



Dinamik Mikroakışkan Hücre Kültürü Platformlarında Difüzyon-Konveksiyon Proseslerinin Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği Modellemesi

Ece Yıldız Öztürk¹

ÖZ

Mikroakışkan tabanlı biyokimyasal analizler, hücre ve doku mühendisliğindeki son gelişmeler, mikroakışkan sistemler içinde uzaysal-zamansal olarak kütle transferinin kontrol edilmesine dayanmaktadır. Mikroakışkan sistemler ile hücresel mikroçevrenin kontrol edilmesi ve doku benzeri yapıların taklit edilmesinin yanı sıra, yüksek verimli analizlerin gerçekleştirilmesinde de oldukça kullanışlı araçlardır. Bu sistemler biyoaktif moleküllerin, nütrientlerin, büyüme faktörlerinin ve diğer hücresel regülatör moleküllerin konsantrasyon gradientlerinin zamana ve konuma bağlı olarak etme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle mikrosistemlerde biyomoleküllerin taşınım olaylarının modellenmesi, mikroakışkan platformların tasarımını ve kantitatif biyolojik analizleri kolaylaştıran değerli ve kullanışlı bir analitik araçtır. Geliştirilen analitik model mikroakışkan sistem tasarımına rehberlik ettiğinden; maliyetli ve zaman alıcı deneyler minimuma indirilebilmekte; tasarım süreci verimliliği ve etkinliği artırılabilir.

Çalışma kapsamında ilaç taşınım uygulamalarına yönelik tek kanallı mikroakışkan platformda biyomoleküllerin difüzyon ve konveksiyon proseslerine vurgu yaparak kütle transferi profilini gösteren analitik bir model oluşturulmuştur. Mikroakışkan hücre kültürü sistemlerinin hücresel fizyolojik ortamların akış dinamiğini taklit edebilmesi için pulsatil laminar sıvı akışını sağlayabilen peristaltik pompa ile sistem kurulmuştur. Dinamik akış koşulları altında hücreler üzerine etki eden biyomekanik kuvvetlerin (akış hızı, konsantrasyon, basınç dağılımı ve kayma gerilimi) etkisini sayısal olarak incelemek için COMSOL Multiphysics sonlu elemanlar yazılımı kullanılarak mikroakışkan sistemin sayısal simülasyonu yapılmıştır. Mikroakışkan sistemde hücreler minimum kayma gerilimine maruz bırakılırken, kanal uzunluğu boyunca konsantrasyon profilinin korunduğu gösterilmiştir. Akış hızının artırılmasıyla mikro kanal boyunca çözünen konsantrasyon dağılımı değiştirilebilmektedir ve bu da hücreler üzerindeki kayma gerilimini arttırmaktadır. Simülasyonu yapılan mikroakışkan analitik modelin, hücre kültürü, biyolojik analizler ve ilaç taşıyıcı sistemler için kullanılacak mikroakışkan platformların geliştirilmesinde sistem tasarımı ve parametre seçimi için temel olarak kullanılabilirliği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Mikroakışkan hücre kültürü, difüzyon, konveksiyon, hesaplamalı akışkanlar dinamiği, matematiksel modelleme

Geliş/Received : 11.11.2021
Kabul/Accepted : 29.08.2022

¹ Yaşar Üniversitesi, Gıda Teknolojisi Programı, Gıda İşleme Bölümü, İzmir

Ege Üniversitesi, Translasyonel Pulmonoloji Araştırma Merkezi, İzmir
eceyildiz.bioeng@gmail.com, ece.ozturk@yasar.edu.tr, ORCID: 0000-0003-2482-7371



Computational Fluid Dynamics Modeling of Diffusion-Convection Processes on Dynamic Microfluidic Cell Culture Platforms

ABSTRACT

Microfluidic-based biochemical analyzes and recent developments in cell/tissue engineering are based on controlling spatio-temporally mass transfer in microfluidic systems. These systems are useful tools for controlling the cellular microenvironment and simulating tissue-like structures, as well as performing high-throughput analysis. Therefore, modeling of transport processes of biomolecules in microsystems is a valuable and useful analytical tool that facilitates the design of microfluidic platforms and quantitative biological analysis.

Within the scope of the study, an analytical model was created that shows the mass transfer profile by emphasizing the diffusion and convection processes of biomolecules in a single-channel microfluidic platform for drug transport applications. In order to mimic the flow dynamics of cellular physiological environments, the microsystem was established with a peristaltic pump that can provide pulsatile laminar fluid flow. Numerical simulation of the microsystem was performed using COMSOL software to numerically examine the effects of biomechanical forces (flow rate, concentration, pressure distribution and shear stress) acting on cells under dynamic flow conditions. In the microfluidic system, it has been shown that the concentration profile is maintained along the length of the channel while the cells are exposed to the minimum shear stress. By increasing the flow rate, the concentration distribution along the microchannel can be changed, increasing the shear stress on the cells. It is thought that the simulated microfluidic analytical model can be used as a basis for system design and parameter selection in the development of microfluidic platforms to be used for cell culture, biological analyzes and drug delivery systems.

Keywords: Microfluidic cell culture, diffusion, convection, computational fluid dynamics, mathematical modelling



EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Microphysiological systems are applied in disease modelling, drug discovery studies, evaluation of drug efficacy, optimizing clinical trials, and developing new compounds to potentially reduce R&D costs and perform high-throughput testing. It also demonstrates that large amounts of biological complexity can be systematically analyzed when mass transfer processes in microfluidic systems are understood and controlled. In microfluidic systems, the effects of various control parameters such as molecular concentration distribution due to convective-diffusive mass transfer and flow rate, pressure distribution, shear stress can be examined. This information obtained is very important in the design of microphysiological systems that include common cell culture applications.

Computational fluid dynamic (CFD) simulations are a common approach used to estimate flow velocity, pressure, concentration distribution, and shear stresses in microfluidic systems. Simulations using the Navier-Stokes equations can create flow velocity and shear stress gradients without including sensors in microfluidic systems, allowing their magnitudes to be estimated. Contrary to the experimental approach, simulation studies facilitate the comprehensive design process, which includes modeling the microsystem before the design and testing stages. At the same time, modeling enables the study and visualization of quantities that are difficult to experimentally measure, time consuming, and difficult to examine in a given system.

Objectives/Research Purpose

The basis objective of this study is to develop a dynamic microfluidic cell culture system to mimic the biophysical forces of A549 lung adenocarcinoma in the microvascular system, to examine the diffusion of Panaxatriol drug molecule with anti-tumor activity into cells and its effects on cells. It is also aimed to investigate the effect of biomechanical forces acting on cells under dynamic flow conditions by numerical simulation of the developed microfluidic cell culture platform. For this purpose, different pump systems were firstly compared for the transport of the culture medium in the microfluidic system. A dynamic microfluidic cell culture platform was created by using the peristaltic pump system, which can ideally mimic the microvascular system and provides pulsatile laminar flow. With CFD modelling, flow velocity, pressure and concentration distribution profiles formed along the microchannel were examined and shear stresses were calculated numerically.

Methods/Methodology

In this study, numerical simulation of the microfluidic system was performed using COMSOL to examine the effect of Panaxatriol on circulating A549 lung adenocarcinoma cells and the effect of biomechanical forces (flow, concentration, pressure distribution and shear stress) acting on cells under dynamic flow conditions. In the developed analytical model, the flow velocity profile, shear velocity profile, wall pressure behavior and concentration distribution along the microchannel in the dynamic microfluidic cell culture system were investigated.

A 3D “Laminar Flow” interface based on the Navier-Stokes equations was used for low flow rates in the microchannel and a “Diluted Species Transport” interface for concentration distribution. In this study, the culture medium was assumed to be incompressible and homogeneous with Newtonian type flow behavior. Then, assuming a constant dynamic viscosity along the channel, the average shear stress in the middle of the channel was calculated using the shear stress equation in the stokes flow.

Results/Findings

In the microfluidic cell culture platform where a peristaltic pump system providing pulsatile laminar flow is used, it is very important for the microvascular endothelium physiological environment to mimic the flow dynamics, recirculation of the culture medium, drug-cell interaction, absorption of the drug and its distribution in the system.

According to the CFD analysis, when a flow rate of 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ is applied, the flow velocity is 4.29×10^{-5} m/s in the middle of the microchannel, while this wall decreases to 0.2×10^{-5} m/s in the wall part. In fully developed laminar flow, each fluid particle moves at a constant axial velocity along a streamline and the velocity pro-



file remains unchanged in the flow direction. According to the flow velocity profile, it was observed that the average flow velocity decreases as the laminar flow moves from the center of the microchannel to its wall. On the other hand, according to the shear velocity profile, it was observed that the shear velocity increased from the center of the microchannel to its wall. Accordingly, the shear stress increases as it approaches the microchannel walls. The shear stress has a maximum magnitude in the microchannel wall excluding the corners. According to the simulation of pressure distribution, it has been observed that the pressure decreases from the starting point to the exit point.

According to the concentration distribution profile along the microchannel in the microfluidic system with both convective and diffuse flow; It was observed that the drug concentration reached the highest level (0.2 mol/m^3) in the center of the entrance area where the drug solution was fed into the system, and then decreased to 0.1 mol/m^3 towards the end of the microchannel entry area. Subsequently, the drug concentration remained at the same initial value (0.1 mol/m^3) throughout the microchannel. It is important that the drug molecules stay at the same concentration and at high retention times along the microchannel for drug-cell interactions to be more effective.

Discussion and Conclusions

Within the scope of the study, an analytical model was created showing the transport profile in a single-channel microfluidic cell culture platform that provides adjustable regulation of flow and shear rate. In this system, it has been shown that while the cells are exposed to a minimum shear stress, a uniform concentration profile is maintained along the length of the channel. By increasing the flow rate in microfluidic cell culture systems with a single channel configuration, the solute concentration distribution along the channel can also be changed, which can increase the shear stress on the cells. It is thought that the analytical model simulated within the scope of the study can be used as a basis for system design and parameter selection in the development of the microfluidic platform to be used for tissue culture, bioassay, drug delivery systems, drug discovery and screening studies. However, the basic physics of this model can be extended to consider more complex systems involving the interaction of several soluble components in systems composed of various cell culture populations and types.



1. GİRİŞ

Mikroakışkan sistemler, biyoteknoloji şirketleri arasında geniş bir uygulama yelpaze-i ile hızla milyarlarca dolarlık bir endüstriye dönüşmektedir [1, 2]. En ilgi çekici mikroakışkan uygulamalarından biri, özelleşmiş kültür mikro çevrelerinin kullanımı ile in vivo organ fonksiyonunun özelliklerini taklit edebilen in vitro modeller olan mikrofizyolojik sistemlerdir. Çip-üstü-organ platformları olarak adlandırılan bu mikroakışkan sistemler, organ fizyolojisinin modellenmesini sağlamak ve özellikle ilaç keşfi çalışmalarında geleneksel iki boyutlu (2B) kültür yöntemlerine kıyasla daha doğru hücre-sel yanıtları tetiklemek için tasarlanmaktadır [3, 4]. Mikrofizyolojik sistemler pek çok alanda tıbbi araştırmaları hızlandırmaktadır. İlaç keşfi çalışmalarında, bu modeller büyük şirketler tarafından ilaç etkinliğini değerlendirmek, klinik deneyleri optimize etmek ve yeni bileşikler geliştirmek için potansiyel olarak Ar-Ge maliyetlerini azaltmak için yüksek verimde testler gerçekleştirmek için uygulanmaktadır [5]. Bununla birlikte, kompleks doku fonksiyonlarına sahip karmaşık sistemlerin geliştirilmesini sağlayan önde gelen bir uygulamalardan olan kanser gibi hastalıkların modellenmesi için de kullanılmaktadır [6].

