



Design of circulating microfluidic bioreactor for circulating tumor cells research and shear stress effects on breast cancer (MDA-MB-231) cell viability

Semih Çalamak*

Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara 06100, Turkey.

Highlights:

- Circulating tumor cell model
- This model is basically a mimic for the cellular microenvironment as the cell flows such as in hemodynamic circulation.
- This work hints a unique direction that cancer cells lose their viability during circulating in flow.

Keywords:

- Circulating microfluidic bioreactor
- Shear stress
- Breast cancer
- Cell viability

Article Info:

Research Article

Received: 02.04.2020

Accepted: 31.08.2020

DOI:

10.17341/gazimmfd.713409

Correspondence:

Author: Semih Çalamak

e-mail:

semihcalamak@hacettepe.edu.tr

phone: +90 312 305 1499

Graphical/Tabular Abstract

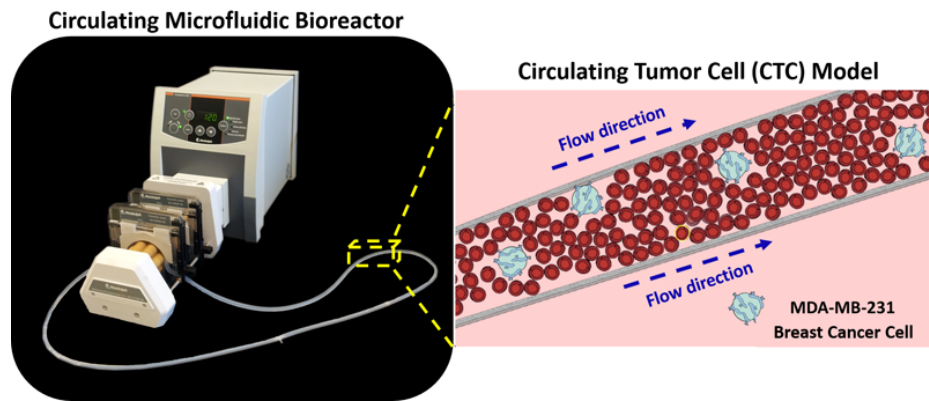


Figure A. Circulating microfluidic bioreactor and circulating tumor cell model

Purpose: The purpose of the study is to design a broadly applicable experimental method to model hemodynamic biomechanical factors (fluid flow and shear stress) under well-controlled parameters and investigate how hemodynamic shear stress affects MDA-MB-231 breast cancer cell viability.

Theory and Methods: In this study, a peristaltic circulating flow bioreactor is designed and applied to MDA-MB-231 breast cancer cells to mimic the fluid dynamics of hemodynamic circulation. For this purpose, we designed a bioreactor system to evaluate the effect of hemodynamic shear stress on a model system to represent the morphogenetic changes of MDA-MB-231 breast cancer cells as an *in-vitro* cancer bioreactor model. To mimic hemodynamic conditions, we first theoretically evaluated and characterized the physical environmental parameters such as shear stress and velocity profiles in order to assess and predict their influence on cancer cells in peristaltic flow culture. During the circulation culture, MDA-MB-231 breast cancer cell viability was determined with MTT and live/dead analyzes under various hemodynamic shear stresses (33, 49 and 66 dyn cm⁻²) and circulation time (6, 12 and 24 h).

Results: MTT test results on MDA-MB-231 cells showed that cell viability decreased as hemodynamic shear stress and circulation time increased compared to breast cancer cells cultured under static conditions attached to the surface. Significant reductions in cell viability of up to 20% occurred as increased hemodynamic shear stress (66 dyn cm⁻²) and culture time (24 h) increased with flow rate.

Conclusion: Our model is a simplified version of blood circulation, simulating fluid shear stresses in absence of other cellular components with this system, the viability of cancer cells under hemodynamic flow conditions can be evaluated. Also, this system allows exploring the unknowns in circulating tumor cell heterogeneity.



Dolaşımdaki tümör hücreleri araştırmalarında kullanılmak üzere sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktörün tasarımı ve hemodinamik kayma gerilimi kuvvetlerinin meme kanseri (MDA-MB-231) hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

Semih Çalamak*^{ID}

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı, 06100, Ankara, Türkiye

Ö N E Ç İ K A N L A R

- Dolaşımdaki tümör hücresi modeli
- Bu model temel olarak hemodinamik dolaşımda olduğu gibi hücresel mikroçevreyi taklit eder
- Bu çalışma, kanser hücrelerinin dolaşım sırasında hücre canlılıklarını kaybettiklerini işaret etmektedir

Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi
Geliş: 02.04.2020
Kabul: 31.08.2020

DOI:

10.17341/gazimmfd.713409

Anahtar Kelimeler:

Sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör,
kayma gerilimi,
meme kanseri,
hücre canlılığı

ÖZET

Kanser metastazı sırasında dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC) mikro ortamlarında hidrostatik basınç ve kayma gerilimi gibi biyomekanik kuvvetlere maruz kalmaktadırlar. Bu faktörler kanser hücresinin heterojenitesinde önemli bir rol oynarken, hücre canlılığını da büyük oranda etkilemektedir. Bu çalışmada, CTC hücrelerinin metastaz sürecinde maruz kaldıkları hemodinamik kayma gerilimini taklit etmek için sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör geliştirilmiş ve mikroakışkan biyoreaktörün hız, duvar basıncı ve kayma gerilimleri için teorik hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, mikroakışkan kanal boyutları sabit tutularak üç farklı akış hızında (6, 9 ve 12 mL dk⁻¹) artan hemodinamik kayma gerilimlerinde ve sirkülasyon zamanlarında (6, 12 ve 24 saat) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin canlılıkları MTT ve Canlı/Ölü testi ile incelenmiştir. Deneysel sonuçlar, statik koşullarda kültür edilen meme kanseri hücrelerine kıyasla, hücreler üzerindeki hemodinamik kayma gerilimi ve sirkülasyon süresi arttıkça hücre canlılığının azaldığını göstermiştir. Bununla birlikte yüksek hemodinamik kayma gerilimi (66 dyn cm⁻²) ve uzun sirkülasyon süresinde (24 saat) hücre canlılığının %20'ye kadar düştüğü bildirilmiştir. Bu çalışma ile geliştirilen sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör ile kanser hücrelerinin hemodinamik akış koşullarında canlılıkları değerlendirilebileceği gibi fenotipik ve genotipik değişimler de incelenebilecektir.

Design of circulating microfluidic bioreactor for circulating tumor cells research and shear stress effects on breast cancer (MDA-MB-231) cell viability

H I G H L I G H T S

- Circulating tumor cell model
- This model is basically a mimic for the cellular microenvironment as the cell flows such as in hemodynamic circulation
- This work hints a unique direction that cancer cells lose their viability during circulating in flow

Article Info

Research Article
Received: 02.04.2020
Accepted: 31.08.2020

DOI:

10.17341/gazimmfd.713409

Keywords:

Circulating microfluidic bioreactor,
shear stress,
breast cancer,
cell viability

ABSTRACT

During cancer metastasis, circulating tumor cells (CTC) are exposed to biomechanical forces such as hydrostatic pressure and shear stress in their microenvironments. While these factors play an important role in the heterogeneity of the cancer cell, they also greatly affect cell viability. In this study, a circulating microfluidic bioreactor was developed to mimic the hemodynamic shear stress that CTC cells are exposed to during the metastasis process and theoretical calculations were carried out for the velocity, wall pressure and shear stresses of the microfluidic bioreactor. After that, the viability of MDA-MB-231 breast cancer cells at increasing hemodynamic shear stresses and circulation times (6, 12, and 24 hours) at three different flow rates (6, 12 and 24 hours), was investigated via MTT test and live/dead assay. Experimental results showed that cell viability decreased as the hemodynamic shear stress and circulation time on cells increased compared to breast cancer cells cultured in static conditions. Also, it has been reported that cell viability decreases up to 20% in high hemodynamic shear stress (66 dyn cm⁻²) and long circulation time (24 hours). With this circulating microfluidic bioreactor, the viability of cancer cells in hemodynamic flow conditions can be evaluated as well as phenotypic and genotypic changes can be examined.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: semihcalamak@hacettepe.edu.tr / Tel: +90 312 305 1499

