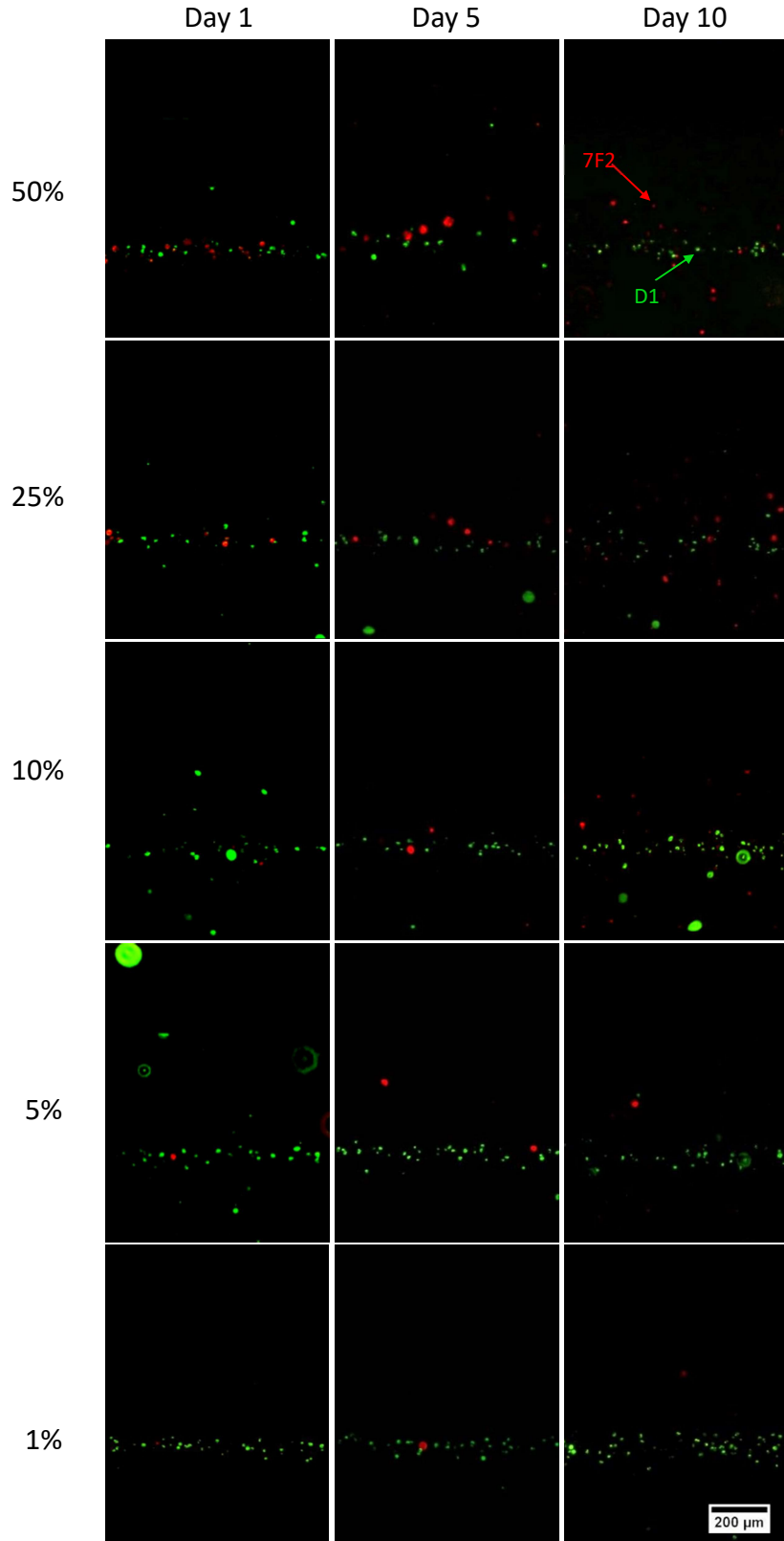
7F2 hücreleri standart büyüme ortamı ve adipojenik farklılaştırmayı uyarıcı bileşenler içeren büyüme ortamı içinde 10 gün boyunca kültür edilmiştir. Hücreler 1, 5 ve 10. günlerde 25 mM Gd^{3+} kullanarak levite edilmiştir (**Şekil 60a**). Levitasyon yüksekliklerine göre hesaplanan tek hücre yoğunlukları dağılım grafiği ile gösterildiğinde, 10. günde azalan yoğunluk yönünde belirgin bir genişleme görülmüştür (**Şekil 60b**). Birinci günde ortalama hücre yoğunluğu 1.079 ± 0.005 g/mL olan 7F2 hücrelerinin yoğunluğu 0.989 g/mL' ye kadar düşmüştür. Ek olarak, değişen yoğunluk değerlerinin daha iyi yorumlanabilmesi için gösterilen yüzde dağılım grafiği ile adipojenik farklılaşmaya uyarılan hücrelerde 5. günde başlayan desen değişimi görülmüştür (**Şekil 60c**).