Mikrofizyolojik sistemler, geleneksel 2B ve 3B hücre kültürü yöntemlerine kıyasla, belirli hücre tepkilerinin uyarılmasında akış hızını ve konsantrasyon dağılımlarını hassas bir şekilde kontrol etme imkânı sağlamaktadır [7, 8]. Mikrokanallarda oluşturulan konsantrasyon gradyanları kemotaksisi (hücre göçü) [9, 10], metabolik değişiklikleri, yara iyileşmesini [11] ve hatta metastazi (hücre ölümü) [12] indükleyebilmektedir. Mikrokanallardaki konsantrasyon gradyanlarının kontrol edilmesi, insan dokusunun taklit edilmesinde oldukça önemlidir [13]. Doku/organ mühendisliği, kemotaksis (hücre göçü) ve kan pıhtılaşması ile ilgili in vivo çalışmalar, sistemdeki kütle aktarımı anlaşıldığında ve kontrol edildiğinde büyük miktarda biyolojik karmaşıklığın sistematik olarak analiz edilebileceğini ortaya koymaktadır [14].

Mikroakışkan sistemlerde konvektif-difüzyf kütle taşımına bağlı moleküler konsantrasyon dağılımı ve çeşitli kontrol parametrelerinin etkileri incelenebilmektedir. Elde edilen bu bilgiler, ortak hücre kültürü uygulamalarını içeren mikrofizyolojik sistemlerin tasarlanmasında kullanılmaktadır [15]. Mikrofizyolojik sistemlerin tasarlanmasındaki diğer önemli parametreler ise akış hızı ve kayma hızıdır. Çünkü insan vücudunda, atardamarlarda ve toplardamarlarda kayma gerilimi oldukça önemlidir. Kayma geriliminin büyüklüğü kan damarı tipine bağlı olmakla birlikte, atardamarlar tipik olarak 10-60 dyne/cm² aralığında kayma gerilimi gösterirken, damarlar genellikle 1-10 dyne/cm² arasında kayma gerilimi göstermektedir [16]. Kayma gerilimi, kan damarlarının duvarlarındaki hücrelerde çeşitli reaksiyonlara neden olabilmektedir [17]. Bununla birlikte, hücre bağlanmasını [18-20], patolojik yanıtı [21, 22] ve gelişim biyolojisini [23, 24] etkilediği de gösterilmiştir. Mikroakışkan sistemler düşük örnek hacimleri ve hücre yoğunlukları ile çalışma imkânı sağladığından, kayma gerilimi gradyanlarının

oluşmasını sağlamaktadır. Bu da mikrosistemlerin kayma gerilimi etkilerinin incelenmesinde oldukça avantajlı olduğunu göstermektedir [25]. Mikrosistemde ortam viskozitesi, kanal geometrisi ve sıvı akışı değiştirilerek hücreler üzerindeki kayma gerilimi etkisini ayarlamak mümkündür [26].

Mikroakışkan platformlarda konveksiyon ve difüzyon kütle transferi proseslerinin incelendiği önemli uygulamalar enzimatik reaksiyon gerçekleşen mikrosistemlerde substrat/ürün taşınım olaylarının modelleme çalışmaları [27], biyomoleküllerin hidrodinamik yayılım katsayısını belirlemeye yönelik çalışmalar [28], analitlerin yüzey reseptörleriyle reaksiyona girdiği yüzey tabanlı biyosensör çalışmaları [29], ilaç geçirgenliği ve absorpsiyon çalışmaları [30], kemoterapi ilaç direnci mikroakışkan gradyan çalışmaları [31], mikroakışkan kromatografi çalışmaları [32]'dir.

Akışkanlar dinamiğinin sonlu elemanlar yöntemine (FEM) dayalı hesaplama simülasyonları, mikroakışkan sistemlerdeki akış hızı, basınç dağılımı ve kayma gerilimlerinin tahmin edilmesinde kullanılan yaygın bir yaklaşımdır. Navier-Stokes denkleminin kullanıldığı simülasyonlar, mikroakışkan sistemlere sensörler dahil edilmeden akış hızı ve kayma gerilimi gradyanları oluşturarak büyüklüklerinin tahmin edilmesine olanak sağlayabilmektedir [33]. Mikroakışkan sistemlerin hesaplamalı dinamik modelleri, erişilebilir ve kullanıcı dostu olan COMSOL Multiphysics sonlu eleman yazılımı kullanılarak uygulanmaktadır. Deneysel yaklaşımın aksine simülasyon çalışmaları mikrosistemin tasarım ve test aşamalarından önce modellemesini içeren kapsamlı tasarım sürecini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda modelleme belirli bir sistemde deneysel olarak ölçülmesi zor, zaman alıcı olan ve incelenmesi zor olabilecek miktarların çalışılmasını ve görselleştirilmesini de sağlamaktadır.

Biyomedikal uygulamalar için hücre baskılı tabanlı entegre bir mikroakışkan cihazın kullanıldığı bir çalışmada, hücre kültürü alanını kontrol ederek geleneksel baskılama hücre baskılı substrat verimliliğinin artırılması amaçlanmıştır [34]. Şırınga pompasına bağlı çoklu entegre mikroakışkan sisteminde enjeksiyon hızı, birim hacim başına hücre sayısı ve boyutu gibi parametreler ile birlikte kayma gerilimi ve kanal boyutlarının etkisi değerlendirilmiştir. Mikroakışkan hücre kültürü sisteminin akış özelliklerini daha iyi anlamak için COMSOL Multiphysics yazılımı kullanılarak mikroçipin sayısal simülasyonu hesaplanmıştır. Geliştirilen mikrosistemin çeşitli doku mühendisliği ve hücre terapötik uygulamalarında kullanılabilmesi öne sürülmüştür. Nano malzemelerin mikrosistemlerde üretimine örnek olarak optik ve elektriksel özelliklerinden dolayı önemli olan altın nanodendritlerin sentezinin yapıldığı bir çalışmada, çok dallı altın nanodendritlerin dallanma yapısını kontrol edebilen ve yüksek verimli çalışan dinamik mikroakışkan sistemi kullanılmıştır [35]. Mikrosistemdeki dinamik koşulların tek fazlı laminar akış altında altın nanodendrit oluşumu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Dolaşımli bir akış biyoreaktöründe lokal duvar kayma gerilmesini araştırmak için, hesaplamalı akışkanlar dinamiği (CFD) analizi için COMSOL Multiphysics™



5.2a sonlu elemanlar yazılımı kullanılarak; tek fazlı sıvı akışı için yatışkın-durum Navier-Stokes denklemi çözülmüştür. Çalışmada altın nanodendritlerin mimarisinin esas olarak akış dinamiği gibi sentez koşullarına bağlı olduğu ve akış koşulları altında altın nanodendritlerin büyümesinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Geliştirilen bu mikroakışkan dinamiği yaklaşımı, altın nanodendritlerin kontrollü bir şekilde oluşturulmasında etkili bir strateji sağlamıştır. Bir diğer farklı çalışmada kayma geriliminin insan umbilikal damar endotel hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir mikroakışkan sistemde akışkanlar dinamiğinin sonlu elemanlar yöntemine (FEM) dayalı hesaplamalı simülasyonu yapılmıştır [33]. Mikrosistem tasarımı ve akış koşullarının optimizasyonu için COMSOL Multiphysics (4.4, COMSOL, İsveç) yazılımı ile Newton akışkanlarının hareketini tanımlayan Navier-Stokes denklemi kullanılarak sayısal simülasyonlar yapılmıştır. Bu çalışma ile sensörlerin sisteme dahil edilmeden kayma gerilimi gradyanları oluşturulmasına ve büyüklüklerinin tahmin edilmesine olanak sağladığı öne sürülmüştür. Benzer başka bir çalışmada ise, çözünür bileşiklerin gradyanının insan osteosarkom MG-63 hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi için mikroakışkan bir platform geliştirilmiştir [36]. Bu platform kayma gerilimi olmayan koşullar altında hücrelerin kültürünü ve bunların çözünen bileşiğe konsantrasyon gradyanlı olarak maruziyetini sağlamaktadır. Platform tasarımının optimizasyonu ve gradyan oluşturma dinamiklerinin incelenmesi için COMSOL Multiphysics (4.3, COMSOL, İsveç) yazılımı ile sonlu eleman modellemesi yapılmıştır. Geliştirilen platformda çözeltideki moleküllerin gradyanlarının etkilerini hücresele düzeyde yüksek verimli bir şekilde inceleme imkânı sayesinde, hücre iskeleti dinamiği gibi karmaşık moleküler yolların anlaşılmasını sağlamıştır. Hücre kültürü ve immünoloji temelli farklı bir diğer çalışmada ise; lenf nodlarındaki T hücrelerinin ve dendritik hücrelerin hücreler arası dinamiklerini ve fizyolojik koşullarını anlamak için dinamik mikroakışkan bir cihaz geliştirilmiştir [37]. Antijene özgü ve spesifik olmayan CD8+ sitotoksik T hücrelerinin ve CD4+ yardımcı T hücrelerinin farklı kayma gerilimlerinde akış sırasında etkinleştirilmiş veya etkinleştirilmemiş dendritik hücrelere (DC'lere) bağlanma ve ayrılma mekanizması, dinamikleri ve temel hücre davranışı araştırılmıştır. Mikrokanalın herhangi bir konumunda bir kesit boyunca kayma geriliminin dağılımının ve uygulanan farklı akış hızlarının etkisinin incelenmesi için COMSOL Multiphysics 4.4'te simülasyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile bu mikroakışkan platformunun, hücre sinyali ve aktivasyonu ile ilgili T hücresi: antijen sunan hücre (APC) etkileşimlerini araştırmak için değerli bir araç olabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışma kapsamında ise, A549 akciğer adenokarsinoma hücre hatlarının mikrovasküler sistem içinde buldukları biyofiziksel kuvvetleri taklit etmesi, anti-tümör aktivitesine sahip Panaksatriol potansiyel ilaç molekülünün hücrelere difüzyonunun ve hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi için dinamik mikroakışkan hücre kültürü sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ilk olarak mikroakışkan sisteminde kültür ortamının taşınımı için pompa sistemi belirlenerek dinamik bir mik-