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

In-vivo sistemlerde ve fizyolojik ortamlarda bütün hücrelerin kayma gerilimine maruz kaldıkları uzun zamandır bilinen bir fenomendir. Son yıllarda *in-vivo* ortamda meydana gelen akış dinamiklerinin kanser hücreleri üzerine etkileri *in-vitro* deneyler ve çeşitli simülasyon çalışmalarıyla aydınlatılmaya çalışılmaktadır. *In-vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre vücudumuzdaki hücreler kan akış hızı ve hücre dışı matrikste (ECM) meydana gelen sıvı transferlerindeki değişikliklere bağlı olarak farklı seviyelerde kayma gerilimlerine maruz kalmaktadırlar [1]. Kayma gerilimi olarak adlandırılan bu vektör, birim yüzeye etki eden normal ve kayma elemanlarının bileşkesi olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, ECM içerisinde bulunan hücreler sıvı kayma geriliminin dışında hidrostatik basınç, gerinim ve sıkıştırma gibi çok sayıda fiziksel kuvvete maruz kalırlar. Kayma gerilimlerinin yanı sıra hücrelerin tutunduğu yüzeyin biyomekanik özelliklerinin hücre farklılaşmasına, karsinojenize, epitelden mezenkimal geçişe ve metastaz gibi hücresel süreçler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [2]. Bu süreçlerin yönetiminde hücreler mikro ortamlarını transmembran proteinleri aracılığıyla algırlar. Literatürde yapılan çalışmalar ECM'nin biyomekanik özelliklerinin neoplastik hastalığın ilerlemesinde doğrudan etkili olduğu ve kanser metastazında ECM'nin sertliğinin karsinom hücrelerinin hareketliliğini etkilediği gösterilmiştir [2-4]. Ayrıca, ECM sertliği, yoğunluğu kanser hücrelerinde bir dizi yanıt ortaya çıkarır. ECM sertliğinin ve yoğunluğunun kanser hücresi davranışını değiştirdiği mekanizmalardan biri integrin aktivasyonudur. ECM sertliği ile birlikte integrinlerin aktifleştirilmesi, ERK ve Rho/ROCK ekspresyonu ile tümör oluşumu teşvik edilmektedir [3]. Hücrelere etki eden biyomekanik kuvvetlerin arasında sıvı kayma gerilimi en çok öne çıkan kuvvettir. Bunun en büyük nedeni kan hücreleri endotel hücreleri ve kas hücreleri başta olmak üzere birçok hücre türü kayma gerilimine maruz kalırlar [1]. Fizyolojik ortamlarda kayma geriliminin oluşturduğu akış dinamikleri damarların içerisinde dolaşan kan akışı ve ECM içerisinde bulunan interstisyel akış olarak ikiye ayrılmaktadır. İnterstisyel akış, vücut sıvılarının (kan, plazma, lenf sıvısı vb.) hücreler etrafında ve intersitium oluşuran gözenekleri boyunca yavaş hareket etmesidir. İnterstisyel akışın ana fonksiyonlarından biri, kılcal damarlardan sızan ve kan dolaşımına geri dönen lenfatik drenajdır. Bu drenaj, kan damarları, interstitium ve lenfatikler arasındaki ozmotik ve hidrostatik basınç gradyanları olan Starling'in kuvvetleri nedeniyle oluşur [4, 5]. İnterstisyel sıvının bileşimi, vücuttaki yerine bağlı olarak değişebilir, ancak yumuşak dokularda genellikle kılcal damarlardan sızan kan plazmasına benzer ve plazma proteinlerinin yaklaşık %40'ını içeren bir sıvıdır. İnterstisyel sıvıların akış hızının normal dokularda 0,1 ila 1,0 $\mu\text{m s}^{-1}$ arasında olduğu bilinmekle birlikte hücrelerinin yüzeyine uygulanan kayma geriliminin yaklaşık 0,1 dyn cm^{-2} olduğu öngörülmektedir [6-8]. Son dönemdeki mikroçip çalışmalarında taklit edilmeye çalışılan akış dinamikleri interstisyel akışlar olup genellikle bu akışın laminar akış

olarak varsayıp çözümlendiği bilinmektedir [9, 10]. Bu nedenle son dönemdeki fonksiyonel mikrodokuların araştırılması ve gerçek doku ilaç etkileşimlerinin incelenmesi için mikroçipler büyük önem kazanmıştır [11, 12]. Metastaz süreci sadece biyolojik ve biyokimyasal düzenleyicilerden değil, aynı zamanda tümör mikroçevresindeki hemodinamik kuvvetler ve bu mikroçevredeki interstisyel sıvı akışı gibi farklı fiziksel kuvvetlerden etkilenmektedir [13]. Ayrıca, hidrostatik basınç, sıkıştırma ve gerginlik gibi mekanik kuvvetler de kanser hücrelerinin heterojenliğini ve metastazını önemli ölçüde etkiler [9, 14]. Kan dolaşımı, tüm organların normal faaliyetlerini sürdürebilmesi için oldukça kritiktir. Kan dolaşımı sayesinde insan vücudundaki her bir hücreye sürekli besin ve oksijen sağlanırken metabolik atıklar hücre dokulardan uzaklaştırılır. Hem arter hem de venlerdeki akış pulsattır. Arteriyel ve venöz kan akışı için fizyolojik akış gerilimi aralığı sırasıyla 10-70 dyn cm^{-2} civarındadır [15]. Literatür çalışmaları, kanser hücrelerinin vasküler sistemde arteriyel dolaşımında 4,0 – 70,0 dyn cm^{-2} arasında değişen hemodinamik kayma kuvvetlerine maruz kaldığını göstermiştir. Kan damarlarındaki akışkan kayma gerilimi mevcut literatüre göre dört derece olarak tanımlanmıştır: mikro, düşük, orta ve yüksek; bunlar sırasıyla 0-0,5 dyn cm^{-2} , 0,5-15 dyn cm^{-2} , 15-30 dyn cm^{-2} ve > 30 dyn cm^{-2} sıvı kayma gerilimi aralıklarına karşılık gelmektedir. Kayma oranları damarlarda yaklaşık 160 s^{-1} ile atar damarlarda 900 s^{-1} arasında değişebilir [16, 17].

Kayma geriliminin yüzeye tutunmuş kanser hücrelerinin canlılıklarına etkisi daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [18, 19]. Tümör mikro çevresinde oluşan kayma geriliminin yarattığı fiziksel uyarıya maruz kalan over ve özofagus kanseri hücrelerinin davranışını araştırmak için *in-vitro* ortamda mikroakışkan platformlar kullanılmıştır [9, 14]. Mikroakışkan tabanlı *in-vitro* modeller kanser hücreleri tarafından oluşturulan tümörlerin heterojenliğini taklit ederek tümör dinamiği mekanizmalarının anlaşılması için güçlü araçlar olarak bilinirler. Her ne kadar daha kök hücre benzeri bir fenotipe sahip CTC'lerin sekonder tümörler oluşturma olasılığı daha yüksek olsa da; bu fenotipi nasıl veya ne zaman kazandıkları iyi anlaşılammıştır [20]. Akışa bağlı kayma gerilimi gibi mekanik mikro çevresel faktörler, hücre döngüsüne, kanser hücrelerinin metastatik karakterini modüle edebilir. Bu konudaki çalışmalar, hemodinamik kan akışının hücresel zar bileşenlerini ve kanser hücrelerinin morfojenetik karakterini etkileyebileceğini göstermiştir [21, 22]. Bu çalışmada, CTC hücrelerinin metastaz sürecinde orta boy arterlerde maruz kaldıkları hemodinamik kayma gerilimini taklit etmek için sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör geliştirilmiş ve mikroakışkan biyoreaktörün hız, duvar basıncı ve kayma gerilimleri için teorik hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, mikroakışkan kanal boyutları sabit tutularak üç farklı akış hızında (6, 9 ve 12 mL dk^{-1}) artan hemodinamik kayma gerilimlerinde ve sirkülasyon zamanlarında (6, 12 ve 24 saat) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin canlılıkları MTT ve Canlı / Ölü testi ile incelenmiştir.

2. MATERYAL METOT (MATERIAL AND METHOD)

Bu çalışmada dolaşımdaki meme kanseri hücrelerinin (MBA-MD-231) damar içinde buldukları biyofiziksel kuvvetleri taklit edilmesi ve kayma gerilimi kuvvetlerinin meme kanseri hücreleri üzerine hücre canlılığının incelenmesi için sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktörün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ilk olarak sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktörün tasarımı gerçekleştirilmiş ve farklı akış hızlarında mikrokanallarda oluşan hız profilleri ve kayma gerilmeleri sayısal olarak incelenmiştir.

2.1. Sirkülasyonlu Mikroakışkan Biyoreaktörün Tasarımı (Design of Circulating Microfluidic Bioreactor)

Sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktörün tasarımı iki temel bölümden oluşmaktadır: (1) programlanabilir bir peristaltik pompa ve (2) sirkülasyon elemanları (silikon tüpler ve kasetler). Programlanabilir peristaltik pompa dolaşımdaki akış hızlarını ve kayma gerilmelerini optimize etmek için kullanılmıştır. Bu çalışmada hücre canlılığı ve CO₂ (g) ve O₂(g) gaz geçirgenliklerini sağlamak için silikon tüpler (Uxcell (ID:0,5 mm x OD:1mm) kullanılmıştır. Biyoreaktör elemanlarının sterilizasyonu için silikon tüpler 70 cm uzunluğunda kesilerek tüm borular ve bağlantı noktaları (polypropylene ID:0,5 mm) alüminyum folyo ile sarılıp 120°C'de 20 dakika boyunca otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra silikon tüpler ve bağlantı noktaları laminer akış kabinin altında steril koşullarda birleştirilmiştir.