Manyetik levitasyon sisteminin yoğunluk farklılığı tespit etmede başarılı olduğunun gösterilmesinin ardından, sistemin karışık hücre popülasyonu içerisindeki adipojenik hücrelerin tespiti için kullanılabilirliğini test etmek için D1 ORL UVA hücreleri (yeşil floresan boya ile işaretlenmiş) ve adipojenik farklılaştırılmış 7F2 hücreleri (kırmızı floresan boya ile işaretlenmiş), 7F2 hücrelerinin farklı oranlarıyla (%50, %25, %10, %5 ve %1) karıştırılarak 25 mM Gd^{3+} kullanarak levite edilmiştir (**Şekil 61**). Sonuçlara göre, farklılaşmış 7F2 hücreleri ve farklılaşmamış D1 ORL UVA hücreleri arasındaki relatif yoğunluk farkı, artan kültür süresi ile artış göstermiştir (**Şekil 62a**). Bu artış çok düşük karışım oranlarında bile tespit edilebilmiştir. Aynı zamanda, levitasyon yüksekliklerindeki farklılığın hücre tipinden kaynaklı olmayıp hücre yoğunluğundan kaynaklandığını göstermek amacıyla, farklılaşmamış 7F2 hücreleri ve D1 ORL UVA hücreleri 50% oranda karıştırılıp kontrol grubu olarak kullanılmıştır (**Şekil 63**). Ayrıca, adipojenik hücre oranları manuel sayma yöntemiyle belirlenmiştir (**Şekil 62b**). Yapılan analizler sonucunda, gözlenen ve beklenen değerler çoğunlukla benzer olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (1. gün hariç).

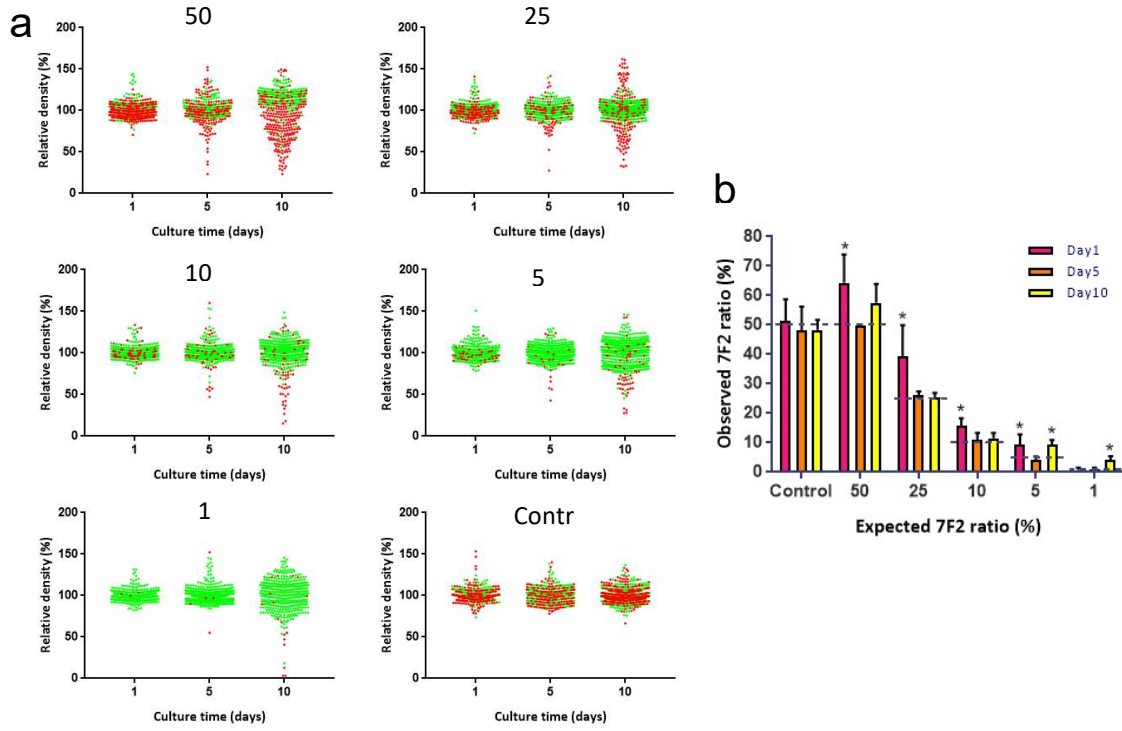


Şekil 60. Farklı günlerde 7F2 hücrelerinin levitasyonu. (a) 25 mM Gd^{3+} ile levite edilen kontrol ve deney grubunun 1, 5 ve 10. günlerdeki levitasyon görüntüleri. (b) Levitasyon yüksekliklerine göre hesaplanmış yoğunluk değerlerinin dağılım grafiği (c) Değişen yoğunluk değerlerinin yüzde dağılımı.