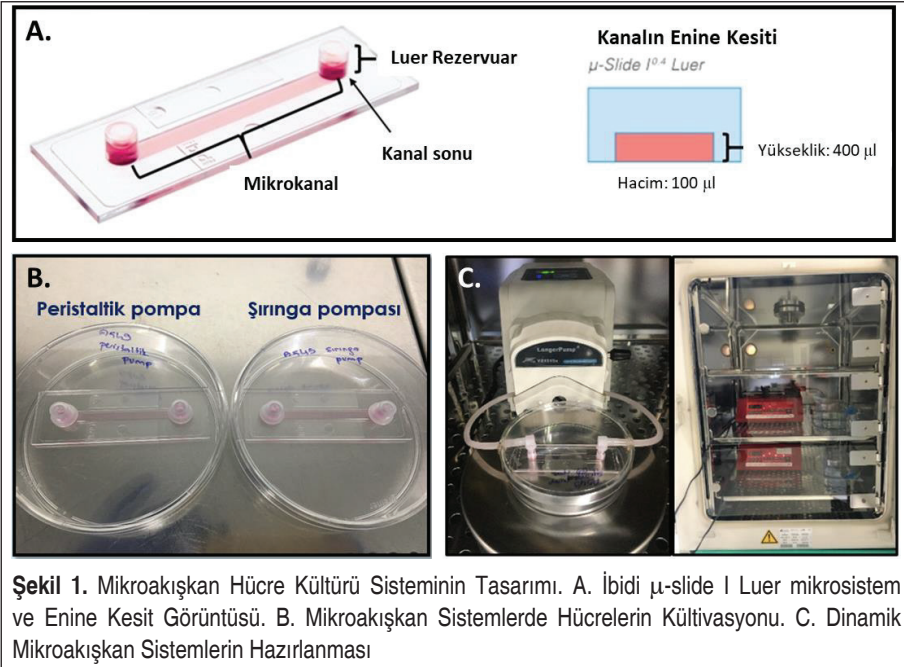
roakışkan platform oluşturulmuş ve hesaplamalı akışkanlar dinamiği modellemesi ile mikrokanal boyunca oluşan akış hızı, basınç ve konsantrasyon dağılım profilleri incelenerek, kayma gerilimleri sayısal olarak hesaplanmıştır. Çalışma kapsamında simülasyonu yapılan modelin, hücre kültürü, biyolojik analizler, ilaç taşıyıcı sistemler ve ilaç keşfi çalışmaları için mikroakışkan platformun geliştirilmesinde sistem tasarımı ve parametre seçimi için temel olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

2. MATERYAL & METOT

2.1 Dinamik Mikroakışkan Hücre Kültürü Platformunun Tasarlanması

A549 akciğer kanser hücrelerinin perfüzyon kültürü için İbidi μ -slide I Luer mikroakışkan sistem (Şekil 1A) kullanılmıştır. Mikroakışkan hücre kültürü çalışmalarında 3B mikroçevreyi oluşturabilmek için, A549 hücreleri matrijel içerisinde mikrokanalet yüklenmiştir. Dinamik akış koşulları altındaki hücre kültürü çalışmaları için peristaltik ve şırınga pompa sistemleri kullanılmıştır. Her iki pompa sistemi için hücreler iki ayrı mikroakışkan kanala 10^4 hücre olacak şekilde ekilerek, 37°C , %5 CO_2 koşullarındaki inkübatörde bir gece kültüvyona bırakılmıştır (Şekil 1B).

Peristaltik ve şırınga pompa sistemlerini aynı akış koşullarında karşılaştırabilmek için, bağlantı borusunun uzunluk ve iç çap ölçülerini kullanarak optimum akış hızı hesaplanmıştır. Peristaltik pompa sisteminin akış birimi dk'daki devir sayısı cinsinde



olduğundan mikrosistemde taşınan kültür ortamının hacimsel akış hızı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, peristaltik pompanın en düşük akış hızını (0.1 rpm) kullanabilmek için 45 cm uzunluğunda ve 1.6 mm iç çapındaki boru sisteme bağlanmıştır ve hacimsel akış hızına göre şırınga pompasında da akış hızı 2 $\mu\text{l}/\text{dk}$ 'ya ayarlanmıştır (Şekil 1C). Yani kullanılan bağlantı borusu göz önünde bulundurularak peristaltik pompadaki 0.1 rpm akış hızı, şırınga pompasındaki 2 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızına denk gelmektedir. Şırınga pompası sisteminde de sürekli akış altında zamana bağlı çıkış akımı uzaklaştırılmış ve belirli aralıklarla mikrosistem mikroskop altında incelenmiştir.

2.2 Dinamik Mikroakışkan Hücre Kültürü Sisteminin Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (Computational Fluid Dynamics – CFD) Modeli

2.2.1 Mikroakışkan Hücre Kültürü Sistemi

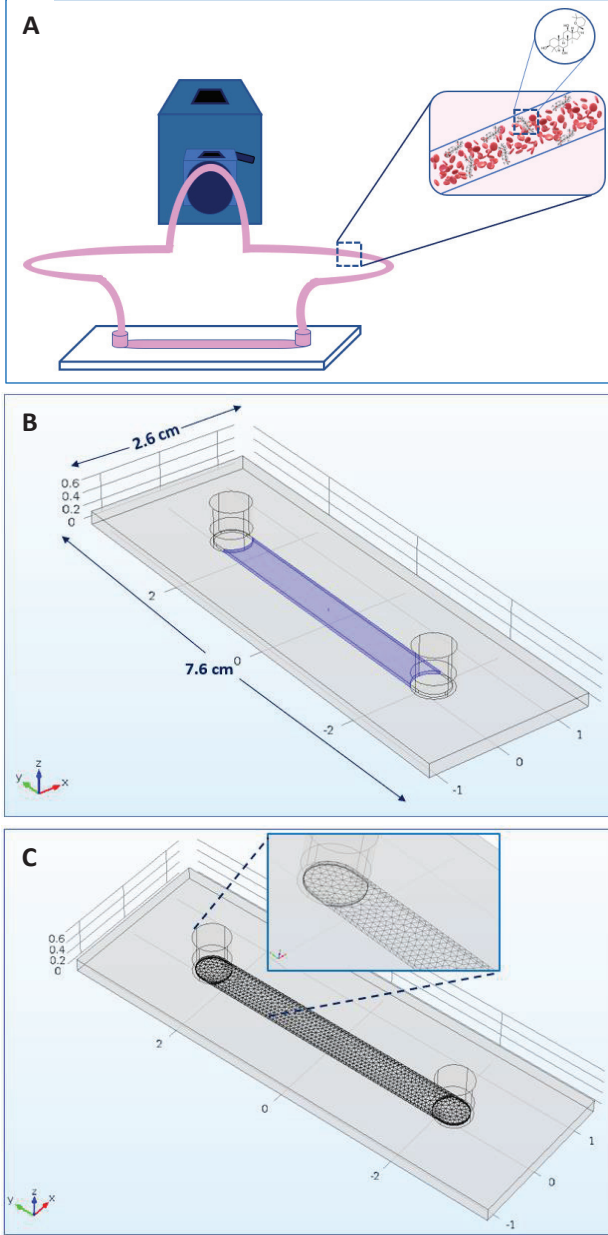
Mikroakışkan hücre kültürü platformu için ibidi firmasına ait polimer lamel üzerine yerleştirilmiş tek kanallı μ -slide I Luer sistemi kullanılmıştır. Bu mikrosistem hücrelerin yüksek çözünürlükteki mikroskopik analizleri ve akış uygulamaları için oldukça elverişlidir. Dinamik akış uygulamaları altındaki hücre kültürü çalışmalarında silikon bağlantı elemanları ve mikrokanallar arasında Luer adaptörleri ile kolaylıkla bağlantı kurulabilmektedir. Sistemdeki mikrokanal boyunca homojen hücre dağılımına sahip olmakla birlikte, uniform kayma gerilimine sahiptir. İlaç solüsyonunun hücrelere sürekli olarak beslendiği dinamik mikroakışkan hücre kültürü sistemi için *in-vivo* benzeri fizyolojik davranışı taklit edebilmesi için peristaltik pompa sistemine bağlanmıştır (Şekil 2A).

Mikroakışkan hücre kültürü platformu 25.5 x 75.5 mm² dış boyutlara sahiptir. Blok yüksekliği 2 mm'dir. İç mikrokanal uzunluğu 50 mm, genişliği 5 mm'dir. Başlangıç ve çıkış rezervuar hacmi 60 μl ve yarıçapı 0.25 cm'dir. Mikrokanalda hücrelerin büyüme alanı 2.5 cm²'dir. Bu bilgiler ışığında COMSOL Multiphysics (Version 5.2, COMSOL Inc.) yazılım paketi ile mikroakışkan sisteminin 3B geometrik çizimi yapılmıştır (Şekil 2B).

2.2.2 Mikroakışkan Sistemin Sonlu Elemanlar Metodu ile Simülasyonu

COMSOL Multiphysics yazılımı, model sistemin küçük parçalara ayrılarak her bir parçaya daha basit denklemler uygulandığı Sonlu Elemanlar Yöntemini (FEM - Finite Element Method) kullanarak çözümlenebilir ve domainin sadece belirli sayıda parçasında çözümlenebilmektedir. Geliştirilen analitik modelin ayrıklaştırılması nümerik analizin temelini oluşturmaktadır. FEM yöntemi ile problem küçük parçalara bölünerek ve sınır değer problemlerinin kısmi diferansiyel denklemleri kullanarak yaklaşık çözümleri bulunmaktadır. Oluşturulan modelin birbiri ile ağ şeklinde bağlantılı küçük parçalara ayrılması için çözüm ağı (meshing) uygulanmaktadır [38].

Mikroakışkan sistemin geometrik çiziminden sonra sayısal çözümlemenin yapılabil-



Şekil 2. Mikroakışkan Hücre Kültürü Sisteminin Boyutları ve 3-Boyutlu Tasarımı A) Dinamik Mikroakışkan Sisteminde Panaksatriol Molekülünün Sirkülasyonunun Şematik Gösterimi B) İbidi μ -slide I Luer Mikroakışkan Sistemin Geometrik Çizimi C) Mikroakışkan Hücre Kültürü Sistemi Modelinin Çözüm Ağ Yapısı



mesi için modelin çözüm ağ yapısı belirlenmiştir. Üç boyutlu mikrokanalın örgü ağ tasarımı için kanal duvarından merkezine doğru paralel olarak belirli bir oranla artış gösteren üçgen ağ yapısı seçilmiştir (Şekil 2C).

“Multifizik” nodülünde ise, “Model Geliştirme” arayüzüne eklenen fizik arayüzleri takımı için kullanılan birleştirilmiş fizik özellikleri yer almaktadır. “Akış Bağlantısı” multifiziğinde “Kimyasal Türlerin Taşınımı” arayüzündeki model girdilerini belirlemek için u ve p değişkenleri tanımlanmıştır.

2.2.3 Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği Analizi

Hesaplamalı akışkanlar dinamiği (CFD) modellemesi, mikro ölçekli hücre kültürü alanında kullanılan kullanışlı bir tekniktir. Hidrodinamik ortamın işlevinin ve onu düzenleyen faktörlerin incelenmesini sağlar. CFD hücre kültürü çalışmalarında sıvı akışının hücre fonksiyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bununla birlikte mikroakışkan hücre kültürü çip tasarımı ve optimizasyonu hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Böylece simülasyon çalışmaları ile üretimden önce, mikroakışkan hücre kültürü cihazı tasarımları ve bunların ilgili akış hızları ve modelleri teorik olarak değerlendirilebilmekte ve karakterize edilebilmektedir. Akışkan giriş hızları ve kanal boyutu gibi diğer hassas parametreler de kayma gerilimi üzerindeki etkilerini daha iyi tahmin etmek için değiştirilebilmekte ve böylece hücre büyüme koşulları optimize edilebilmektedir [39]. CFD kodlamaları genellikle akış olayının görselleştirilmesini de sağlamaktadır. Akış hızı, basınç, konsantrasyon gibi parametrelerin ölçümünde problemleri akışkan alanları içinde konumlandırmanın pratik olmadığı durumlarda önemli fayda sağlamaktadır [40].