2.2. Sirkülasyonlu Mikroakışkan Biyoreaktörünün Hesaplamalı Akışkan Dinamik (CFD) Modeli (Computational Fluid Dynamic (CFD) Model of Circulating Microfluidic Bioreactor)

Süspans edilmiş meme kanseri hücresi üzerindeki kayma gerilimi etkisini değerlendirmek için dolaşımdaki akış sisteminin teorik olarak incelemesi yapılmıştır. Borudaki Reynolds sayısı (Re) Eş. 1 'den hesaplanmıştır:

$$Re = \frac{QDh\rho}{\mu A} \quad (1)$$

Q, hacimsel akış hızı (6, 9 ve 12 mL dk⁻¹), D_h borunun hidrolik çapı, ρ akışkan yoğunluğu, μ akışkanın dinamik viskozitesi ve A, borunun kesit alanıdır. 37°C'de akışkan yoğunluğu ve dinamik viskozite sırasıyla 1000 kg m⁻³ ve 0,000692 kg m⁻¹ s⁻¹'dir.

Arterlerdeki fizyolojik kayma gerilim 4,0–70 dyn cm⁻² arasında olduğu bilinmektedir. Burada besiyeri akış dinamiği zamana bağlı Navier-Stokes denklemleri kullanılarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, besiyerinin Newtonian bir davranışla sınırlanamaz ve homojen olduğu varsayılmıştır, çünkü viskozitesi nispeten büyük çaplı arterlerde neredeyse sabittir; bu nedenle, Newtonian olmayan etkiler ihmal edilmiştir [23]. Stokes akışında, Eş. 2'ye göre kanalın ortasındaki kayma gerilimi hesaplanır.

$$T = \frac{6\mu Q}{h^2 w} \quad (2)$$

Burada μ akışkanın dinamik viskozitesi (0.000692 kg m⁻¹ s⁻¹), Q hacimsel akış hızı (6, 9 ve 12 mL dk⁻¹), h mikrokanalın yüksekliği (0,5 mm) ve w mikrokanalın genişliğidir (0,5 mm). Mikroakışkan kanalda kaymaz (no-slip) sınır koşulları kabul edilmiş ve lokal duvar kayma gerilimi dağılımını değerlendirmek için, sonlu elemanlar yöntemi COMSOL Multiphysics™ 5.2a kullanarak hesaplamalı akışkanlar dinamiği modeli kullanılmıştır. Mikroakışkan biyoreaktörün kanal tasarımı belirlendikten sonra sayısal çözümlemenin yapılabilmesi için modelin ağ yapısının belirlenmesine geçilmiştir. Bu amaçla, mikroakışkan kanalın ağ tasarımı için üçgen ve dörtgen ağ yapısından faydalanılmıştır. Bu amaçla, kanal duvarı düzleminden kanal iç kısmına doğru paralel olarak belli bir orantıyla büyüyen üçgen ağ yapısı kullanılmıştır. Sayısal çözümler için ilk olarak en iyi ağ yapısı bulunmuştur. Bundan sonra akış hızı, kayma gerilimi ve basınç değişimi gibi değişkenler için sayısal çözümler yapılmıştır [24-26]

2.3. Meme Kanseri (MDA-MB-231) Hücre Kültürü Çalışmaları (Breast Cancer (MDA-MB-231) Cell Culture Studies)

Meme kanseri hücreleri 75 cm²'lik yüzey alanına sahip doku kaplarında, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin ile hazırlanmış yüksek glukozlu DMEM ile kültür edilmiştir. Bu amaçla hücreler 48 saat boyunca kültür edildikten sonra meme kanseri hücreleri yüzeyden tripsin enzimi kullanılarak kaldırılmıştır. Daha sonra 1x10⁵ hücre 550 μL besiyeri içerisinde dağıtılarak laminer akış kabini içerisindeki silikon tüplere konularak tüplerin bağlantıları gerçekleştirilmiştir. Sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktöre konulan hücreler 6, 12 ve 24 saat boyunca 6, 9 ve 12 mL dk⁻¹ akış hızlarında inkübe edilmişlerdir (37°C ve %5 CO₂). Hücre kültürü çalışmalarında kontrol grubu olarak aynı hücre konsantrasyonunda petri kaplarına tutundurulmuş hücreler kullanılmıştır. Herbir deney grubu için n=3 çalışılmıştır.

2.4. Hücre Canlılığı Analizleri (Cell Viability Analyses)

Sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktörde üç farklı kayma gerilimine maruz bırakılan meme kanseri hücrelerinin hücre canlılıklarının incelenmesi için 3-(4,5-Dimetil Thiazol-2-yl)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür (MTT) ve canlı/ölü (live/dead) hücre testleri gerçekleştirilmiştir.

2.4.1. MTT testi (MTT test)

Sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör ile farklı kayma gerilimlerine maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığının belirlenmesi için ISO10993, Bölüm 5: *in-vitro* sitotoksitesite testleri "standartının "MTT sitotoksitesite testi" prosedürü kullanılmıştır. Buna göre, süspans haldeki hücreler 6, 12 ve 24 saat boyunca mikroakışkan biyoreaktörde sirkülasyonlu akışa maruz bırakıldıktan sonra

hücreler 24 kuyucuklu petri kabına yerleştirilmiş ve üzerlerine 2 mL besiyeri yeri (%90 DMEM, %10 FBS %1 L-Glutamin %0,2 Penisilin/Streptomisin) eklenmiştir. Daha sonra, her bir kuyucuğa fosfat tamponlu salin (PBS) içinde hazırlanmış 1 mg/mL derişimindeki 25 µL MTT çözeltisi eklenerek hücreler 4 saat boyunca inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) bekletilmiştir. Inkübasyondan sonra hücrelerin mitokondrilerinde oluşturduğu formazan kristallerini açığa çıkarmak ve hücre zarlarını parçalamak için kuyucuklara izoopropanol/HCl çözeltisi eklenmiştir. 30 dk boyunca hücreler karanlık ortamda tutularak hücrelerin absorbanları 570 nm'de mikropilaka okuyucuda okunmuştur. % Hücre canlılığı kontrol grubunun absorbanı %100 sayılarak hesaplanmıştır.

2.4.2. Canlı/ölü hücre canlılığı analizi (Live / dead cell viability analysis)

Canlı/ölü hücre analizi için sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör ile farklı kayma gerilimlerine maruz bırakılan MDA-MB-231 hücreler biyoreaktörden alınarak 24 kuyucuklu petri kabına yerleştirilmiştir. Daha sonra, kalsein-AM ve etidyum bromid homodimeri ile hücrelerin boyaması gerçekleştirilerek hücre canlılığı analizleri yapılmıştır. Canlı hücreler, hücre içi esteraz aktivitesinin varlığı sayesinde floresan olmayan ve hücre içerisine geçebilen Kalsein-AM'nin, yoğun floresan kalseine enzimatik dönüşümü sonucu ayırt edicidir. Etidyum bromid homodimeri ise hasarlı membranlı hücrelere girerek nükleik asitlere bağlanma suretiyle floresan ışınmasını artırarak ölü hücreleri işaretlemektedir. Hücre canlılığının analizi için her örnekten rastgele bölgeler seçilerek görüntülenmiştir [27].