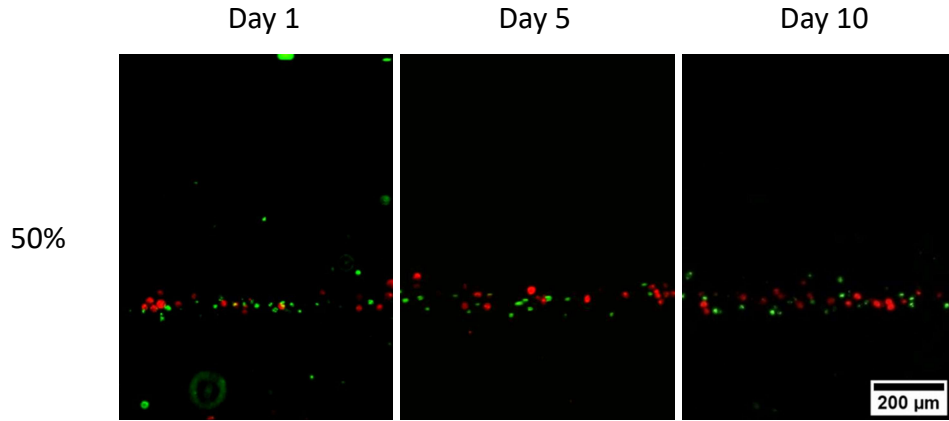
Son olarak, hücre soyunun belirlenmesi hedefiyle, kapiler kanallarda levite edilen hücreler yoğunluklarına bağlı olarak kategorize edilmiştir. Bunun için, levitasyon sonrası elde edilen mikroskop görüntülerinde kapiler kanallar 3 bölgeye ayrılmış (1. Bölge: 1.02 g/mL den küçük yoğunluklu hücreler, 2. Bölge: 1.02 ve 1.06 g/mL arasında yoğunluğa sahip hücreler, 3. Bölge: 1.06 g/mL'den büyük yoğunluğa sahip olan hücreler) (Şekil 64a) ve bu bölgelere düşen hücrelerin sayıca yüzdeleri hesaplanmıştır (Şekil 64b). Sonuçlara göre, 2. ve 3. bölgeler iki farklı hücre tipinden oluşurken, 1. bölgenin tamamen 7F2 hücrelerinden oluştuğu görülmüştür. Sonuçlar, manyetik levitasyon sisteminin lipid biriktiren hücrelere karşı oldukça yüksek seçiciliği olduğunu göstermiş ve farklılaşmanın aşamalarının tespitinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.



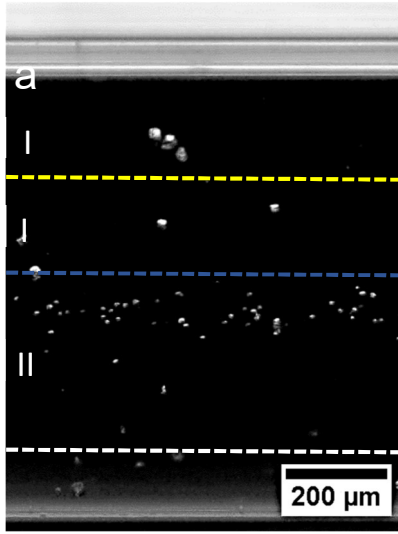
Şekil 61. Farklı oranlarda (%50, %25, %10, %5 ve %1) karıştırılarak levite edilen (25 mM Gd^{3+}) farklılaşmamış D ORL UVA (yeşil) ve adipojenik farklılaşmış 7F2 hücrelerinden (kırmızı) oluşan heterojen hücre popülasyonlarının floresan görüntüleri. Scale bar: 200 μm .



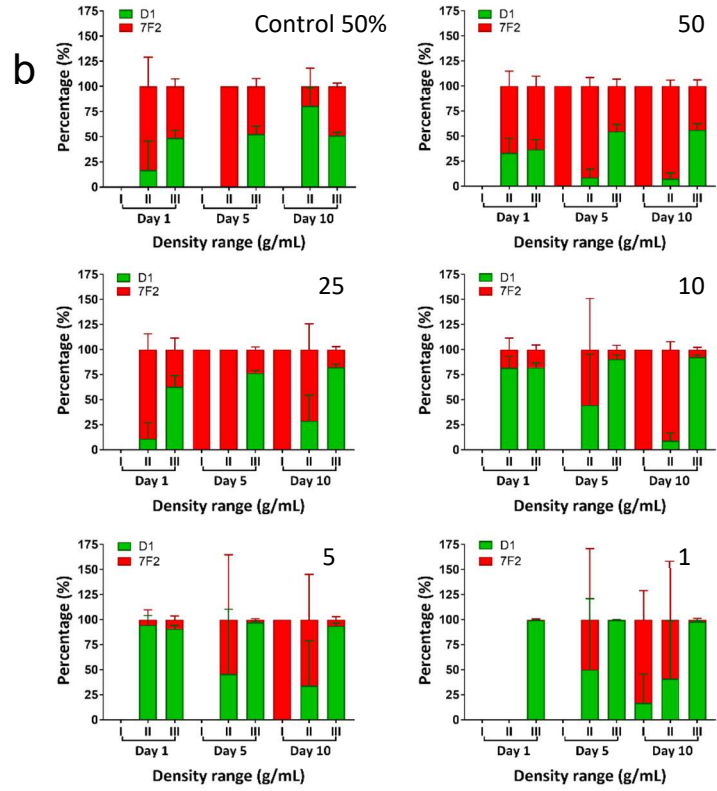
Şekil 62. Adipojenik hücrelerin heterojen popülasyonda tanımlanması. (a) Farklı günlerde (1, 5 ve 10 gün), farklı oranlarla (%50, %25, %10, %5 ve %1) karıştırılan adipojenik farklılaşmış 7F2 hücreleri (kırmızı noktalar) ve farklılaşmamış D1 ORL UVA hücrelerinin (yeşil noktalar) ve %50 oranda karıştırılan farklılaşmamış 7F2 ve D1 ORL UVA hücrelerinin relatif yoğunluklarının dağılım grafiği. (b) Manyetik levitasyona dayalı tanıma yöntemi ile farklı oranlarda karıştırılan 7F2 ve D1 ORL UVA hücrelerinin gözlenen oranları. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.