COMSOL Mikroakışkanlar Modülü, mikroakışkan platformların dizaynı ve biyokimyasal ve fizyolojik proseslerin anlaşılması amacıyla genellikle bilim insanları ve mühendisler tarafından kullanılmaktadır. Bir simülasyon problemi oluşturabilmek için COMSOL Mikroakışkanlar fizik arayüzleri kullanılmaktadır. İncelenmek istenen biyokimyasal ya da fiziksel prosesler, uygun başlangıç ve sınır koşullarını içeren kısmi veya adi diferansiyel denklemler şeklinde her bir fizik ara yüzünde yer almaktadır. Süreçle ilgili eklenen her parametre ilgili denklemlerdeki terim veya durumu göstermektedir. Farklı mikroakışkan sistemlerin matematiksel modellemesi için Mikroakışkanlar Modülü’nde yer alan pek çok fizik arayüzü kullanılabilir.

Bu çalışma kapsamında mikroakışkan hücre kültürü sisteminde hem difüzyon hem de konvektif akış mevcut olduğundan programa Mikroakışkanlar Modülü’nden “Laminer Akış” ve “Seyreltilmiş Türlerin Taşınımı” olmak üzere iki ayrı fizik atanmıştır. “Laminer Akış” sekmesi altında laminer akış rejimindeki akışkanın akış hızı ve basınç davranışını belirlemek için kullanılmaktadır. “Seyreltilmiş Türlerin Taşınımı” sekmesi, “Kimyasal Türlerin Taşınımı” bölümünde yer almaktadır ve solvent içindeki seyreltik çözücünün konsantrasyon alanının belirlenmesinde kullanılmaktadır. “Laminer

Akış” sekmesi altında domain seçimi, akışkan özellikleri, başlangıç değerleri, giriş akış hızı, çıkış basınç değeri bilgileri girilmiştir. “Seyreltilmiş Türlerin Taşınımı” sekmesi altında ise domain seçimi, transport mekanizmaları, difüzyon katsayısı değeri, sistem içerisindeki başlangıç konsantrasyon değeri, sisteme giriş konsantrasyon değeri, reaksiyon hızı değeri bilgileri girilmiştir.

Mikroakışkan platformlarda yer alan mikrokanal ölçüleri sebebiyle akış laminardır ve eylemsizlik kuvvetleri ihmal edilmektedir. “Laminar Akış” sekmesi altında çözülen denklikler, momentumun korunumu (Denklem (1)) ve kütle korunumu (Denklem (2)) için süreklilik denklemini içeren Navier-Stokes denklemleridir [41, 42]. Navier-Stokes denklemleri, akış altındaki bir sıvının hızının, basıncının, sıcaklığının ve yoğunluğunun nasıl ilişkili olduğunu açıklamakta ve viskozitenin akış üzerindeki etkisini içermektedir. Bu sebeple Navier-Stokes momentum denklemleri, birçok durumda akışkan-tabanlı uygulamaları çözmek için tercih edilen bir seçenektir [40]. Üç boyutlu sıkıştırılmaz Newton tipi akışkan akışı için süreklilik, Navier-Stokes denklemleri ve kütle dengesi denklemleri (Denklem (1), (2) ve (3)):

$$\nabla \cdot V = 0 \quad (1)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \nabla v = -\frac{1}{\rho} \nabla P + \frac{\mu}{\rho} \nabla^2 v \quad (2)$$

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + v \cdot \nabla C_i = D_i \nabla^2 C_i + R_i \quad (3)$$

Denkliklerde v hız vektörünü (m/s), ρ sıvının yoğunluğunu (kg/m^3), P basıncı (Pa), μ sıvının viskozitesini (kg/(m.s)), C_i maddenin molar konsantrasyonunu (mol/m^3), R_i birim hacim başına madde tüketiminin molar oranını yani reaksiyon hızını ($\text{mol/m}^3.\text{s}$) ve D_i maddenin difüzyon katsayısını (m^2/s) temsil etmektedir. ∇ fark operatörü ve ∇^2 Laplace operatörüdür.

Mikroakışkan hücre kültürü çiplerinin boyutu çok küçük olduğundan, akış rejimi tipik olarak laminardır ve kanal duvarlarından merkezine doğru hızı artan sıvının katmanlarından oluşur. Bir akışkandaki eylemsizlik kuvvetlerinin viskozite kuvvetlere oranı, Reynolds sayısı (Re) olarak adlandırılan boyutsuz bir parametre ile verilmektedir (Denklem 4):

$$Re = \frac{\rho \cdot V \cdot l}{\mu} \quad (4)$$

V ortalama hızı (m/s) ve l karakteristik uzunluğu (m) temsil etmektedir. Yüksek Reynolds sayılarında, akış bozuklukları artma eğilimi gösterir ve türbülans geçişine neden



olmaktadır [42, 43]. Çok düşük hızlarda, eylemsizlik kuvvetleri viskoz kuvvetlere kıyasla çok zayıftır ve Reynolds sayısı 1'den düşüktür. Denklem (2)'nin sol tarafındaki eylemsizlik terimleri göz ardı edilebilir. Navier-Stokes denklemi, Stokes veya sürünen akış olarak adlandırılan bu rejimde Stokes denklemine indirgenmektedir (Denklem (5)). Sürünen akış, advectif atalet kuvvetlerinin viskoz kuvvetlere kıyasla düşük olduğu bir tür akışkan akışıdır.

$$\frac{\partial V}{\partial t} = -\frac{1}{\rho} \nabla P + \frac{\mu}{\rho} \nabla^2 V \quad (5)$$

“Seyreltilmiş Türlerin Taşınımı” sekmesi, bir seyreltilmiş çözünen bir maddenin konsantrasyon dağılımını belirlemek için kullanılmaktadır. Kütle transferinde etkili olan kuvvetler akışkan akışına bağlı olduğunda, Fick yasası veya difüzyif konveksiyon şeklinde olabilmektedir. Difüzyon ve konveksiyon tabanlı kütle transferi mekanizmalarının incelenmesinde kütle dengesi denklemi Denklem (3) kullanılmaktadır.

Bu çalışmada mikroakışkan hücre kültürü platformunda akış, konsantrasyon ve basınç dağılımı özelliklerini daha iyi anlaşılması için COMSOL Multiphysics 5.2a sonlu elemanlar yazılımı kullanılarak mikrosistemin sayısal simülasyonu yapılmıştır. Dinamik mikroakışkan hücre kültürü modelindeki mikrokanaldaki düşük akış hızları için Navier-Stokes denklemine (Denklem 2) dayanan bir 3B “Laminar Akış” arayüzü ve konsantrasyon dağılımı için “Seyreltilmiş Türlerin Taşınımı” arayüzü kullanılmıştır. Bu çalışmada, DMEM kültür ortamı 990 kg/m³ yoğunluğa ve 0.00078 Pa.s dinamik viskoziteye sahip olmakla birlikte, Newtonian tipi akış davranışı ile sıkıştırılmaz ve homojen olarak kabul edilmiştir. Giriş hızı ve sıfır basınç sınır koşulları sırasıyla giriş ve çıkışta kullanılmış ve tüm duvarlara kaymaz koşullar uygulanmıştır.

Daha sonra, kanal boyunca sabit bir dinamik viskozite varsayılarak, kayma gerilimi denklem (6) kullanılarak mikrokanal boyunca hesaplanmıştır. Navier-Stokes denklemlerinin Stokes yaklaşımı, akışkanın hareketini tanımlamak için kullanılmaktadır. Stokes akışında, kanalın ortasındaki ortalama kayma gerilimi hesaplanabilmektedir.

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

burada τ kayma gerilimi (dyn/cm²), μ sıvının dinamik viskozitesi (0.00078 kg/m.s), Q hacimsel akış hızı (2 μ l/dk), h mikro kanalın yüksekliği (0.04 cm) ve w mikro kanalın genişliğidir (5 mm).

2.3 Akciğer Adenokarsinoma (A549) Hücre Kültürü Çalışmaları

A549 adenokarsinoma (akciğer kanseri) hücre hattı 75 cm²'lik yüzey alanına sahip hücre kültürü kaplarında, %10 FBS, %0.5 Gentamisin, %0.5 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-glutamin eklenmiş yüksek glikoz içerikli DMEM kültür ortamı ile %5 CO₂,

37 °C koşullarındaki inkübatörde kültive edilmiştir. 3B hücre kültürü mikro çevresini simüle edebilmek için mikrokanallara ¼ dilüsyon oranında Matrijel (Corning Matrijel Bazal Membran) Matris (19.90 mg/ml), hücre süspansiyonu ve kültür ortamı karıştırılarak, 1x10⁵ hücre/100 µl olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Dinamik mikroakışkan sistemde kültür ortamı ve ilaçlı ortam 2 µl/dk akış hızında 24-48 saat boyunca mikrokanala verilmiştir (37 °C ve %5 CO₂).

2.4 Mikroakışkan Sistemlerde Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Mikroakışkan hücre kültürü sistemlerinde Panaksatriol ilaç solüsyonunun sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi (3-4,5-dimetil-tiazolil-2,5-difeniltetrazolium bromid) ile belirlenmiştir. Sürekli akış altında kültür ortamı ve ilaç uygulamasının ardından, deneme sonlandırılmış ve mikrokanallardan ilaçlı ve ilaçsız kültür ortamı çekilmiştir. Ardından mikrokanalda yer alan hücreler üzerine MTT solüsyonu (~220 µl) eklenerek, 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Adından MTT solüsyonu uzaklaştırılarak, DMSO (Dimetil sülfoksit) eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Oluşan MTT formazan kristalleri ve hücre sayısı arasındaki korelasyonu belirleyebilmek için mikrokanaldan 100 µl örnek alınarak, petri kabına aktarılmış ve 570 nm dalga boyundaki mikropilaka okuyucuda (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) okuma yapılmıştır. Spektrofotometrik veriler ile hücre canlılığı yüzdesel olarak aşağıdaki denklik ile hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre canlılığı}(\%) = \frac{ABS_{ilaçlı}}{ABS_{ilaçsız}} * 100 \quad (7)$$

2.5 İstatiksel Analiz

İstatiksel analiz, GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır. Çoklu grup denemeleri çift yönlü varyans analizi ile (iki yönlü ANOVA) ±%95 güven aralığında Bonferroni post testi ile değerlendirilmiştir (p<0.05). Ayrıca “*” p<0.05, “**” p<0.01, “***” p<0.001 ve “non-significant (ns)” p>0.05 anlamına gelmektedir. Deneyler 2-3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Veriler, ortalama değerler ±SEM (ortalamanın standart hatası) olarak gösterilmiştir.