2.5. İstatistiksel Yöntemler (Statistical Methods)

DeneySEL çalışmalarından elde edilen sayısal veriler GraphPad Prism yazılımı ile çift kuyuklu t testi kullanılarak analiz edilmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

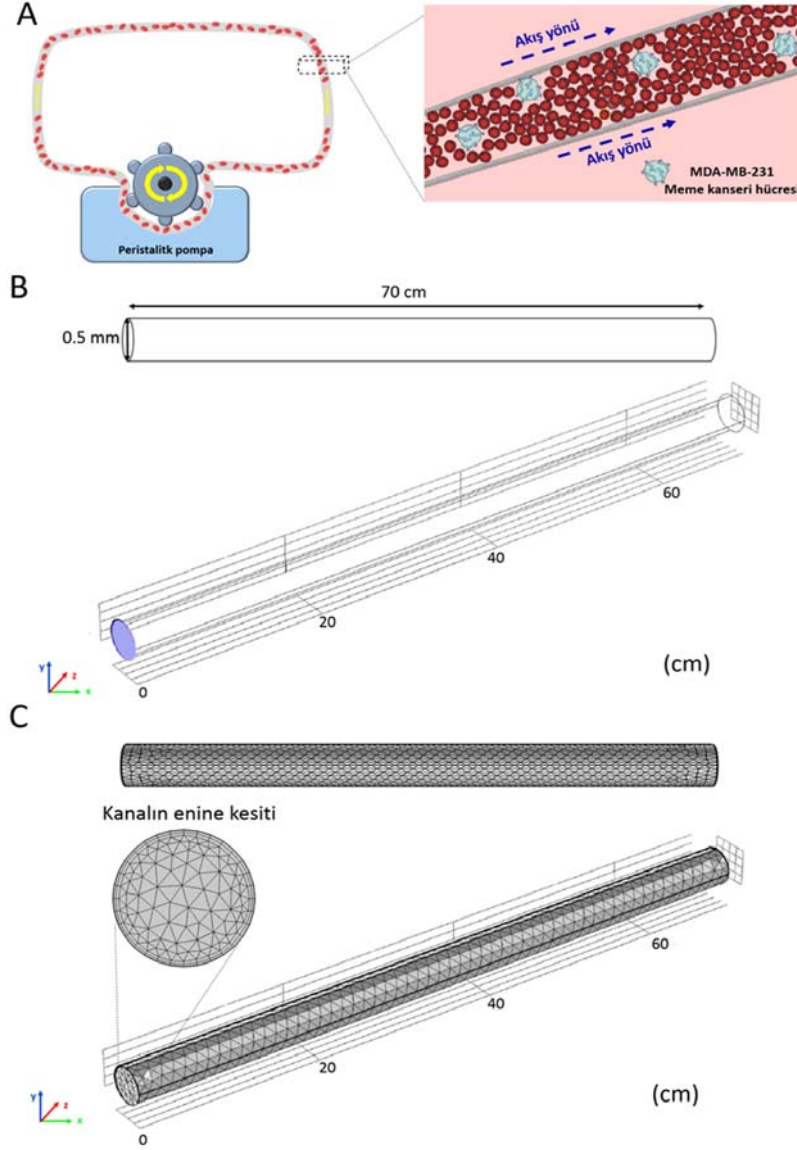
Bu çalışmada dolaşımdaki MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerine etki eden biyomekanik kuvvetlerin etkisini sayısal olarak incelemek ve arterlerdeki kan akışını taklit etmek için sonlu elemanlar yöntemi kullanılmıştır. Sayısal çözümlemenin yapıldığı mikroakışkan kanalın geometrik boyutları Şekil 1'de verilmiştir. Uygulanan deney düzeneği Şekil 1A'da şematik olarak gösterilmiştir. Kullanılan mikroakışkan kanalın geometrisi ve boyutları (h,w, ID: 0,5 mm L: 70 cm), Şekil 1B'de verilmiştir. Sayısal çözümlerinde mikroakışkan kanalın ağ yapısı belirlenirken ağ yapısı ölçeği küçültüldükçe ağ sayısı artmış olup, belli bir ağ sayısından sonra yapılan çözümlerin sonuçları belirli ölçülerde değiştirmedeği gözlemlenmiştir. Sonuçların değişmediği gözlenen ilk ağ yapısı ölçeği, optimum ağ yapısı olarak belirlenip ağ yapısı farkının sonuçlar üzerinde herhangi bir etki yapmaması sağlanmıştır (Şekil 1C). Optimum ağ yapısı belirlendikten sonra akış hızı değişkeni için sayısal çözümler yapılmıştır. Şekil 1B'de

verilmiş olan mikroakışkan kanalda Q: 6, 9 ve 12 mL dk⁻¹ akış hızı değerleri için kanalın hız profili, duvar basıncı ve kayma gerilimi değerleri hesaplanmıştır. Problemin hız profili, kayma gerilimi ve basınç davranışlarını incelerken bu değerlerin mikroakışkan kanal içerisinde dağılımları belirlenmiştir.

Hesaplamalı akışkanlar dinamiği analizlerine göre mikroakışkan kanalın orta noktasından alınan enine kesitin hız profili Şekil 2A'da verilmiştir. Üç farklı başlangıç akış hızı (6, 9 ve 12 mL dk⁻¹) için kanalın orta noktasında akış hızı en yüksek değere ulaşırken mikroakışkan kanalın duvarına doğru akış hızı azalmaktadır. Buna göre peristaltik pompadan 6 mL dk⁻¹ akış hızı uygulandığında mikroakışkan kanalın ortasında akış hızı 0,196 µm dk⁻¹ iken duvar kısmında bu değer 0,022 µm dk⁻¹'ye kadar düşmektedir (Şekil 2A). Peristaltik pompanın akış hızı 12 mL dk⁻¹'ye yükseltildiğinde mikroakışkan kanalın ortası ve duvarındaki akış hızları sırasıyla 0,213 µm dk⁻¹ ve 0,038 µm dk⁻¹ olarak hesaplanmıştır (Şekil 2A). Aynı akış hızında mikroakışkan kanalın boyuna kesiti Şekil 2C'de verilmiştir. Buradaki hız profilinden akış hızının kanalın merkezinden duvarına doğru gidildikçe azaldığı görülmektedir. Peristaltik pompa ile 12 mL dk⁻¹ akış hızı uygulandığında mikroakışkan kanalın duvar basıncı profili Şekil 2D'de gösterilmiştir. Buna göre mikroakışkan kanalın duvarı boyunca uygulanan basınç 19,07 µPa'a kadar çıkmaktadır.

Şekil 3'te kanalın enine kesitinin ve boyuna kesitinin kayma gerilimi dağılımları verilmiştir. Buna göre peristaltik pompa ile verilen üç farklı başlangıç akış hızı için hemodinamik kayma gerilimleri hesaplanmış ve mikroakışkan kanalın orta noktasından alınan enine kesitlerinin kayma gerilimi dağılımları Şekil 3A'da verilmiştir. Buna göre, 6, 9 ve 12 mL dk⁻¹ akış hızları için kayma gerilimleri sırasıyla 33, 49 ve 66 dyn cm⁻² olarak hesaplanmıştır. Ayrıca mikroakışkan kanalın boyuna kesiti ve boyuna kesitinin hemodinamik kayma gerilimi dağılımı Şekil 3B ve C'de verilmiştir. Yapılan CFD analizlerinde en büyük hemodinamik kayma gerilimlerinin mikroakışkan platformun duvar kısmında meydana geldiği belirlenmiştir.

Şekil 3A ve C'den anlaşılacağı üzere akış hızı arttıkça mikroakışkan kanalın duvar kısmına doğru uygulanan kayma gerilimi artmıştır. Hesaplamalı akışkanlar diamiği analizlerine göre yüksek akış hızlarında mikroakışkan kanalın duvar bölgelerinde akış hızındaki ani değişimlerden dolayı kayma gerilimi arttığı görülmüştür. Özellikle sirkülasyon sırasında mikroakışkan kanal duvarına yakın olan hücreler yüksek hemodinamik kaya gerilimine maruz kalarak canlılıklarını yitirebilmektedir [28]. Sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör sistemindeki karmaşık pulsatil üç boyutlu akış nedeniyle, dolaşımdaki hücrelerin yakınında lokal kayma geriliminin kantitatif olarak tanımlanmasının deneysel olarak zor olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle hesaplanan hemodinamik kayma gerilimi, akıştaki yaklaşık ortalama kayma değerlerini temsil eder ve tek bir hücrenin maruz kaldığı kesin kayma gerilimi olarak değerlendirilmemektedir. Bir akışkan içerisindeki