Şekil 63. Farklı günlerde (1, 5 ve 10. günler) %50 oranla karıştırılan farklılaşmamış 7F2 (kırmızı) ve D1 ORL UVA hücrelerinin (yeşil) levitasyonu ile elde edilen floresan görüntüleri.

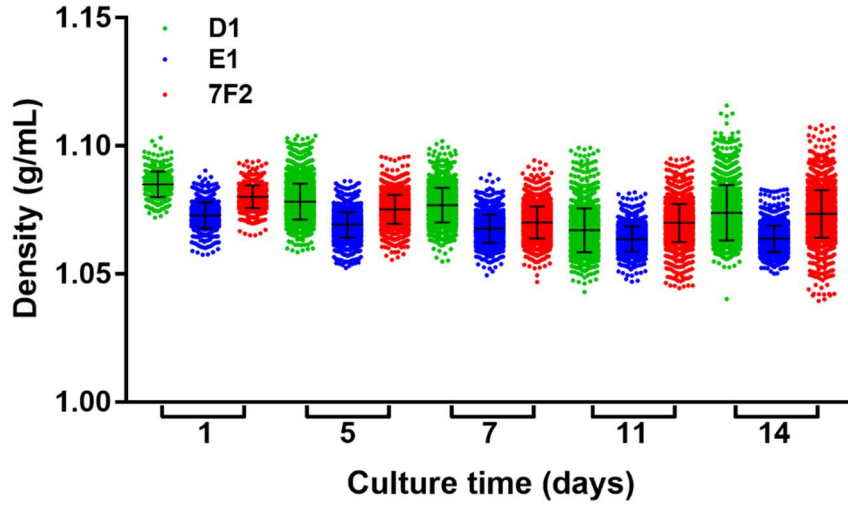


- I <1.02 g/mL
 II 1.02-1.06 g/mL
 III >1.06 g/mL



Şekil 64. 7F2 ve D1 ORL UVA hücrelerinin yoğunluğa bağlı olarak kategorizasyonu (a) 1. bölge: hücre yoğunluğu <1.02 g/mL, 2. bölge 1.02 g/mL < hücre yoğunluğu <1.06 g/mL, 3. bölge: hücre yoğunluğu > 1.06 g/mL olan hücreleri göstermektedir. (b) Yiğili sütun grafiği farklı oranlarda karıştırılan D1 ORL UVA ve 7F2 hücrelerinin belirtilen bölgelerdeki iki hücre tipinin yüzde dağılımını göstermektedir.

Kemik iliğinin hücresel heterojen yapısını temsil etmek için projede kullanılması tasarlanmış olan D1 ORL UVA, MC3T3-E1 ve 7F2 hücre hatlarının manyetik levitasyon sisteminde dengeye geldikleri yükseklik test edilmiştir (Şekil 65). 14. Güne kadar tutarlı bir farklılık trendi gözlemlenememiştir. Levitasyonun ilk ve son gününe bakıldığında D1 ORL UVA ve 7F2 hücreleri arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. MC3T3-E1 hücrelerinin ise diğer hücrelerden daha düşük yoğunluğa sahip olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 65. Standart besi ortamında kültür edilen kemik iliği hücrelerinin farklı günlerde (1, 5, 7, 11 ve 14. günler) 25 mM Gd^{3+} konsantrasyonu kullanılarak levite edilmesi ile hesaplanan yoğunluk değerlerinin dağılım grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu proje ile beraber manyetik levitasyon protokolü kemik iliği kökenli hücrelerin kısa ve uzun süreli kültürleri optimize edilmiştir. Proje ile beraber:

1) Manyetik levitasyon tekniğinin biyomühendislik alanlarında uygulamaları ile Türkiye’de ilk çalışma yapılmış, ve teknikler İYTE Biyomühendislik Bölümü bünyesinde içselleştirilmiştir. Proje sürecinde manyetik levitasyon teknikleri ile ilgili içselleştirilen deneyim uluslararası kitap bölümü olarak yayınlanarak bilimsel birikime aktarılmıştır (Anil-Inevi vd., 2019).

2) Manyetik levitasyon sağlayan Gd^{3+} bileşenli farklı kontrast ajanlarının sağladığı konsantrasyon/levitasyon yüksekliği ilgisi ve hücreler üzerindeki kısa ve uzun dönem etkileri ilk kez gösterilerek karşılaştırılmış, sonuçlar uluslararası olarak yayınlanmıştır (Anil-Inevi vd., 2018). Diyamanyetik prensipler ve Gd-tabanlı ajanlar kullanılarak gerçekleştirilen levitasyon ile daha önceden hücre manipülasyonu yapılabildiği gösterilmiştir (Durmus vd., 2015; Tocchio vd., 2017). Fakat kullanılan bu yöntem ve bileşenlerinin uzun süreli hücre kültürü için uyumlu olup olmadıkları daha önce hiç test edilmemişti. Bu çalışmalar sırasında levitasyon için Gd^{3+} ajanı için optimize edilen dozların ilerleyen zamanlarda gerçekleştirilecek çalışmalar için önemli bir referans kaynağı olacağı düşünülmektedir.