3. SONUÇLAR

Bu çalışmada dolaşımdaki A549 akciğer adenokarsinoma hücrelerine Panaksatriol ilaç molekülünün etkisini ve dinamik akış koşulları altında hücreler üzerine etki eden biyomekanik kuvvetlerin (akış, konsantrasyon, basınç dağılımı ve kayma gerilimi) etkisini sayısal olarak incelemek için COMSOL Multiphysics 5.2a sonlu elemanlar yazılımı kullanılarak mikroakışkan sistemin sayısal simülasyonu yapılmıştır. Sayısal çözümlenin yapıldığı mikroakışkan sistem Şekil 1’de ve üç boyutlu geometrik çizimi Şekil 2’de gösterilmiştir. Mikroakışkan sistemin sayısal çözümleniminin yapılabilmesi



için modelin çözüm ağ yapısı Şekil 3'te gösterilmiştir. Mikroakışkan kanalda 2 µl/dk akış hızı değeri için akış ve kayma hızı profili, duvar basıncı davranışı, konsantrasyon dağılımı ve kayma gerilimi değeri belirlenmiştir.

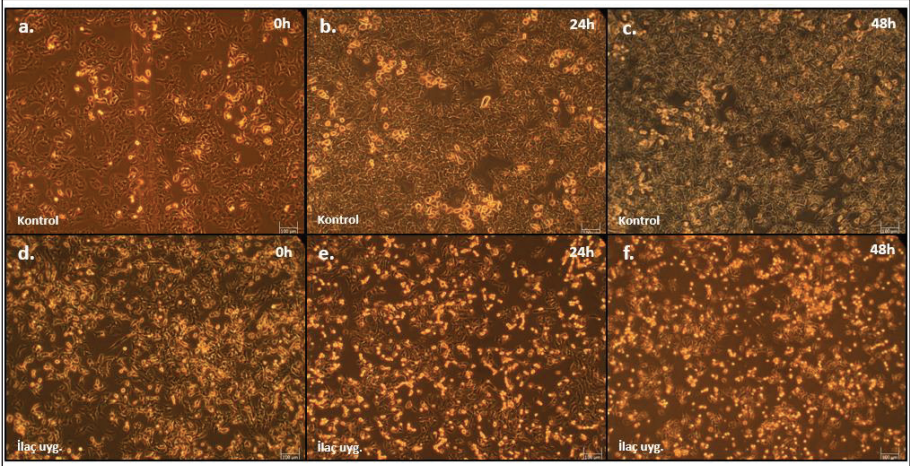
3.1 Mikroakışkan Sistemlerde A549 Hücre Kültürü için Dinamik Sistemin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında sürekli akışın sağlandığı dinamik mikroakışkan sistemleri için peristaltik pompa ve şırınga pompa kullanılmıştır. Her iki pompanın da test edilebilmesi için hem ilaçsız (kontrol) hem de ilaçlı kültür ortamının sürekli akış altında sisteme verileceği iki ayrı dinamik mikroakışkan sistem kullanılmıştır. Peristaltik pompa sistemi 0.1 rpm; şırınga pompa sistemi ise 2 µl/dk akış hızı ile 48 saat süresince çalıştırılmıştır. Mikrokanallar belirli sürelerde mikroskopik olarak incelenmiştir. Akış uygulamaları sonrasında, mikro kanallardaki hücre canlılıkları MTT yöntemi ile hesaplanmıştır. Bununla birlikte, mikroskop görselleri üzerinden hücre sayımı ImageJ programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dinamik mikroakışkan sistemlerde ilaç uygulaması sonrası kontrol grubuna göre elde edilen yüzdesel hücre canlılığı değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Dinamik Mikroakışkan Hücre Kültürü Sistemlerinde İlaç Uygulaması Sonrası Yüzdesel Hücre Canlılıkları

Dinamik sistem	MTT Hücre Canlılığı		ImageJ Hücre Canlılığı	
	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
Peristaltik pompa sistemi	-	%49±0,4	%63.48±4.6	%52.87±3.8
Şırınga pompası sistemi	-	%63±0,45	%65.45±6.7	%62.53±5.6

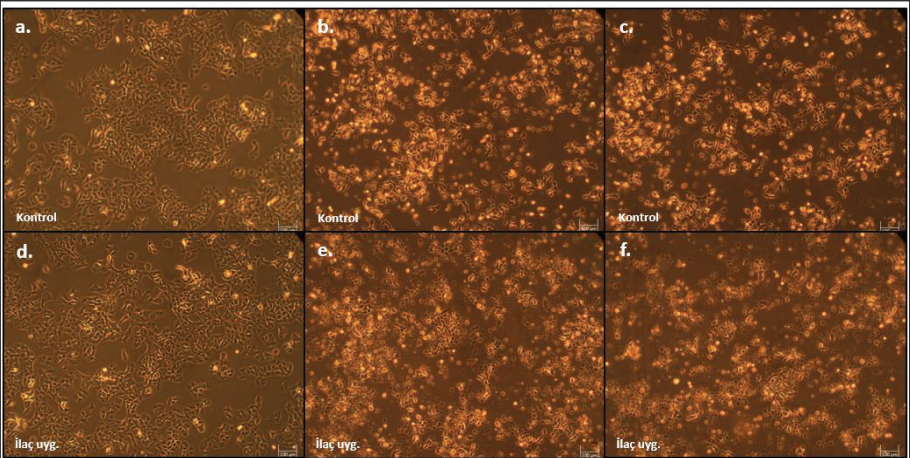
Peristaltik pompa sisteminin ilaç uygulanmayan kontrol grubunda hücre sayısında zamana bağlı artış olduğu görülmüştür. Peristaltik pompa ile mikrokanaldan sürekli akış altında geçirilen hücre kültürü ortamı şartlandırılmış ortam davranışı gösterdiğinden; hücreler salgıladıkları büyüme faktörlerinden dolayı çok daha iyi çoğalma göstermişlerdir. İlaç uygulaması sonrası hücre morfolojilerinde bozulmalar meydana gelmiş ve hücre ölümlerine bağlı olarak kontrol grubuna göre hücre sayısı azalmıştır (Şekil 3). Şırınga pompa sisteminde ise kontrol grubunda sürekli akış altında taze ortam geçirilmesine bağlı hücre kaybı olduğu görülmüştür. İlaç uygulaması sonrasında hücre morfolojilerinde bozulmalar meydana gelmiş ve canlı hücre sayısı azalmıştır (Şekil 4). Her iki dinamik sistem karşılaştırıldığında peristaltik pompa sisteminde hücrelerin daha iyi gelişim gösterdiği ve ilaç uygulaması sonrasında da ilaç hücre etkileşiminin daha etkili olduğu anlaşılmıştır. İnsan vücudunda kalp atışının yarattığı dalgalanmalar sebebiyle büyük arter damarlarında pulsatil laminar akım ile karşılaşmaktadır.



Şekil 3. Peristaltik Pompa ile Kurulan Dinamik Mikrosistemin 0 (a), 24 (b) ve 48. (c) Saat Görüntüleri; İlaç Uygulaması Sonrası 0 (d), 24 (e) ve 48. (f) Saat Görüntüleri (Zeiss, Germany, bar skalası 100µm)

DeneySEL olarak pulsatil akış periyodik olarak değişen akış hızına ve sabit akış yönüne sahip bir akış kullanılarak taklit edilebilmektedir. Bu bağlamda mikrovasküler endotelium fizyolojik ortamının akış dinamiğini daha iyi simüle etmesinden dolayı peristaltik pompa sisteminin çok daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

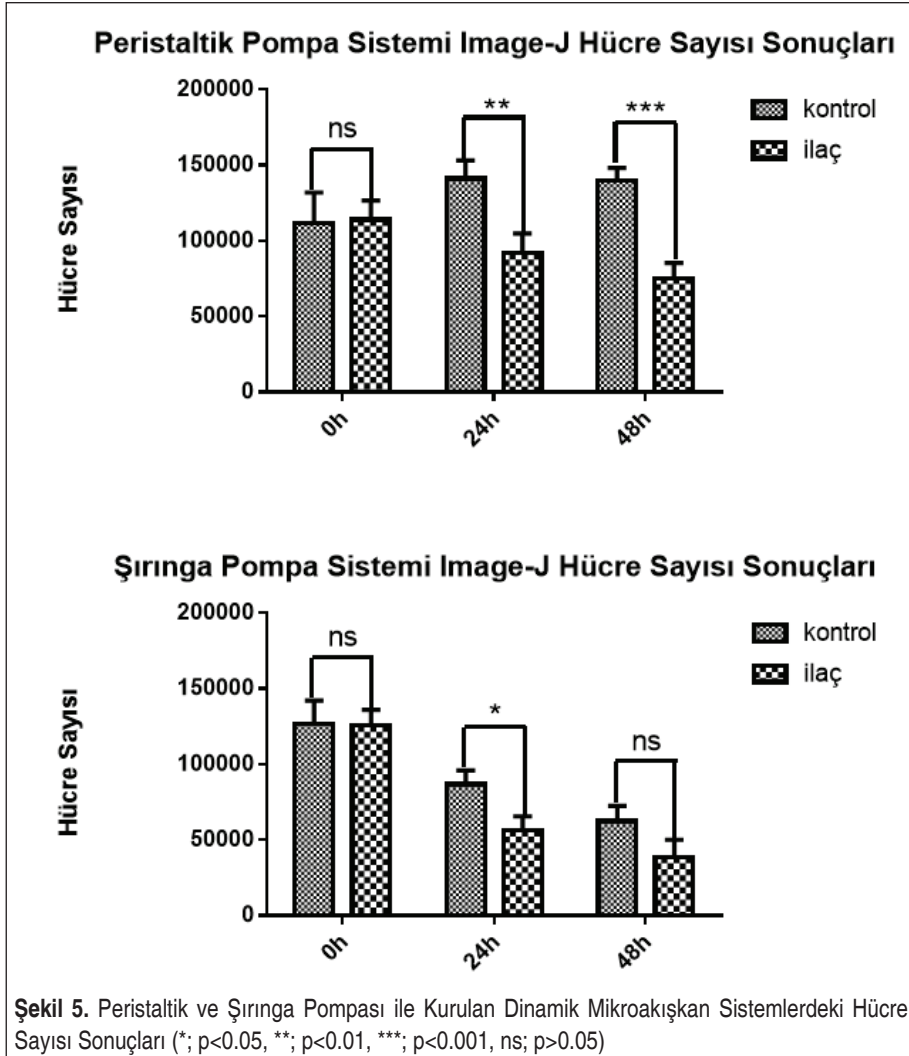
İlaç uygulaması sonrası mikroakışkan sistemlerdeki hücre canlılıkları ImageJ programı ile hesaplanmıştır. Mikroskobik görsellerde sağlıklı membran yapısındaki hücreler



Şekil 4. Şırınga Pompa ile Kurulan Dinamik Mikrosistemin 0 (a), 24 (b) ve 48. (c) Saat Görüntüleri; İlaç Uygulaması Sonrası 0 (d), 24 (e) ve 48. (f) Saat Görüntüleri (Zeiss, Germany, bar skalası 100µm)

belirlenerek, sayımları yapılmış ve GraphPad programında hücre sayısı grafikleri çizilmiştir. Her iki dinamik mikroakışkan sistemlerindeki ImageJ hücre sayısı sonuçları Şekil 5’de verilmiştir. Peristaltik pompa mikrosisteminde ilaç uygulanmayan kontrol grubunda zamana bağlı hücre sayısında artış olurken, ilaç uygulanan grupta hücre sayısında azalma olmuştur. Bunun aksine şırınga pompa mikrosisteminde ise hem kontrol hem de ilaç uygulanan grupta zamana bağlı hücre sayısında azalma meydana gelmiştir.