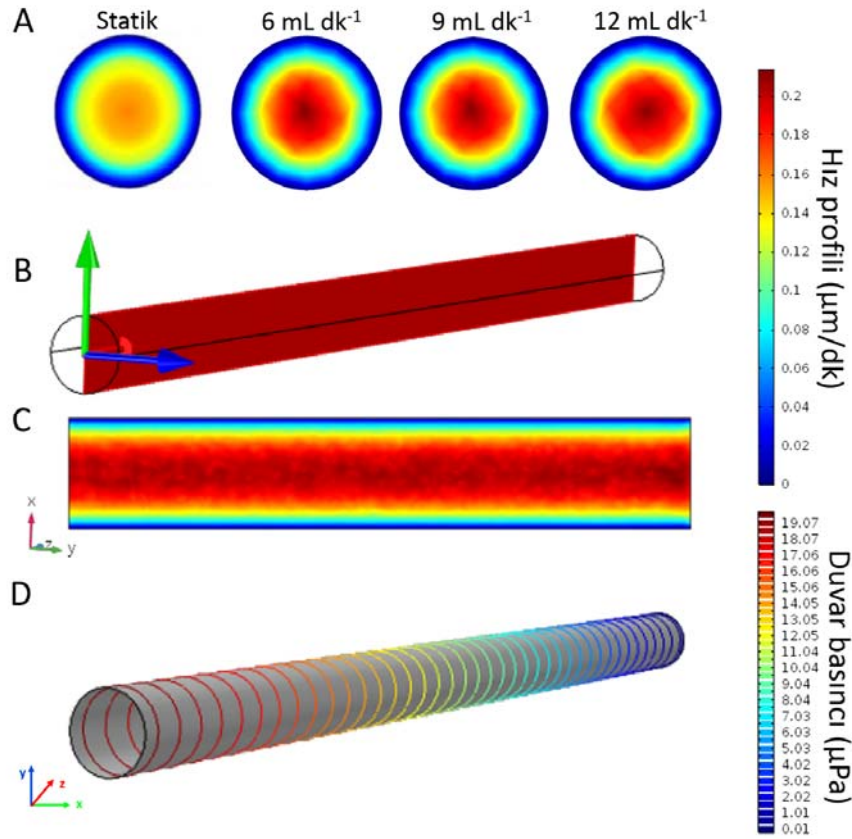


Şekil 1. Sirkülasyonlu mikroakışkan kanalın boyutları ve 3-boyutlu tasarımı A) Sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktörün ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin sirkülasyonunun şematik gösterimi B) Mikroakışkan kanalın boyutlarının gösterilmesi C) Mikroakışkan kanalın ağ yapısının gösterilmesi. (The dimensions and 3D design of circulating microfluidic channel A) Schematic representation of the circulating microfluidic bioreactor and MDA-MB-231 breast cancer cells B) Demonstration of the dimensions of the microfluidic channel C) Demonstration of the mesh size of the microfluidic channel).

partiküllerin veya hücrelerin hareketlerinin incelenmesi (odaklama, ayırma ve sayma vb) ve ayrıntılı bir şekilde anlaşılması çeşitli biyomedikal uygulamalar için önemlidir. Partiküllerin mikrokanallar içerisinde hareketlerini indükleyen hidrodinamik kuvvetler kanal geometrisine ve akışkanın fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir [29, 30]. Newtonian sıvısındaki parçacığın akış sırasındaki hareketleri birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Segre ve Silberberg, boru akışındaki küresel bir parçacığın merkezden dışarıya ve duvardan içe doğru belirli bir denge radyal konumuna hareket ettiğini gözlemlemiştir. Bu fenomen, parçacıkları $0.6R$ (R : boru yarıçapı) etrafında bir halka oluşturmak üzere akış çizgileri boyunca hareket ettirir [31]. Bu fenomen, sınırlı

geometrilere normal stres farkına eşit olmayan dağılım gösterir [32]. Diğer taraftan, akışkanın viskoelastisitesi, akışkan içerisindeki partiküllerin ateletsel odaklanmasını sağlar. Leshansky vd. kanal içerisindeki parçacıklar üzerine uygulanan normal gerilimlerdeki dengesizlik nedeniyle parçacıkların merkez çizgisine doğru göç ettiğini gözlemlemiştir [33]. Diğer bir çalışmada D'Avino vd. mikro boyutta kılcal bir boruda partiküllerin duvardan merkeze doğru hareket eden parçacıkları gözlemlemiştir [34].

Bu çalışmada hücreler için kullanılan besiyerinin Newtonian ve homojen olduğu varsayılmıştır. Bu nedenle Newtonian olmayan etkiler ihmal edilmiştir. Besiyerinin 37°C 'de yoğunluğu ve dinamik viskozite sırasıyla 1000 kg m^{-3} ve



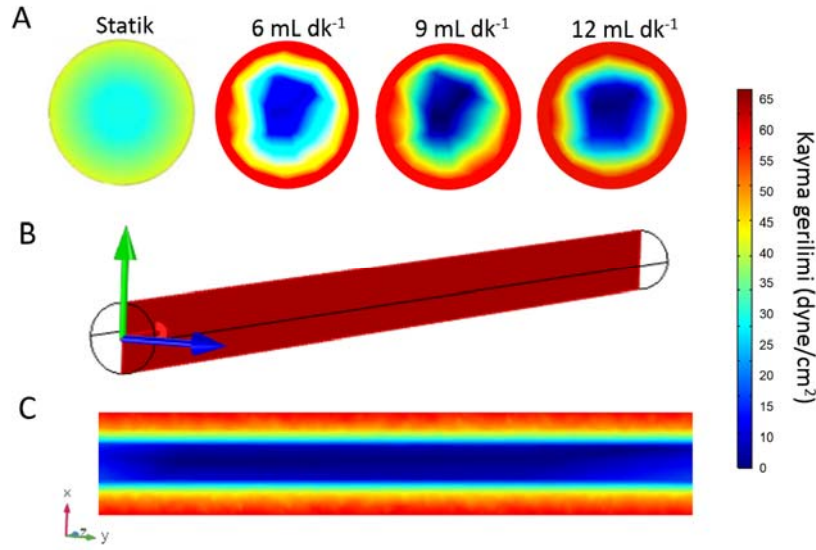
Şekil 2. Hesaplamalı akışkanlar dinamiğine göre sirkülasyonlu mikroakışkan kanalın hız ve basınç profili analizi. A) 6, 9 ve 12 mL dk⁻¹ akış hızlarında mikroakışkan kanalın enine kesitinin hız profilleri B) Mikroakışkan kanalın boyuna kesitinin gösterilmesi C) 12 mL dk⁻¹ akış hızında mikroakışkan kanalın boyuna kesitinin hız profili D) 12 mL dk⁻¹ akış hızında mikroakışkan kanal duvarlarında oluşan basınç profili.

(Velocity and pressure profiles of the circulating microfluidic channel according to computational fluid dynamics analysis. A) Velocity profile of the cross-section of the microfluidic channel at flow rates of 6, 9 and 12 mL min⁻¹ B) The longitudinal section of the microfluidic channel C) Velocity profile of the longitudinal section of the microfluidic channel at 12 mL min⁻¹ flow rate D) Pressure profile of the microfluidic channel at 12 mL min⁻¹ flow rate).

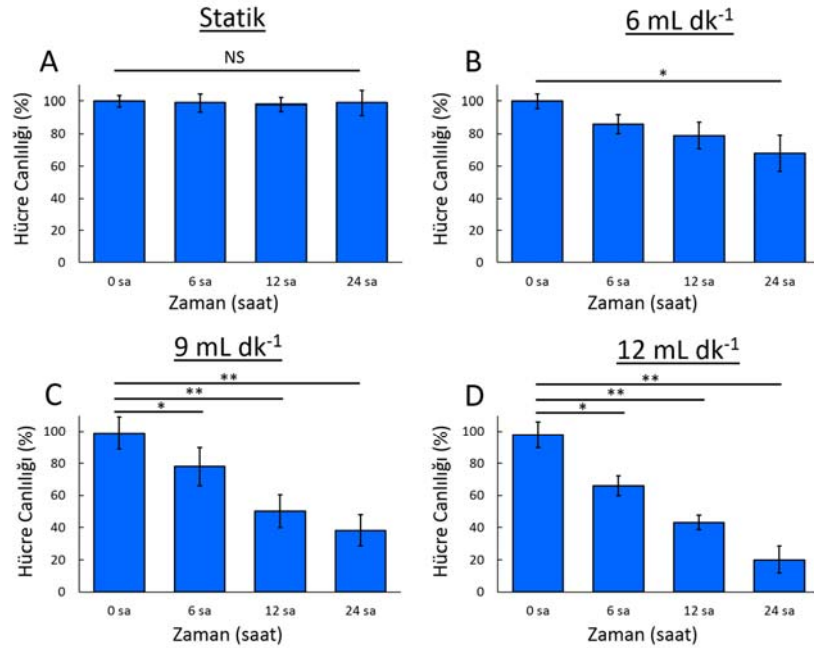
0,000692 kg m⁻¹ s⁻¹ olarak belirlenmiştir. Literatürde meme kanseri hücrelerinin boyutları yaklaşık 15 µm olarak bildirilmiştir [35]. Buna göre, belirlenen akış hızlarında (6, 9 ve 12 mL dk⁻¹) hücrelerin hareketi için iki olasılık bulunmaktadır. Bunlardan ilki hücrelerin Segre ve Silberberg'in teorisine göre borunun merkezinden 0.6R uzaklıkta halka şeklinde akış çizgileri boyunca hareket etmeleri ya da ikinci olasılık olarak normal stres farkına eşit olmayan heterojen bir dağılım göstermeleridir. Bu nedenle kanser hücreleri Şekil 3'te hemodinamik kayma profili verilen borunun farklı zamanlarında farklı hemodinamik kayma gerilimine maruz kalmaktadırlar.