3) Proje çıktılarında kemik iliği kökenli hücreler 1-7 gün arasında manyetik levitasyonla ortamında kültürlenmişlerdir. Bu hücrelerin deney sonunda canlılıklarını korudukları direk ve indirek testlerle gösterilmiş, sonuçlar uluslararası olarak yayınlanmıştır. (Anil-Inevi vd., 2018). Bu sonuçlar, yeryüzü tabanlı ağırlıksız ortam yöntemleri için oldukça pratik, ucuz ve gözleme izin veren bir alternatif yöntemin literatürde ilk kez gösterilmesini sağlamıştır.

4) Proje çıktılarında, manyetik levitasyonla kültürlenmiş genel olarak hücrelerin çoğalma profillerinin, özelde ise G1, G2 ve S fazındaki hücre oranlarının 2 boyutlu kontrollere göre anormal olarak etkilenmediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar raporlama sırasında yayın için hazırlanmaktadır.

5) Proje çıktılarında, manyetik levitasyon için kullanılan mikroakışkan kanal hacminin hücrelerden çalışılabilir mRNA izolasyonu için yetersiz kaldığı gözlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda çeşitli optimizasyonlar ve iyileştirmeler çalışılmasına rağmen süre/hücre sayısı/mRNA miktarı ilişkisi istenen verimde çözülememiştir. Bu problemin çözülebilmesi için yeni bir proje fikri oluşturulmuş, ve manyetik levitasyon sisteminin kapiler kanaldan mililitre mertebesindeki tüplere taşınması kurgulanmıştır. Tüm levitasyon bileşenlerinin ve miktatısların revize edilmesini gerektiren bu proje **489555** geçici proje numarası ile TÜBİTAK’a hızlı destek (1002) kapsamında önerilmiştir.

6) Proje çıktılarında 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. Kemik iliği kökenli hücreler ve kanser hücreleri ile yapılan 3 boyutlu motifler uluslararası olarak yayınlanmıştır (Anil-Inevi vd., 2018). Yağlanmış kemik iliği ile sağlıklı kemik iliği hücreleri arasında oluşturulan üç boyutlu motifler şu anda yayına hazırlanmaktadır. Her ne kadar manyetik levitasyon ile asılı hücrelerin birleştirilmesi daha önceki çalışmalarla gösterilmişse de (Tocchio vd., 2017), proje sonuçları ile ilk kez doku mühendisliği için oldukça büyük olarak kabul edilebilecek blokların (≈ 2.68 cm) tek çeşit ve çok çeşit hücreler için gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir.

7) Proje çıktılarında ayrıca özkütle itibarıyla farklılıklar gösterebilen kemik iliği hücrelerinin başka herhangi bir belirtece ihtiyaç duymaksızın manyetik levitasyonla tanımlanmasına ve ayrıştırılmasına çalışılmış, durgun ve kemik yönelimine giren hücrelerde herhangi bir özkütle farkı gözlemlenmezken, yağ yönelimine girerek lipid biriktirmeye başlayan kemik iliği hücrelerinin diğer hücrelerden kolaylıkla ayrıştırılabileceği gösterilmiştir. Sonuçlar bu haliyle uluslararası olarak yayınlanmıştır (Sarigil vd., 2019). Sonuçlara göre kemik iliği kökenli kök hücrelerin, yağ yönelimine girişleri herhangi bir işaretçiye bağlı olmaksızın (label-free) ve gerçek zamanlı olarak hücrelerin özkütlelerine göre belirlenebilmiştir. Eş zamanlı şekilde birden çok yağ hücresinin ölçümünün gerçekleşmesi, ve sonuçlara 10 dakikadan kısa bir sürede ulaşılabilmesi, farklı doku ve organlarda yağlanmanın ölçülebilmesi için oldukça pratik, ucuz ve kolay bir yöntem oluşturmuştur. Bu yöntemin ileride doku mühendisliği ve ilaç çalışmalarında kullanılabilirliğini düşünüyoruz. Ayrıca bu çalışmada geliştirilen platformun örneğin cep telefonu ile entegrasyonu ile hasta başı ölçümlerin kolaylıkla yapılacağı düşünülmektedir. Bu tarz uygulamalar manyetik levitasyon için orak hücre anemisi ve kansızlık için önceden gösterilmiştir (Yenilmez vd., 2016; Felton vd., 2016). Buna uygun olarak platformumuzun kırsal ve uzak bölgelerde şişmanlık ve şişmanlıkla ilintili hastalıkların tanısına yardımcı olabilecek bir biyomedikal cihaza dönüşebileceği düşünülmektedir. Son olarak, geliştirilen sistem yağlanmaya başlayan hücreleri tanımlamayı başarsa da ileride geliştirilebilecek akış sistemleriyle bu hücrelerin ayrıştırılması da sağlanabilir.