Hücre sayım sonuçları iki-yönlü ANOVA, Bonferroni post testi ile ± 0.95 güven aralığında değerlendirilmiştir. Peristaltik pompa sisteminde 24. ve 48. saatlerde kontrol



ve ilaç grubu arasında anlamlı farklar olduğu belirtilmiştir (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns; $p > 0.05$). Ayrıca 48. saatte kontrol ve ilaç grubunun anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür. Şırınga pompa sisteminde ise 48. saatte kontrol ve ilaç grubu arasındaki farklılığın anlamsız olduğu görülmüştür.

Tüm bu bilgiler ışığında peristaltik pompa ile kurulan mikrosistemin; hücre canlılığı, sayısı ve morfolojisi göz önünde bulundurulduğunda ilaç molekülü-hücre etkileşimlerinin daha iyi sonucuna varılmıştır. Şırınga pompası ile kurulan mikrosisteme hücreler uyum sağlayamadığı görülmüştür. Buna ek olarak mikrokanalda sürekli akış altında hücrelerin süpürülmesi sebebiyle hücre sayıları azalmıştır; dolayısıyla şırınga pompa ile sisteme verilen ilaç solüsyonu hücreler üzerinde etkinliğini gösterememiştir. Öte yandan pulsatil laminar akış sağlayan peristaltik pompa sisteminin kullanıldığı mikroakışkan hücre kültürü platformunda ilaç solüsyonunun perfüzyonu, *in vivo* hücresel fizyolojik çevreleri simüle etmesi, ilacın sistemde dağılımı ve hücreler tarafından emilimi açısından oldukça önemlidir [44]. İnsan vücudunda bulunan pek çok hücre, doğal pulsatil akışın olduğu ortamlarda bulunmaktadır ve hücresel fizyolojik davranışı gösterbilmek için mekanik strese gereksinim duymaktadır. Bu sebeple *in vitro* mikroakışkan hücre kültürü sistemlerinin *in vivo* fizyolojik mikroçevreleri simüle edebilmesi için pulsatil laminar sıvı akışını sağlayabilen bir kaynaktan güç alması oldukça önemlidir.

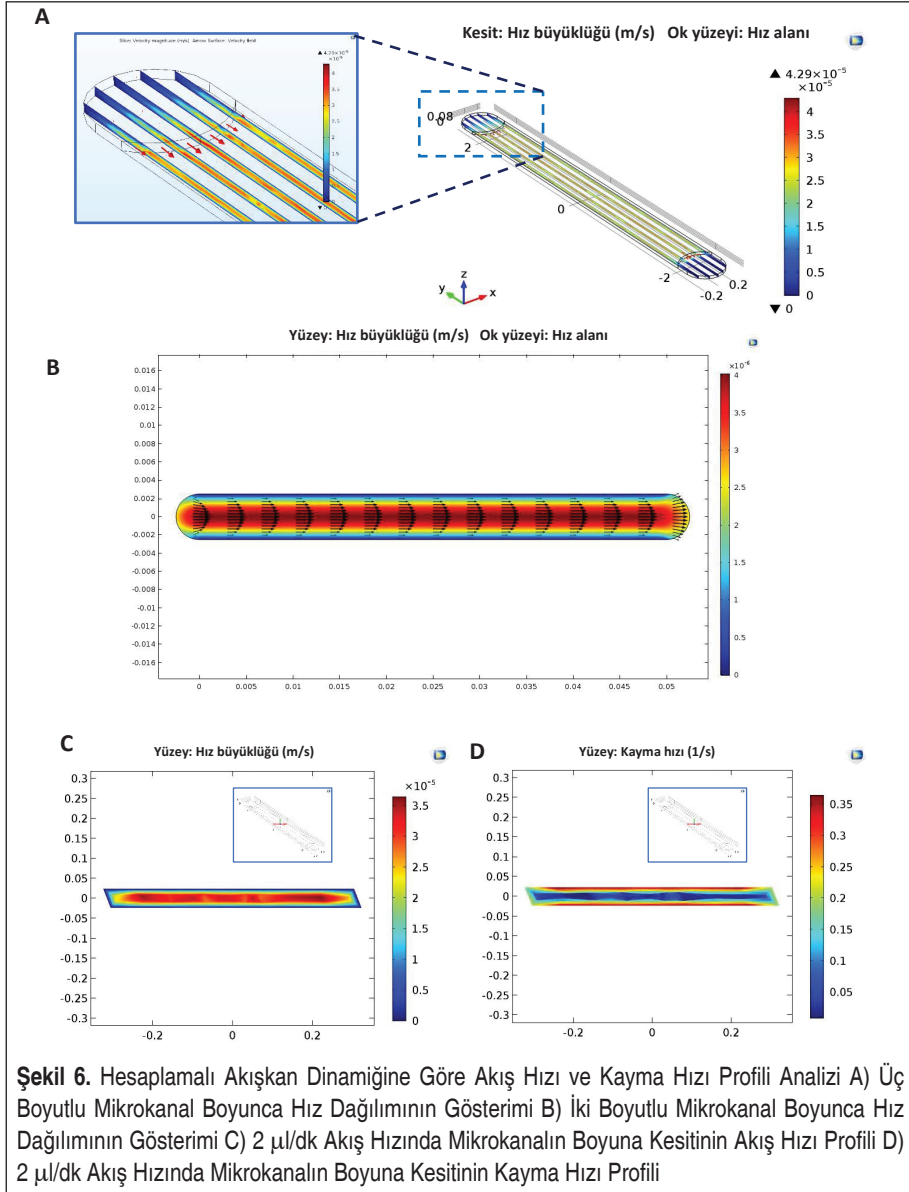
Peristaltik pompa sisteminin şırınga pompa sistemine göre bir diğer önemli avantajı da sistemde çok daha az miktarlarda kültür ortamı ve ilaç solüsyonunun harcanmasıdır. Peristaltik pompa sistemindeki akış uygulamalarında bağlantı borusu ile mikrokanal hacmi kadar miktarda kültür ortamı ve ilaç solüsyonu kullanılmaktadır. Şırınga pompa sisteminde ise uygulama süresince taze kültür ortamı ve ilaç solüsyonu şırıngadan mikrokanala sürekli olarak beslenmektedir. Dolayısıyla kullanılan kıymetli ve pahalı ilaç solüsyonlarının çok fazla harcanmasına yol açmaktadır.

3.2 Dinamik Mikroakışkan Sistemin Hesaplamalı Akışkan Modelinin Simülasyonu

Dinamik mikroakışkan hücre kültürü sisteminde mikrokanal boyunca akış hızı profili, kayma hızı profili, duvar basıncı davranışı ve konsantrasyon dağılımı incelenmiştir. Bu çalışmada hücre kültürü için kullanılan DMEM kültür ortamının Newtonian akış ve homojen olduğu varsayılmıştır. Bu sebeple Newtonian olmayan etkiler ihmal edilmiştir. DMEM kültür ortamının 37°C'deki yoğunluk ve dinamik viskozite değerleri sırasıyla 990 kg/m³ ve 0.00078 Pa.s olarak belirlenmiştir. Panaksatriol ilaç solüsyonunun sürekli akış altında beslendiği mikroakışkan sistemde hem difüzyon hem de konvektif akış söz konusu olduğundan modele “Laminar Akış” ve “Seyreltilmiş Türlerin Taşınımı” olmak üzere iki ayrı fizik atanmıştır. Konveksiyon ve difüzyon kütle transfer mekanizmalarının eş zamanlı birlikte yer aldığı mikroakışkan sistemlerde deneysel lag-time analiz metodu kullanılarak ilaç molekülünün difüzyon katsayısı

yani hidrodinamik yayılım katsayısı belirlenebilmektedir. Buna bağlı olarak sistemde Panaksatriol ilaç molekülünün hidrodinamik yayılım katsayısı yaklaşık 1×10^{-6} m/s olarak belirlenmiştir [28].

CFD analizine göre mikrokanalın orta noktasından alınan enine kesitin hız profili Şekil 6'da gösterilmiştir. 2 μ l/dk başlangıç akış hızı için kanalın merkezinde akış hızı en



yüksek değere ulaşırken, kanalın duvarına doğru akış hızı azalmaktadır. Buna bağlı olarak peristaltik pompa ile $2 \mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızı uygulandığında mikrokanalın ortasında akış hızı $4.29 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ iken, duvar kısmında bu duvar $0.2 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ 'ye kadar düşmektedir (Şekil 6A). Tam gelişmiş laminar akışta, her akışkan parçacığı bir akım çizgisi boyunca sabit bir eksenel hızda hareket etmekte ve hız profili akış yönünde değişmeden kalmaktadır. Radyal yönde hareket yoktur ve bu nedenle akışa dik doğrultudaki hız bileşeni her yerde sıfırdır. Akış sabit ve tam gelişmiş olduğu için hızlanma yoktur (Şekil 6B).

Aynı akış hızında mikrokanalın enine kesitinde akış hızı ve kayma hızı profilleri gösterilmiştir (Şekil 6C, 6D). Elde edilen simülasyon sonuçlarına göre akış hızı profilinde laminar akış mikrokanalın merkezinden duvarına doğru gittikçe ortalama akış hızının azaldığı görülmüştür. Diğer yandan kayma hızı profiline göre mikrokanalın merkezinden duvarına doğru gittikçe kayma hızının arttığı görülmüştür. Buna bağlı olarak mikrokanal duvarlarına yaklaştıkça kayma gerilimi de artmaktadır. Kayma gerilimi köşeler hariç mikrokanal duvarında maksimum büyüklüğe sahiptir. Sonuç olarak kanalın merkezinde kayma gerilmesinin ihmal edilebilir olduğu, hücrelerin hareketsiz ve etkileşim içinde oldukları kanalın kenarlarına yaklaştığında ise arttığı gözlemlenmiştir.

İnsan vücudundaki atardamarlarda fizyolojik kayma gerilimi değeri yaklaşık $10\text{-}60 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ aralığında iken; damarlar genellikle $1\text{-}10 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ aralığındadır. Kayma gerilimi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla kan damarlarının duvarlarındaki hücrelerin reaksiyonlarına neden olmaktadır. Kayma geriliminin ayrıca hücre bağlanmasını, patolojik yanıtı ve gelişim biyolojisini de etkilediği gösterilmiştir [33]. Modelde DMEM kültür ortamı akış dinamiği zamana bağlı Navier-Stokes denklemleri (Denklem 1 ve 2) kullanılarak tanımlanmıştır. Kültür ortamının Newtonian davranışla sıkıştırılmaz ve homojen olduğu kabul edildiğinden, Newtonian olmayan etkiler ihmal edilmiştir [38]. Denklem 6'da verilen eşitliğe göre mikrokanalın ortasındaki Newtonian hidrodinamik kayma gerilimi hesaplanabilmektedir.