Sıvı kayma geriliminin MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkilerini incelemek için Şekil 1A'da gösterilen sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktörde MDA-MB-231 hücrelerinin süspand e kültürleri 6, 9 ve 12 mL dk⁻¹ akış hızlarında 24 saat boyunca (37°C ve %5 CO₂) sıvı kayma gerilimlerine maruz bırakılarak hücre canlılıkları incelenmiştir. MDA-MB-231 hücreleri üzerine yapılan MTT testi sonuçları, yüzeye tutunmuş olan, statik koşullarda kültür edilen meme kanseri hücrelerine kıyasla

hemodinamik kayma gerilimi ve dolaşım süresi arttıkça hücre canlılığının azaldığını göstermiştir. Buna göre statik ortamda kültür edilen MDA-MB-231 hücreleri için canlılık değerleri 6, 12, 24. saatlerde değişmemiş ve %~100 olarak hesaplanmıştır. Farklı hemodinamik koşullarda, 6, 9 ve 12 mL dk⁻¹ akış hızları için 6 saatlik hücre canlılığı sonuçları sırasıyla %99, %86, %78 ve %66 olarak hesaplanırken, bu sonuçlar 12. saatte %98, %79, %50 ve %43 olarak belirlenmiştir. Görüldüğü üzere akış hızıyla birlikte arttırılan hemodinamik kayma gerilimi ve kültür süresi hücre canlılığında %20'ye varan anlamlı düşüşler meydana getirmiştir (**p<0.01) (Şekil 4). Farklı oranlarda hemodinamik kayma gerilimlerine maruz bırakılan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin canlı/ölü hücre canlılığı analizleri Şekil 5'te verilmiştir. Hemodinamik kayma gerilimi değerlerine göre hücre canlılık değerleri incelendiğinde 33, 49 ve 66 dyn cm⁻² kayma gerilimine maruz bırakılan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin 24 saat sonundaki canlı/ölü hücre canlılığı sonuçları incelendiğinde en çok ölü hücrenin 66 dyn cm⁻² hemodinamik kayma gerilimine maruz kalan örneklerde görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 5D).



Şekil 3. Hesaplamalı akışkanlar dinamiğine göre sirkülasyonlu mikroakışkan kanalın hemodinamik kayma gerilimi analizleri A) 6, 9 ve 12 mL dk⁻¹ akış hızlarında mikroakışkan kanalın enine kesitinin hemodinamik kayma gerilimi profilleri B) Mikroakışkan kanalın boyuna kesitinin gösterilmesi C) 12 mL dk⁻¹ akış hızında mikroakışkan kanalın boyuna kesitinin hemodinamik kayma gerilimi. (Hemodynamic shear stress analysis of the circulating microfluidic channel according to computational fluid dynamics A) Hemodynamic shear stress profiles of the cross-section of the microfluidic channel at flow rates of 6, 9 and 12 mL min⁻¹ B) The longitudinal section of the microfluidic channel C) The hemodynamic shear stress of the longitudinal section of the microfluidic channel at 12 mL min⁻¹ flow rate).



Şekil 4. Sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktörde MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin 6, 12 ve 24 saat boyunca, 6, 9 ve 12 mL dk⁻¹ akış hızlarında canlılık yüzdeleri. A) Statik kültür B) 6 mL dk⁻¹ akış hızında sirküle edilen hücrelerin canlılık yüzdesi C) 9 mL dk⁻¹ akış hızında sirküle edilen hücrelerin canlılık yüzdesi ve D) 12 mL dk⁻¹ akış hızında sirküle edilen hücrelerin canlılık yüzdesi. (The viability (%) of MDA-MB-231 breast cancer cells at flow rates of 6, 9 and 12 mL min⁻¹ for 6, 12 and 24 hours in the circulating microfluidic bioreactor. A) Static culture B) The viability of cells circulating at a flow rate of 6 mL min⁻¹ C) The viability of cells circulating at a flow rate of 9 mL min⁻¹ and D) The viability of cells circulating at a flow rate of 12 mL min⁻¹)

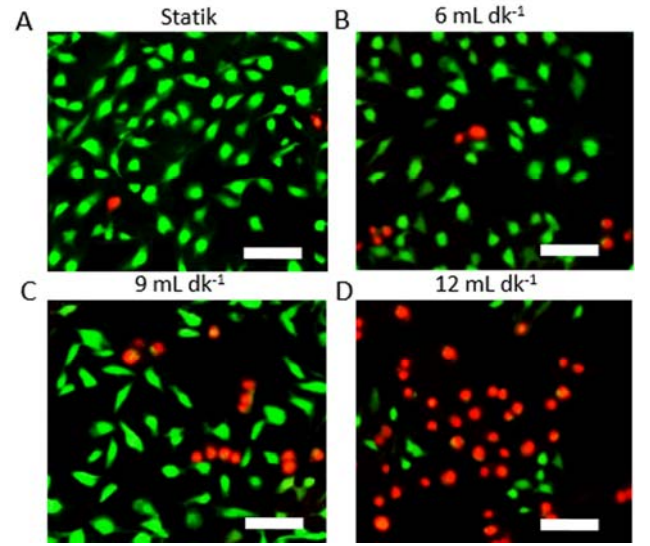
Bu çalışmada, yüksek oranda hemodinamik kayma gerilimlerinde meme kanseri hücrelerinin canlılıklarını yitirmesinin mekanizması üzerine farklı yorumlar

yapılabilir. Hücre canlılık analizlerinde 66 dyn cm⁻² hemodinamik kayma gerilimine maruz kalan örneklerde ilk 6 saatte meme kanseri hücre canlılığı %66 iken 24. saatte

kanser hücresi canlılık oranı %20'ye düşmüştür. Ayrıca canlı/ölü hücre analizlerinde 66 dyn cm^{-2} hemodinamik kayma gerilimine maruz kalan hücrelerin 24 saat sonra yüzeye yapışmadığını ve apoptoz geçirdikleri gözlemlenmiştir. Buarada yüksek hemodinamik kayma gerilimine maruz kalan hücrelerin iskeletlerinin zarar görmesi, hücre yapışmasının önlenmesi ve anoikis yoluyla apoptozu indüklemesi mümkündür [17]. Hücre ölümünün diğer bir nedeni ise kanser hücrelerinde yüksek hemodinamik kayma gerilimiyle oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesinin artması ve bunun da oksidatif stresin neden olduğu hücre ölümünü tetikleyebileceği düşünülmüştür [36]. Hemodinamik kayma gerilimi dolaşım sisteminin her yerinde farklı oranlarda olmasıyla birlikte dolaşıma karışan CTC'ler bu mekanik kuvvete maruz kalmaktadırlar. Literatürde hemodinamik kayma geriliminin kanser hücreleri üzerine etkilerini incelemek için koni plakalı viskozimetre ve şırınga iğnesi gibi çeşitli cihazlar kullanılmıştır [37, 38]. Rana vd. yaptıkları çalışmada hemodinamik dolaşıma karışan kanser hücrelerini dolaşımdayken uyurarak, sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini apoptotik bir sinyal ile uyarmak için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bilindiği üzere, dolaşımdaki kanser hücreleri, metastazın ilk aşamalarında vaskülatürün endotelial hücreleri ile etkileşime girerler. Bu çalışmada, kapiler bir tüp içerisine apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) immobilize edilerek kanser hücreleri bu kapiler içerisinde 1 saat boyunca döndürülmüş ve kanser hücrelerinin yaklaşık %30'unun apoptozu uğrayarak öldükleri tespit edilmiştir. Statik koşullar altında benzer bir öldürme oranı elde etmek için, hücrelerin yüzeye 4 saat boyunca temas halinde olması gerektiği belirlenmiştir. Bu nedenle geliştirilen biyomimetik yaklaşımla apoptotik sinyal metastatik kanser hücrelerine daha verimli bir şekilde iletilmiştir[16].