Proje sonuçları ile beraber, manyetik levitasyon tekniğinin kemik iliği kökenli hücrelerde 1) ayrıştırma; 2) kültürleme; ve 3) biyofabrikasyon alanlarında birçok yeni çalışma yapılacağı öngörülmektedir. Kullanılan yöntemin hücreler için toksik olmaması, proje sırasında oluşturulan platformların gerçek zamanlı gözleme izin vermesi, manyetik alanın kolaylıkla manipüle edilebilmesi, kolay kurulan ve ucuz bileşenlere sahip olması özellikle kaynak kısıtlı araştırma süreçlerine oldukça ciddi avantajlar sağlamaktadır. İlerleyen projelerde, bu projede



kullanılan sistemin biyolojik hedefli çalışmalarla beraber, otomatizasyon ve hedef odaklı kapasitesinin de geliştirilmesi gündeme gelecektir.



6. KAYNAKLAR

- Anil-Inevi, M.; Yilmaz, E.; Sarigil, O.; Tekin, H. C.; Ozcivici, E., Single Cell Densitometry and Weightlessness Culture of Mesenchymal Stem Cells Using Magnetic Levitation. Springer: 2019.
- Anil-Inevi, M.; Yaman, S.; Yildiz, A. A.; Mese, G.; Yalcin-Ozuysal, O.; Tekin, H. C.; Ozcivici, E., Biofabrication of in situ Self Assembled 3D Cell Cultures in a Weightlessness Environment Generated using Magnetic Levitation. *Scientific Reports* 2018, 8 (1), 7239.
- Balian G, Wang G-J, Diduch D, Hahn C: Pluripotential bone marrow cell line and methods of using the same. In.: Google Patents; 2000.
- Baskan O., Mese G., Ozcivici E., Low-intensity vibrations normalize adipogenesis-induced morphological and molecular changes of adult mesenchymal stem cells. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine. (2017)
- Batra NN, Li YJ, Yellowley CE, You L, Malone AM, Kim CH, Jacobs CR, Effects of short-term recovery periods on fluid-induced signaling in osteoblastic cells, *JBiomech*, 38, 1909-17, (2005).
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL, Osteoclast differentiation and activation, *Nature*, 423, 337-42, (2003).
- Brooks J, Reavis J, Medwood R, Stalcup T, Meisel M, Steinberg E, Arnowitz L, Stover C, Perenboom J, New opportunities in science, materials, and biological systems in the low-gravity (magnetic levitation) environment, *Journal of applied physics*, 87, 6194-9, (2000).
- Burr DB, Martin RB, Schaffler MB, Radin EL, Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage, *J Biomech*, 18, 189-200, (1985).
- Demiray, L, Ozcivici, E., Bone marrow stem cells adapt to low-magnitude vibrations by altering their cytoskeleton during quiescence and osteogenesis. *Turkish Journal of Biology*. (2015)
- Donahue SW, Sharkey NA, Modanlou KA, Sequeira LN, Martin RB, Bone strain and microcracks at stress fracture sites in human metatarsals, *Bone*, 27, 827-33, (2000).
- Durmus NG, Tekin HC, Guven S, Sridhar K, Yildiz AA, Calibasi G, Ghiran I, Davis RW, Steinmetz LM, Demirci U, Magnetic levitation of single cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, E3661-E8, (2015).
- Felton E. J., A. Velasquez, S. Lu, R. O. Murphy, A. ElKhal, O. Mazor, P. Gorelik, A. Sharda and I. C. Ghiran, *Lab Chip*, (2016)
- Frost HM, Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal, *Anatomical Record*, 219, 1-9, (1987).
- Goodwin T, Prewett T, Wolf DA, Spaulding G, Reduced shear stress: A major component in the ability of mammalian tissues to form three-dimensional assemblies in simulated microgravity, *Journal of cellular biochemistry*, 51, 301-11, (1993).
- Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL, The Expression of Osteoprotegerin and RANK Ligand and the Support of Osteoclast Formation by Stromal-Osteoblast Lineage Cells Is Developmentally Regulated 1, *Endocrinology*, 141, 4768-76, (2000).
- Guevorkian K, Valles Jr JM, Varying the effective buoyancy of cells using magnetic force, *Applied physics letters*, 84, 4863-5, (2004).