Dinamik mikroakışkan hücre kültürü sisteminde ilaç etken maddesinin kanser hücreleri üzerinde etkili olabilmesi için düşük akış hızı seçilmiştir. Buna göre $2 \mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızı için mikrokanal ortasındaki kayma gerilimi değeri $1.75 \times 10^{-3} \text{ dyn}/\text{cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Modelde akış hızı $200 \mu\text{l}/\text{dk}$, $2 \text{ ml}/\text{dk}$ ve $20 \text{ ml}/\text{dk}$ olarak artırıldığında kayma gerilimi değerleri sırasıyla $0.175 \text{ dyn}/\text{cm}^2$, $1.75 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ ve $17 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Akış hızı arttıkça, kayma hızı ve kayma gerilimi de artış göstermektedir. Hesaplamalı akışkanlar dinamiğine göre sistemde akış hızı arttıkça, mikrokanalın duvar kısımlarına doğru uygulanan kayma hızı ve kayma gerilimi artış göstermekle birlikte (Şekil 6C, 6D), mikroakışkan kanalda akış hızı ve kayma gerilimi profilleri değişim göstermemektedir. Yüksek akış hızlarında mikrokanalın duvar bölgelerindeki akış hızının ani değişiminden dolayı kayma gerilimi artmakta ve buna bağlı olarak

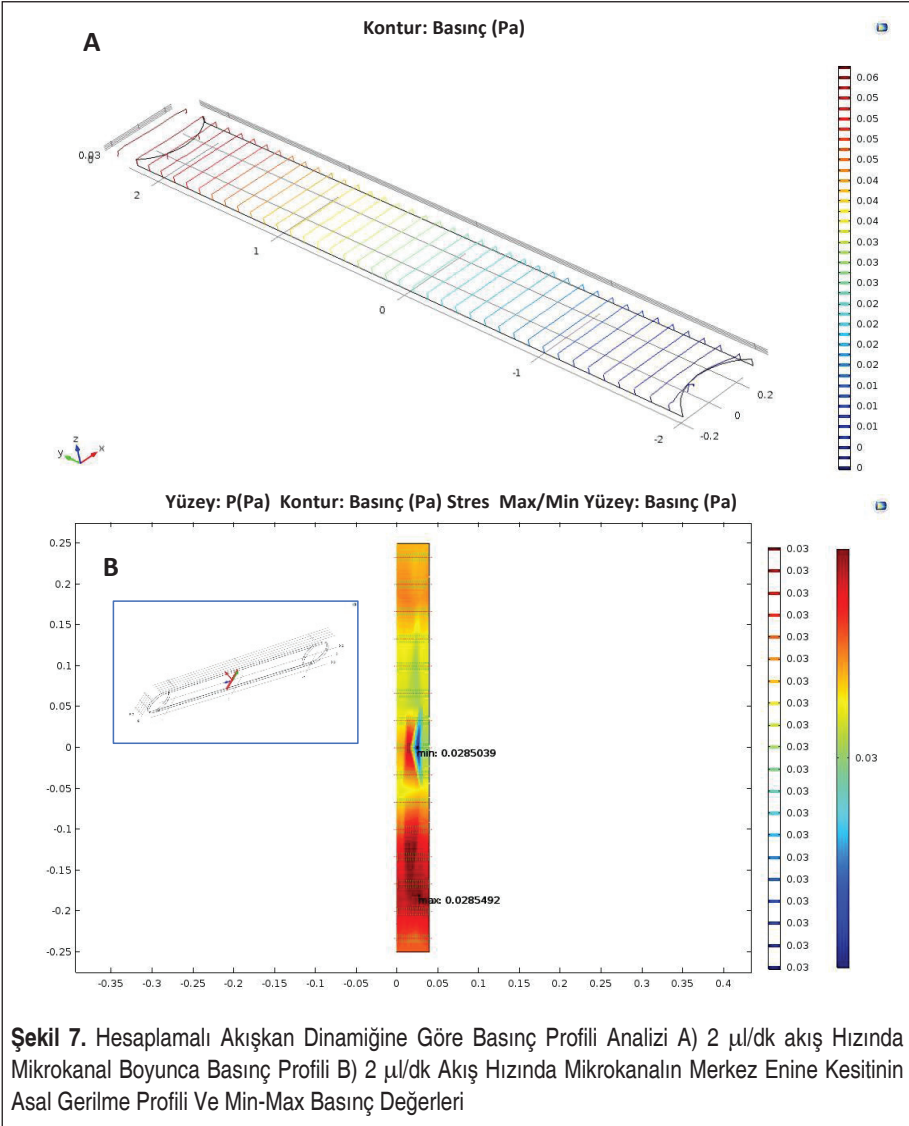


mikrokanal üzerinde yüksek kayma gerilimine maruz kalan hücreler canlılıklarını yitirebilmektedir [45]. Kayma gerilimi hücre davranışlarını ve fizyolojisini etkilemektedir. Bu bilgilere dayanarak in vivo kayma gerilmelerini ve belirli hücrelerde farklılaşma için gerekli kayma gerilimi değerlerini aşmadan mikrokanal içinde mümkün olan maksimum akış hızı belirlenebilmektedir. Akış ve kayma hızlarının optimize edilmesi özellikle hassas kültürlerde ve farklılaşma çalışmalarında çok önemlidir [46]. Buna bağlı olarak tümör veya endotel hücre boyutlarını da göz önünde bulundurarak, mikroakışkan hücre kültürü uygulamaları için kayma geriliminin hücreler üzerindeki etkisinin düşük olduğu en iyi kanal geometrisi önerilebilmektedir.

Literatürde yer alan çalışmalar ışığında hücre proliferasyonu ve farklılaşması 0.3 ve 2.7 dyne/cm² aralığındaki kayma geriliminden etkilenmektedir. Kök hücrelerin uzun süreli kültivasyonu için genellikle 2.5 nL/s akış hızı ve 0.3 dyne/cm² kayma gerilimi koşulları altında kültür sıvısının beslendiği ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırıldığı perfüzyon sistemler kullanılmaktadır [47, 48]. Hücreleri korumak için kayma gerilimi sınırının 0.3 dyne/cm² olduğu varsayılmaktadır [46]. Çalışma kapsamında kullanılan mikroakışkan platformdaki ilaç uygulamaları için hücreler üzerindeki etkisi düşük olan kayma gerilimi etkisi göz önünde bulundurularak, akış hızının 200 µl/dk'ya kadar artırılabilceği sonucuna varılmıştır. Dinamik mikroakışkan sistemlerde hücreler düşük akış hızı koşulları altında kültürlendiğinde, kayma geriliminin hücreler üzerindeki etkisi de minimum olacaktır. Aynı zamanda düşük akış hızları ile çalışıldığında kalış süreleri de artacağından, biyoaktif ilaç moleküllerinin hücreler ile etkileşimi de yüksek seviyede olacaktır.

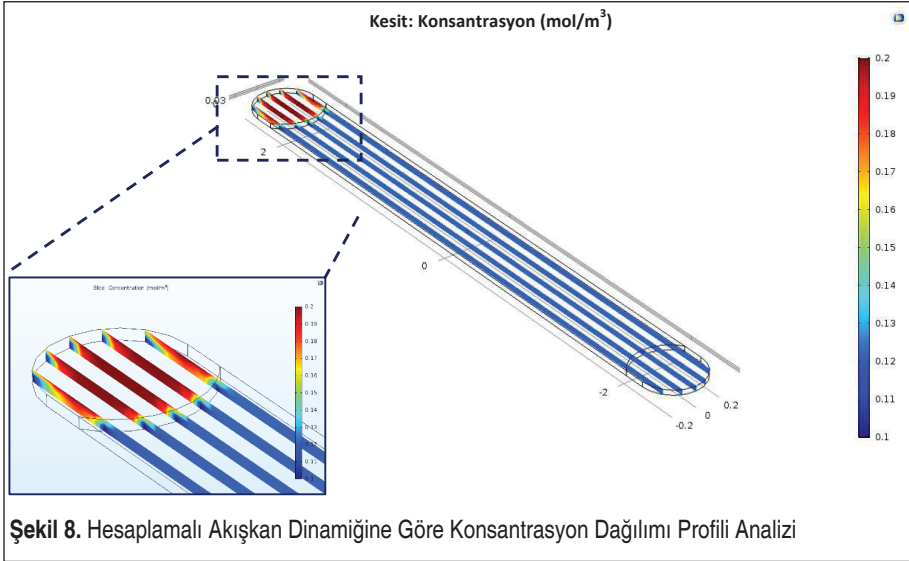
Dinamik mikroakışkan hücre kültürü sisteminin mikrokanal boyunca basınç profili Şekil 7'de gösterilmiştir. Kanal boyunca farklı bölgelerdeki basınç davranışı farklı renk dağılımları ile belirtilmiştir. Laminar akışın hâkim olduğu mikrokanaldaki basınç dağılımı simülasyonuna göre başlangıç noktasından çıkış noktasına doğru gidildikçe basıncın azaldığı (0.06 Pa'dan 0.01 Pa'a doğru azaldığı) gösterilmiştir (Şekil 7A). Mikrokanalın merkezinden alınan enine kesitteki basınç dağılımında kanalın ortasında ve duvarındaki basınç değerinin aynı ve yaklaşık 0.03 Pa olduğu görülmüştür (Şekil 7B).

Hem konvektif hem de difüzyif akışın olduğu mikroakışkan sistemdeki mikrokanal boyunca konsantrasyon dağılımı Şekil 8'de gösterilmiştir. İlaç solüsyonunun sisteme beslendiği giriş bölgesinin merkezinde ilaç konsantrasyonunun en yüksek seviyeye (0.2 mol/m³) çıktığı ve sonrasında mikrokanala giriş bölgesinin sonuna doğru 0.1 mol/m³e düştüğü görülmüştür. Devamında ilaç konsantrasyonu mikrokanal boyunca aynı başlangıç değerinde (0.1 mol/m³) seyretmiştir. Akış hızı (2 µl/dk) düşük olduğundan mikrokanal girişinde madde konsantrasyonu dengeye gelerek mikrokanal boyunca aynı konsantrasyon değerinde dağılım göstermiştir. Akış hızının artırılması durumunda ise, konsantrasyon profili daha uniform hale gelebilmektedir, fakat ilaç ve hü-



re etkileşimlerinin daha etkili olabilmesi için mikrokanal boyunca ilaç moleküllerinin yüksek alıkonma sürelerinde ve aynı konsantrasyon değerinde seyretmesi önemlidir.