Literatür çalışmalarında akciğer kanseri (CL1-5) hücrelerinin yüksek kayma gerilimine maruz bırakıldıklarında reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin artışıyla birlikte hücre hasarı olduğu görülmüştür [39]. Diğer bir çalışmada ise kayma geriliminin integrin ve fokal kinaz aktivitesini düzenleyerek kolon kanseri hücrelerinin (T84 (BCRC 60149) apoptozu duyarlı hale getirdiği rapor edilmiştir [40]. Buna benzer olarak Rana vd. yaptıkları çalışmada kolorektal karsinoma (HCT116) hücrelerine $8-60,5 \text{ dyn cm}^{-2}$ sürekli kayma gerilimi uygulandığında ilk 2 dakika içinde neredeyse hiç hücre ölümü gerçekleşmezken 20 saat kültür sonrasında kolorektal kanser hücresi ölüm oranının %40'a kadar gerilediği gösterilmiştir [16]. Başka bir çalışmada ise Regmi vd. yüksek kayma geriliminin (60 dyn cm^{-2}) düşük kayma gerilimine göre daha fazla dolaşımdaki tümör hücrelerini ortadan kaldırdığını ve yüksek kayma geriliminin 4 saatlik kültür sonrasında tümör hücrelerinin %90'ından fazlasını ortadan kaldırdığını rapor etmiştir [17]. Çalamak vd. yapmış oldukları diğer bir çalışmada HCT116 kolorektal kanseri hücrelerine 12 saat boyunca 16 dyn cm^{-2} kayma gerilimi uyguladıklarında hücre canlılığının %40'a kadar düştüğünü rapor edilmiştir [41]. Bu çalışmadan da anlaşılacağı üzere dolaşımdaki tümör hücrelerinin çoğu

hemodinamik kayma gerilimi ile ortadan kaldırılabilir de, dolaşımda metastatik tümörler oluşturabilen heterojen CTC'ler küçük bir hücre popülasyonu olarak canlı kalarak metastaza sebep olmaktadır. Bu nedenle, hayatta kalan bu tümör hücrelerinin işlevlerini karakterize etmek çok önemlidir. Yapılan çalışmalar kan dolaşımındaki kanser hücrelerinin ömrünün, hücrenin metastatik potansiyeline ve kan akışının fiziksel koşullarına bağlı olarak 0,5 - 4 saat arasında olduğu göstermiştir [42, 43]. Literatürde yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinin yüksek miktarda hemodinamik kayma gerilimine maruz kaldıklarında canlılıklarının büyük oranda yitirdiklerini gösterirken, kanser hücreleri, kan damarları içerisinde meydana gelen kayma gerilimleriyle baş edebilmek için kan hücrelerini ve trombositleri hücre membranlarına bağlayarak yüksek kayma geriliminde canlı kalabilmektedirler [1].



Şekil 5. Hemodinamik kayma geriliminin MBA-MD-231 meme kanseri hücreleri canlılığına etkisi ve canlı/ölü hücre analizi için alınan floresan mikroskop görüntüleri A) Statik koşullarda kültür edilen polistren yüzeye tutunmuş MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri B) 6 mL dk^{-1} akış hızında sirküle edilen MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri C) 9 mL dk^{-1} akış hızında sirküle edilen MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri D) 12 mL dk^{-1} akış hızında sirküle edilen MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri Kırmızı (Etidyum bromid) Ölü hücreler Yeşil (Kalsein) Canlı hücreler Skala çubuğu $200 \mu\text{m}$.

(The effect of hemodynamic shear stress on MBA-MD-231 breast cancer cell viability and fluorescence microscope images were taken for live / dead cell analysis A) Polystyrene surface-attached MDA-MB-231 breast cancer cells cultured under static conditions B) MDA-MB-231 breast cancer cells circulating at a flow rate of 6 mL min^{-1} C) MDA circulating at a flow rate of 9 mL min^{-1} -MB-231 breast cancer cells D) MDA-MB-231 breast cancer cells circulating at a flow rate of 12 mL min^{-1} Red (Ethidium bromide) Dead cells Green (Calcein) Living cells Scale bar $200 \mu\text{m}$).

4. SİMGELER(SYMBOLS)

A	: Kanalın kesit alanı
CFD	: Hesaplamalı akışkanlar dinamiği
$\text{CO}_2(\text{g})$: Karbon dioksit gazı

CTC	: Dolaşımdaki tümör hücresi
dyn cm ⁻²	: Kayma gerilimi birimi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	: Hücre dışı matris
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
<i>h</i>	: Mikrokanalın yüksekliği
HCT116	: Kolorektal kanseri hücre hattı
ID	: İç çap
kgm ⁻¹ s ⁻¹	: Dinamik viskozite birimi
kgm ⁻³	: Akışkan yoğunluk birimi
<i>L</i>	: mikrokanalın uzunluğu
MDA-MB-231	: Meme kanseri hücre hattı
mL dk ⁻¹	: Akış hızı birimi
MTT	: 3-(4,5-Dimetil Thiazol-2-yl)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür
O ₂ (g)	: Oksijen gazı
OD	: dış çap
Q	: Hacimsel akış hızı
Re	: Reynold sayısı
<i>w</i>	: Mikrokanalın genişliği
μ	: Akışkan dinami viskozitesi
$\mu\text{m s}^{-1}$: Akış hızı birimi
$\mu\text{m dk}^{-1}$: Akış hızı birimi
μPa	: Mikrokanal duvar basıncı birimi
ρ	: Akışkan yoğunluğu

5. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Damarın yapısında bulunan düz kas destekli endotel hücrelerinin ve dolaşımdaki kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin yüksek kayma gerilimlerine maruz kaldıkları bilinmektedir. Damarda meydana gelen biyomekanik kuvvetler sayesinde hemostaz ve damar gelişimi gibi süreçler düzenlenmektedir. Kanser metastazı sırasında dolaşımdaki CTC'ler mikro ortamlarında hidrostatik basınç ve kayma gerilimi gibi biyomekanik kuvvetlerle etkileşime girerler. Kanser metastazının deneysel olarak modellenmesi oldukça zordur. Bu nedenle bu alandaki birçok çalışma tümör oluşumu ve metastazı incelemek için *in-vivo* hayvan modelleri kullanmaktadır [44, 45]. Ancak bu çalışmalar, metastaz gerçekleşikten sonra sonuç verirken metastazı meydana getiren süreçler hakkında hiçbir fikir vermemektedir. Literatürde kayma geriliminin yüzeye tutunmuş kanser hücrelerinin canlılıklarına etkisi daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [9, 14]. Bu çalışmada hemodinamik kayma geriliminin taklit eden sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktörün tasarımı gerçekleştirilmiş olup, mikroakışkan kanalın hız, duvar basınç ve kayma gerilimleri hesaplamalı akışkanlar dinamiğine göre hesaplanmıştır. Daha sonra, sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör kullanılarak dolaşımdaki MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin farklı hemodinamik kayma gerilimlerinde hücre canlılıkları rapor edilmiştir. Sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör kullanarak MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 66 dyn cm⁻² kayma gerilimine kadar maruz bırakılmıştır. MTT ve Canlı/Ölü hücre canlılığı testleri akış hızıyla birlikte artırılan hemodinamik kayma gerilimi ve kültür süresinin hücre canlılığında %20'ye varan anlamlı düşüşler meydana getirdiğini gösterilmiştir. Son olarak, bu

çalışma ile geliştirilen sirkülasyonlu mikroakışkan biyoreaktör kullanılarak kanser hücrelerinin hemodinamik akış koşullarında canlılıkları değerlendirilebileceği gibi kayma geriliminin kanser hücrelerinin fenotipik ve genotipik değişimleri üzerine etkileri de incelenebilecektir.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Mitchell, M.J., King, M.R., Computational and experimental models of cancer cell response to fluid shear stress, *Frontiers in Oncology*, 3 (44), 1-11, 2013.
2. Ermis, M., Akkaynak, D., Chen, P., Demirci, U., Hasirci, V., A high throughput approach for analysis of cell nuclear deformability at single cell level, *Scientific Reports*, 6 (1), 1-13, 2016.
3. Shieh, A.C., Biomechanical forces shape the tumor microenvironment, *Annals of Biomedical Engineering*, 39 (5), 1379-1389, 2011.
4. Dixon, J.B., Greiner, S.T., Gashev, A.A., Cote, G.L., Moore Jr, J.E., Zawieja, D.C., Lymph flow, shear stress, and lymphocyte velocity in rat mesenteric prenodal lymphatics, *Microcirculation*, 13 (7), 597-610, 2006.
5. Schmid-Schonbein, G.W., Microlymphatics and lymph flow, *Physiological Reviews*, 70 (4), 987-1028, 1990.
6. Dafni, H., Israely, T., Bhujwalla, Z.M., Benjamin, L.E., Neeman, M., Overexpression of vascular endothelial growth factor 165 drives peritumor interstitial convection and induces lymphatic drain: magnetic resonance imaging, confocal microscopy, and histological tracking of triple-labeled albumin, *Cancer Research*, 62 (22), 6731-6739, 2002.
7. Pedersen, J.A., Boschetti, F., Swartz, M.A., Effects of extracellular fiber architecture on cell membrane shear stress in a 3D fibrous matrix, *Journal of Biomechanics*, 40 (7), 1484-1492, 2007.
8. Tarbell, J.M., Shi, Z.-D., Effect of the glycocalyx layer on transmission of interstitial flow shear stress to embedded cells, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 12 (1), 111-121, 2013.
9. Kocal, G.C., Güven, S., Foygel, K., Goldman, A., Chen, P., Sengupta, S., Paulmurugan, R., Baskin, Y., Demirci, U., Dynamic Microenvironment Induces Phenotypic Plasticity of Esophageal Cancer Cells Under Flow, *Scientific Reports*, 6, 38221, 2016.
10. Ip, C.K., Li, S.-S., Tang, M.Y., Sy, S.K., Ren, Y., Shum, H.C., Wong, A.S., Stemness and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma cells under shear stress, *Scientific Reports*, 6, 26788, 2016.
11. Gold, K., Gaharwar, A.K., Jain, A., Emerging trends in multiscale modeling of vascular pathophysiology: Organ-on-a-chip and 3D printing, *Biomaterials*, 196, 2-17, 2019.
12. Rothbauer, M., Rosser, J.M., Zirath, H., Ertl, P., Tomorrow today: organ-on-a-chip advances towards clinically relevant pharmaceutical and medical in vitro models, *Current Opinion in Biotechnology*, 55, 81-86, 2019.
13. Jain, R.K., Martin, J.D., Stylianopoulos, T., The role of mechanical forces in tumor growth and therapy, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16, 321-346, 2014.