- Hughes-Fulford M, Lewis ML, Effects of microgravity on osteoblast growth activation, *ExpCell Res*, 224, 103-9, (1996).
- Huppertz A, Rohrer M, Gadobutrol, a highly concentrated MR imaging contrast agent: its physicochemical characteristics and the basis for its use in contrast-enhanced MR angiography and in perfusion imaging, *European radiology*, 14, M12-M8, (2004).
- Ingber DE, Mechanical control of tissue growth: function follows form, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11571-2, (2005).
- Johnson KA, Sistrunk ML, Polisensky DH, Braam J, Arabidopsis thaliana responses to mechanical stimulation do not require ETR1 or EIN2, *Plant Physiology*, 116, 643-9, (1998).
- Kapur S, Baylink DJ, Lau KH, Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways, *Bone*, 32, 241-51, (2003).
- Kaysen J, Campbell W, Majewski R, Goda F, Navar G, Lewis F, Goodwin T, Hammond T, Select de novo gene and protein expression during renal epithelial cell culture in rotating wall vessels is shear stress dependent, *The Journal of membrane biology*, 168, 77-89, (1999).
- Kruse K, Julicher F, Oscillations in cell biology, *Curr Opin Cell Biol*, 17, 20-6, (2005).
- Lang T, LeBlanc A, Evans H, Lu Y, Genant H, Yu A, Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight, *J Bone MinerRes*, 19, 1006-12, (2004).
- LeBlanc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbretson DA, Krebs JM, Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest, *J Bone Miner Res*, 5, 843-50, (1990).
- LeBlanc A, Shackelford L, Schneider V, Future human bone research in space, *Bone*, 22, 113S-6S, (1998).
- Martin B, Aging and strength of bone as a structural material, *CalcifTissue Int*, 53 Suppl 1, S34-S9, (1993).
- Martini F, Ober WC: *Fundamentals of anatomy & physiology*, 7th ed edn. San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings; 2006.
- Marwick C, Consensus panel considers osteoporosis, *JAMA*, 283, 2093-5, (2000).
- Neel PL, Harris RW, Motion-induced inhibition of elongation and induction of dormancy in liquidambar, *Science*, 173, 58-9, (1971).
- NIH Conference NCD, Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, NIH ConsensStatement, 17, 1-45, (2000).
- Olmeda A, Greco F, Timar J, Malgaroli E, Death rate in patients submitted to the surgical treatment of fracture of the proximal femur, *Chir Organi Mov*, 80, 179-81, (1995).
- Orr AW, Helmke BP, Blackman BR, Schwartz MA, Mechanisms of mechanotransduction, *Developmental cell*, 10, 11-20, (2006).
- Ozcvici E, Luu YK, Adler B, Qin YX, Rubin J, Judex S, Rubin CT, Mechanical signals as anabolic agents in bone, *Nature reviews Rheumatology*, 6, 50-9, (2010a).
- Ozcvici E, Luu YK, Rubin CT, Judex S, Low-level vibrations retain bone marrow's osteogenic potential and augment recovery of trabecular bone during reambulation, *PLoS One*, 5, e11178, (2010b).
- Ozcvici E, Effects of spaceflight on cells of bone marrow origin, *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*, 30, 1-7, (2013).

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284, 143-7, (1999).
- Ramneemark A, Nyberg L, Borssén B, Olsson T, Gustafson Y, Fractures after stroke, *Osteoporosis International*, 8, 92-5, (1998).
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH, Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling, *AnnuRevBiomedEng*, 8, 455-98, (2006).
- Rosen CJ, Bouxsein ML, Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone?, *NatClinPractRheumatol*, 2, 35-43, (2006).
- Rubin CT, Capilla E, Luu YK, Busa B, Crawford H, Nolan DJ, Mittal V, Rosen CJ, Pessin JE, Judex S, Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals, *P Natl Acad Sci USA*, 104, 17879-84, (2007).
- Sarigil, O.; Anil, M.; Yilmaz, E.; Mese, G.; Tekin, H. C.; Ozcivici, E., Label-free density-based detection of adipocytes of bone marrow origin using magnetic levitation. *Analyst* (2019).
- Sarkar D, Nagaya T, Koga K, Nomura Y, Gruener R, Seo H, Culture in vector-averaged gravity under clinostat rotation results in apoptosis of osteoblastic ROS 17/2.8 cells, *J Bone Miner Res*, 15, 489-98, (2000).
- Shackelford LC, LeBlanc AD, Driscoll TB, Evans HJ, Rianon NJ, Smith SM, Spector E, Feedback DL, Lai D, Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss, *J ApplPhysiol*, 97, 119-29, (2004).
- Sibonga JD, Evans HJ, Sung HG, Spector ER, Lang TF, Oganov VS, Bakulin AV, Shackelford LC, LeBlanc AD, Recovery of spaceflight-induced bone loss: bone mineral density after long-duration missions as fitted with an exponential function, *Bone*, 41, 973-8, (2007).
- Tasoglu S, Khoory JA, Tekin HC, Thomas C, Karnoub AE, Ghiran IC, Demirci U, Levitational image cytometry with temporal resolution, *Advanced Materials*, 27, 3901-8, (2015).
- Thompson DL, Lum KD, Nygaard SC, Kuestner RE, Kelly KA, Gimble JM, Moore EE, The derivation and characterization of stromal cell lines from the bone marrow of p53^{-/-} mice: new insights into osteoblast and adipocyte differentiation, *Journal of Bone and Mineral Research*, 13, 195-204, (1998).
- Tocchio A, Durmus NG, Sridhar K, Mani V, Coskun B, El Assal R, Demirci U, Magnetically Guided Self-Assembly and Coding of 3D Living Architectures, *Advanced Materials*, 30, 4, (2017).
- Tombach B, Heindel W, Value of 1.0-M gadolinium chelates: review of preclinical and clinical data on gadobutrol, *European radiology*, 12, 1550-6, (2002).
- Ueno S, Iwasaka M, Properties of diamagnetic fluid in high gradient magnetic fields, *Journal of Applied Physics*, 75, 7177-9, (1994).
- Villa A, Versari S, Maier J, Bradamante S, Cell behavior in simulated microgravity: a comparison of results obtained with RWV and RPM, *Gravitational and Space Research*, 18, (2007).
- Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT, Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential, *Journal of Bone and Mineral Research*, 14, 893-903, (1999).



Yenilmez B., S. Knowlton and S. Tasoglu, *Adv. Mater. Technol.*, (2016)

Young SR, Gerard-O'Riley R, Harrington M, Pavalko FM, Activation of NF-kappaB by fluid shear stress, but not TNF-alpha, requires focal adhesion kinase in osteoblasts, *Bone*, 47, 74-82, (2010).

Yuge L, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Kataoka K, Cell differentiation and p38MARK cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 39, 89-97, (2003).

Zayzafoon M, Gathings WE, McDonald JM, Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis, *Endocrinology*, 145, 2421-32, (2004).

Zhou XL, Batiza AF, Loukin SH, Palmer CP, Kung C, Saimi Y, The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7105-10, (2003).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ENGİN ÖZÇİVİCİ
Proje No:	215S862
Proje Başlığı:	Manyetik Levitasyon Yöntemiyle Kemik Hücrelerinin Ağırılıksız Ortamda Kültürlenmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	AHU ARSLAN YILDIZ
Danışmanlar:	HÜSEYİN CUMHUR TEKİN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2016 - 01/05/2019
Onaylanan Bütçe:	561073.0
Harcanan Bütçe:	476963.38
Öz:	<p>Mekanik kuvvetler canlılarda özellikle kas ve kemik dokularının sağlıklı formlarda bulunmasında ve fonksiyonlarını yerine getirmesinde önemli rol oynarlar. Mekanik kuvvetlerin kısmen ya da tamamen ortadan kalktığı felç, yatalıklık, yaşlılık ve yerçekimsiz ortam koşulları kas ve kemik dokusunda ciddi miktarda kayıplar meydana getirmektedir. Kemik doku kayıplarına ek olarak mekanik yüklenmenin ortadan kalkması kemik iliğinde bulunan ve kemik hücre havuzunu oluşturan mezenkimal kök hücrelerin yağ yönelimine girmelerine ve kemik iliğinin aşırı miktarda yağlanması sebep olur. Bu durum kemiklerde kırılma riskini artırır. Ayrıca yağ yönelimine bir kez giren kök hücreler kronik olarak tekrar kemik oluşturmaya, dolayısıyla rejenerasyona kolayca yönelemezler. Yaşam koşulları ya da ilerleyen yaş sebebiyle bir insanın kemik kütlelerini kaybedip yağ kütlesi kazanmasının birey ve toplum için ciddi bir sosyo-ekonomik maliyeti vardır. Modern toplumda yaş ortalaması artıp hareket ihtiyacı azalırken, kemik erimesi (osteoporoz) ve şişmanlık (obezite) oranlarında da bir artış görülmekte ve bu hastalıkların tedavisi için gereken maddi kaynaklar toplum refahını kısıtlamaktadır. Bu durumla mücadele edebilmek için tedaviye yönelik biyomedikal yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir.</p> <p>Mekanik kuvvet yoksunluğu ile kemik erimesinin arasındaki ilişkinin incelenmesi için günümüzde gönüllü yatalıklık, fiziksel sınırlama ve kasılmayı önleyici ajanların kullanılması gibi yöntemler tercih edilmektedir. Ancak bu teknikler uygulama zorluğu ve barındırdığı etik problemler dolayısıyla verimli olarak kullanılamamaktadır. Bunun yanı sıra da hücre bazındaki mekanik kuvvet yoksunluğu veya ağırılıksız ortam çalışmaları pahalı uzay uçuşları veya biyoreaktör sistemlerine olan gereksinimden dolayı detaylı olarak gerçekleştirilememektedir. Son yıllarda temel amacı hücre ayrıştırma olarak geliştirilen manyetik levitasyon tekniği kemik hücrelerinin ağırılıksız ortamda incelenebilmesi için oldukça önemli bir fırsat yaratmıştır. Bu projenin amacı manyetik levitasyon prensibini kullanarak kemik ve kemik iliği hücrelerini ağırılıksız ortamda kültürleyerek, oluşan moleküler ve hücresel değişimleri kısa ve uzun vadeli olarak incelemektir. Bu amaca ulaşmak için hücre kültürü sırasında besiyeri ortamı Gadolinium iyonları kullanılarak paramanyetik hale getirilmiş ve hücreler iki adet neodymium mıknatısın yaratacağı manyetik ortamda ağırlık vektörleri sıfırlanmış şekilde asılı kalmıştır. Projenin sonuçlanması ile manyetik levitasyon tekniği ile ağırılıksız ortamda kemik hücre kültürü teknolojisi geliştirilmiş olacak, ayrıca kemik hücrelerinin ağırılıksız ortamda verdikleri hücresel ve moleküler yanıtların kolay ve ucuz bir şekilde incelenmesi sağlanmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Ağırılıksız Ortam, Manyetik Levitasyon, Gadolinium, Kemik Hücresi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Label-free density-based detection of adipocytes of bone marrow origin using magnetic levitation (Makale - Diğer Hakemli Makale), 2- Magnetic Force-Based Micro fluidic Techniques for Cellular and Tissue Bioengineering (Makale - Diğer Hakemli Makale), 3- Biofabrication of in situ Self Assembled 3D Cell Cultures in a Weightlessness Environment Generated using Magnetic Levitation (Makale - İndeksli Makale),