14. Rizvi, I., Gurkan, U.A., Tasoglu, S., Alagic, N., Celli, J.P., Mensah, L.B., Mai, Z., Demirci, U., Hasan, T., Flow induces epithelial-mesenchymal transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (22), E1974-E1983, 2013.
15. Malek, A.M., Alper, S.L., Izumo, S., Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis, *Jama*, 282 (21), 2035-2042, 1999.
16. Rana, K., Liesveld, J.L., King, M.R., Delivery of apoptotic signal to rolling cancer cells: A novel biomimetic technique using immobilized TRAIL and E-selectin, *Biotechnology and Bioengineering*, 102 (6), 1692-1702, 2009.
17. Regmi, S., Fu, A., Luo, K.Q., High shear stresses under exercise condition destroy circulating tumor cells in a microfluidic system, *Scientific Reports*, 7, 39975, 2017.
18. Xin, Y., Chen, X., Tang, X., Li, K., Yang, M., Tai, W.C.-S., Liu, Y., Tan, Y., Mechanics and Actomyosin-Dependent Survival/Chemoresistance of Suspended Tumor Cells in Shear Flow, *Biophysical Journal*, 116 (10), 1803-1814, 2019.
19. Fan, R., Emery, T., Zhang, Y., Xia, Y., Sun, J., Wan, J., Circulatory shear flow alters the viability and proliferation of circulating colon cancer cells, *Scientific Reports*, 6, 27073, 2016.
20. Onstenk, W., Sieuwerts, A.M., Weekhout, M., Mostert, B., Reijm, E.A., van Deurzen, C.H., Bolt-de Vries, J.B., Peeters, D.J., Hamberg, P., Seynaeve, C., Gene expression profiles of circulating tumor cells versus primary tumors in metastatic breast cancer, *Cancer Letters*, 362 (1), 36-44, 2015.
21. Potdar, P.D., Lotey, N.K., Role of circulating tumor cells in future diagnosis and therapy of cancer, *Journal of Cancer Metastasis Treatment*, 1, 44-56, 2015.
22. Cornelius, V.J., Majcen, N., Snowden, M.J., Mitchell, J.C. and Voncina, B., Preparation of SMART wound dressings based on colloidal microgels and textile fibres, *International Society for Optics and Photonics*, 6413, 64130X, 2006.
23. Selmi, M., Belmabrouk, H., Bajahzar, A., Numerical Study of the Blood Flow in a Deformable Human Aorta, *Applied Sciences*, 9 (6), 1216, 2019.
24. Calamak, S., Ulubayram, K., Controlled synthesis of multi-branched gold nanodendrites by dynamic microfluidic flow system, *Journal of Materials Science*, 54 (10), 7541-7552, 2019.
25. Özsunar A., Başkaya Ş., Sivrioğlu M., Numerical investigation of fluid flow in a duct with rectangular cross section under laminar mixed convection conditions, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 15 (2), 71-86, 2000.
26. Gürkan K., Başkaya Ş., Numerical analysis of air motion inside a ventilated office room, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 17 (2), 35-52, 2002.
27. Akpek A., Analysis of biocompatibility characteristics of stereolithography applied three dimensional (3D) bioprinted artificial heart valves, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 33 (3), 929-938, 2018.
28. Lyczkowski, R.W., Alevriadou, B.R., Horner, M., Panchal, C.B., Shroff, S.G., Application of multiphase computational fluid dynamics to analyze monocyte adhesion, *Annals of Biomedical Engineering*, 37 (8), 1516-1533, 2009.
29. Karimi, A., Yazdi, S, Ardekani, A., Hydrodynamic mechanisms of cell and particle trapping in microfluidics, *Biomicrofluidics*, 7 (2), 021501, 2013.
30. D'Avino, G., Maffettone, P.L., Particle dynamics in viscoelastic liquids, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 215, 80-104, 2015.
31. Segre, G., Silberberg, A., Radial particle displacements in Poiseuille flow of suspensions, *Nature*, 189 (4760), 209-210, 1961.
32. Seo, K.W., Byeon, H.J., Huh, H.K., Lee, S.J., Particle migration and single-line particle focusing in microscale pipe flow of viscoelastic fluids, *RSC Advances*, 4 (7), 3512-3520, 2014.
33. Leshansky, A.M., Bransky, A., Korin, N., Dinnar, U., Tunable nonlinear viscoelastic "focusing" in a microfluidic device, *Physical Review Letters*, 98 (23), 234501, 2007.
34. D'Avino, G., Romeo, G., Villone, M.M., Greco, F., Netti, P.A., Maffettone, P.L., Single line particle focusing induced by viscoelasticity of the suspending liquid: theory, experiments and simulations to design a micropipe flow-focuser, *Lab on a Chip*, 12 (9), 1638-1645, 2012.
35. Shashni, B., Ariyasu, S., Takeda, R., Suzuki, T., Shiina, S., Akimoto, K., Maeda, T., Aikawa, N., Abe, R., Osaki, T., Size-based differentiation of cancer and normal cells by a particle size analyzer assisted by a cell-recognition PC software, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41 (4), 487-503, 2018.
36. Fu, A., Ma, S., Wei, N., Tan, B.X.X., Tan, E.Y., Luo, K.Q., High expression of MnSOD promotes survival of circulating breast cancer cells and increases their resistance to doxorubicin, *Oncotarget*, 7 (31), 50239, 2016.
37. Mitchell, M.J., King, M.R., Fluid shear stress sensitizes cancer cells to receptor-mediated apoptosis via trimeric death receptors, *New Journal of Physics*, 15 (1), 015008, 2013.
38. Egan, K., Cooke, N., Kenny, D., Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage, *Clinical & experimental metastasis*, 31 (6), 697-704, 2014.
39. Lo, K.-Y., Zhu, Y., Tsai, H.-F., Sun, Y.-S., Effects of shear stresses and antioxidant concentrations on the production of reactive oxygen species in lung cancer cells, *Biomicrofluidics*, 7 (6), 064108, 2013.
40. Luo, C.-W., Wu, C.-C., Ch'ang, H.-J., Radiation sensitization of tumor cells induced by shear stress: The roles of integrins and FAK, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843 (9), 2129-2137, 2014.
41. Calamak, S., Ermis, M., Sun, H., Islam, S., Sikora, M., Nguyen, M., Hasirci, V., Steinmetz, L.M., Demirci, U.,

- A Circulating Bioreactor Reprograms Cancer Cells Toward a More Mesenchymal Niche, *Advanced Biosystems*, 4 (2), 1900139, 2020.
42. Galanzha, E.I., Kim, J.W., Zharov, V.P., Nanotechnology-based molecular photoacoustic and photothermal flow cytometry platform for in-vivo detection and killing of circulating cancer stem cells, *Journal of Biophotonics*, 2 (12), 725-735, 2009.
43. Galanzha, E.I., Zharov, V.P., Circulating tumor cell detection and capture by photoacoustic flow cytometry in vivo and ex vivo, *Cancers*, 5 (4), 1691-1738, 2013.
44. Hamza, B., Ng, S.R., Prakadan, S.M., Delgado, F.F., Chin, C.R., King, E.M., Yang, L.F., Davidson, S.M., DeGouveia, K.L., Cermak, N., Optofluidic real-time cell sorter for longitudinal CTC studies in mouse models of cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (6), 2232-2236, 2019.
45. Helzer, K.T., Barnes, H.E., Day, L., Harvey, J., Billings, P.R., Forsyth, A., Circulating tumor cells are transcriptionally similar to the primary tumor in a murine prostate model, *Cancer Research*, 69 (19), 7860-7866, 2009.