Mikroakışkan hücre kültürlerinde hesaplamalı akışkanlar dinamiği modelleme yaklaşımlarının uygulandığı pek çok çalışma literatürde yer almaktadır. Leclerc ve ark. (2006) dinamik mikroakışkan ortamında osteoblastik hücre davranışlarını inceledikleri çalışmada çeşitli akış hızları için Navier-Stokes denklemlerini çözmüşlerdir [49]. CFD modellemesi 3B dinamik mikrosistemde tek tip hücre büyümesinin mümkün



olabildiğini göstermekle birlikte; hürelere besin taşınması, hücrelerin mekanik stabilitesi ve hücre büyümesi sırasında kültür koşullarının değerlendirilmesi konusunda da fikir vermektedir. Leclerc ve ark. (2008)'nin yapmış oldukları bir diğer çalışmada mikroakışkan platformda fare fibroblastları (Swiss 3T3) ve karaciğer hepatokarsinom (HepG2/C3a) hücre hatlarının kültüründe akış alanlarını ve kayma gerilmelerini hesaplamak için CFD modellerini uygulamışlardır [50]. Simülasyon sonuçları, CFD'nin hücre kültürü mikroakışkan çip tasarımının optimizasyonu için güçlü bir araç olduğunu göstermiştir. Yine benzer bir diğer çalışmada Hung ve ark. (2005) bir mikroakışkan cihazın simülasyon çalışması ile mikrosistemin kararlı hal hız profilini ve zamana bağlı kütle transfer özelliklerini analiz etmişlerdir [51]. Yüksek verimde hücre büyümesinde kararlı ve tek tipte bir mikro ortam sağlanması için yüksek en-boy oranlı tasarımın yardımcı olacağı sonucuna varmışlardır. Akışkan kayma kuvvetleri dahil biyomekanik faktörlerin in vitro kültürlerde hücre davranışı üzerinde oldukça önemli etkisi bulunmaktadır. Hücre adezyonu (yapışması), çoğalması ve farklılaşması gibi hücresel tepkiler üzerinde etkisi olan hem kimya hem de mikro yapı ile farklı yüzey koşullarına hücresel tepkiler de rapor edilmiştir. Geliştirilen kayma kuvvetleri üzerinde hücrelerin geliştiği yüzeylerin özelliklerinin belirlenmesi önemlidir. Brown ve ark. (2007) kontrollü akış döngüsü içinde bulunan paralel plaka biyoreaktörünün akış karakteristiğini incelemek için CFD modellemesini geliştirmişlerdir [52]. Buna göre paralel plaka haznesinden geçen akışın doğası gereği laminar olduğu ve bu nedenle sıvı akışının in vitro hücre süreçleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için uygun olduğu sonucuna varmışlardır.

Hücre-tabanlı mikroakışkan ilaç tarama platformlarında da hesaplamalı akışkanlar di-

namığı analizi çalışmaları oldukça yaygındır. Özellikle Faz-I klinik faz denemelerini geçen aday ilaçların büyük bir çoğunluğu ilacın geliştirdiği insan toksisitesi ve biyoyararlanım sorunları sebebiyle FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından pazarlama onayını alamamaktadır. Bu durumu düzeltebilmek için; son yıllarda araştırmacılar in vivo kültür yanıtlarıyla yüksek derecede korelasyona sahip veriler üretebilmek için klinik öncesi uygulanabilen ve hayvanlardaki immün yanıt uyumsuzluğu ile etik problemlerin üstesinden gelebilen, gelişmiş in vitro mikroakışkan platformları geliştirmeye başlamışlardır. Klinik öncesi araştırmalarda in vitro mikroakışkan hücre kültürü sistemlerinin kullanımı, aday ilaç moleküllerinin farmakokinetik ve farmakodinamik etkilerinin daha iyi tahmin edilmesini ve devamında başarısızlık oranlarının azaltılmasını sağlamaktadır. Ayrıca dinamik mikroakışkan sistemlerin, geleneksel statik in vitro sistemlere göre daha yüksek verimlilik ile sonuçlanan kütle transferi ve hücresel madde alımı bakımından çok daha iyi sonuçlar sağladığı gösterilmiştir. Bu bağlamda Maguire ve ark. (2011), hesaplamalı akışkanlar dinamiği çerçevesinde mikroakışkan sistemlerde hedef bileşiklerin konvektif taşınımı başarılı bir şekilde modelleyerek ilaç metabolizmalarını incelemiştir [53].

Çip-üstü-organ ve doku teknolojileri karaciğerdeki kompleks ilaç taşınım ve reaksiyon süreçlerini taklit edebilen mikro ölçekte ilaç tarama platformları sağlayabilmektedir. 3B doku modellerinin ilaçlarla perfüzyonu ile oluşturulan dinamik mikrosistemler in vivo senaryoyu oluşturmaktadır. Bu tür in vitro metabolizma modellerinin dinamik doğası gereği perfüze edilen ilacın doku mikroçevresine en etkili metabolik dönüşümü için optimum üretim prosesinde akış, malzeme ve geometrik parametrelerin belirlenmesi için güvenilir sayısal araçlar sağlaması gerekmektedir. Fakat bu tür sistemlerin optimum tasarımında hesaplamalı akışkan dinamiği analizlerini içeren çalışmalarda literatür eksikliği bulunmaktadır. Bu bağlamda Toulomousis & Chang (2015), hücrelerin enkapsüle edildiği 3B aljinat hidrojel tabanlı doku mühendisliği yapıları ile insan karaciğer analogunu 3B mikroakışkan platformlarında hesaplamalı modellemesine odaklanmışlardır [54]. Oluşturulan bu biyopolimer yapılar ile Stokes koşullarını ($Re < 1$) sağlayan belirli bir hacimsel akış hızında ilaç molekülü mikrokanala perfüze edilmiştir. Modellemede kayma gerilimli akış rejiminde laminar hız profili ve duvar kayma gerilimi için Stokes akış denklikleri (serbest akış rejimi) ve Brinkman denklikleri (gözenekli akış rejimi) birlikte çözülmüştür. Bu denklikler ilaç konsantrasyon profilini vermek üzere Konveksiyon-Difüzyon denklemi ile birleştirilmiştir. Böylelikle öngörülen proses ve malzeme parametreleri için akış kanalları boyunca ilaç konsantrasyon profili incelenmiştir. Bu simülasyon çalışmasında enkapsüle edilmiş hücrelere akış uygulaması ile ortaya çıkan kayma gerilimi etkisinin karaciğer hücresi enzimlerinin ilacı metabolize etme fonksiyonel yeteneğini değiştirdiği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte Toulomousis & Chang (2016)'ın yaptıkları diğer benzer çalışmada, 3B hepatosit yüklü hidrojel yapılarına ilaç perfüzyonunun yapıldığı dinamik mikroorgan sistemleri ile in vivo karaciğer metabolizmasının senaryosunu



taklit etmişlerdir [55]. Dinamik mikroakışkan sistemde metabolit konsantrasyon profilini elde edebilmek için hidrodinamik, kütle transferi ve farmakokinetik denklemler FEM (Sonlu Eleman Metodolojisi) tabanlı modelleme yaklaşımı ile çözülmüştür. Bu şekilde küçük ölçekli model için hepatosit metabolik aktivitesini değiştiren hücre mekanik transdüksiyon etkisi değerlendirilmiştir.

Son yıllarda ilaç güvenliği ve ilaç etkinliği taramaları için mikroakışkan platformların kullanıldığı çalışmalardan biri de Kohl ve ark. (2021)'nin yapmış olduğu ilaç sitotoksitesinin belirlendiği ve hesaplamalı akışkan dinamiği simülasyonunun yapıldığı in vitro mikroakışkan platform (minyatürize inkübatör mikroskobu ile birleştirilmiş mikroakışkan kartuş)'dur [56]. Proses ve tasarım gereksinimlerini belirlemek için 3B konveksiyon-difüzyon modeli oluşturularak, farmasötik bileşen olan klorpromazin konsantrasyon dağılımı, mikrokanallar boyunca akış rejimi ve kayma stresi incelenmiştir. Öte yandan Ahmed ve ark. (2021) tarafından hesaplamalı akışkanlar dinamiği kullanılarak mikroakışkan sistem parametrelerin tasarımı ve validasyonuna yönelik çalışmalar da mevcuttur [57]. Çünkü yüksek kalitede kimyasal ve biyolojik ürünler geliştirmek için akış hızı, kimyasal reaktivite, basınç düşüşü vb. içeren mikro ölçekli taşınım problemlerinin çözümünde mikroakışkan sistem parametrelerinin analiz edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle mikroakışkan kanallar aracılığıyla kimyasal ve biyolojik olayların etkileşiminin karakterizasyonu ve optimizasyonu, mikroakışkan platformlarda akışkan akış tasarımı ve mühendisliği için oldukça önemlidir.

4. TARTIŞMA

Mikroakışkan tabanlı biyokimyasal analizler, hücre ve doku mühendisliğindeki son gelişmeler, kütle transferinin giderek daha karmaşık bir şekilde kontrol edilmesine dayanmaktadır. Mikroakışkan sistemler, kütle transferi üzerinde zamansal ve uzaysal kontrol imkânı sağlamaktadır. Kimyasal ve biyolojik moleküllerin işlenmesi için yeni teknikler sürekli olarak gelişmekte ve bunların ayrılmasına, karıştırılmasına veya zamana bağlı konsantrasyon profilinde sunulmalarına olanak sağlamaktadır. Mikroakışkan yapılar, biyolojik hücrelerin karakteristik boyutlarında kütle aktarımının analiz edilmesi için oldukça uygundur. Doku/organ mühendisliği, kemotaksis (hücre göçü) ve kan pıhtılaşması ile ilgili in vivo çalışmalar, sistemdeki kütle aktarımı anlaşıldığında ve kontrol edildiğinde büyük miktarda biyolojik karmaşıklığın sistematik olarak analiz edilebileceğini ortaya koymaktadır [14]. Mikroakışkan hücre kültürü platformlarındaki süreçlerin teorik modellemesi, kritik çıktılarının tahmin edilmesi ve tasarımda kullanılacak fiziksel parametrelerin incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bu sistemlerde biyomoleküler taşınımın modellenmesi, mikroakışkan platformların ve kantitatif biyolojik analizlerin tasarımını kolaylaştıran değerli ve kullanışlı bir analitik araçtır. Geliştirilen analitik model, mikroakışkan sistem tasarımına rehberlik edebilmektedir. Böylelikle maliyetli ve zaman alıcı deneyler en aza indirilerek, tasarım süreci verimliliği ve etkinliği artırılabilir [38]. Doku Mühendisliği veya

Rejeneratif Tıp alanları için, sıvı akışının in vitro hücre kültürleri üzerindeki etkileri düşünüldüğünde, kayma kuvvetlerinin etkisi önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle, hücrelerin ve dokuların çevresinde var olan sıvı koşullarını tam olarak değerlendirmek için Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği gibi yöntemlerin kullanılması önemlidir. Bununla birlikte akışkan kuvvetlerin ve streslerin hücreler üzerindeki etkisini analiz etmek ve görselleştirmek için paha biçilmez bir araçtır. Ayrıca hesaplama modelleri, hücre kültürü çalışmalarında hücreleri etkileyen çok sayıda parametrenin tahminini ve ardından test edilmesini sağlamak için de çok önemlidir.

Çalışma kapsamında akış ve kayma hızının ayarlanabilir düzenlemesini sağlayan tek kanallı mikroakışkan hücre kültürü platformunda taşınım profilini gösteren analitik bir model oluşturulmuştur. Bu sistemde hücreler minimum kayma gerilimine maruz bırakılırken, kanal uzunluğu boyunca tek tip konsantrasyon profilinin korunduğu gösterilmiştir. Tek kanal konfigürasyonuna sahip mikroakışkan hücre kültürü sistemlerinde akış hızının artırılmasıyla kanal boyunca çözünen konsantrasyon dağılımı da değiştirilebilir ve bu da hücreler üzerindeki kayma gerilimini arttırabilmektedir. Çalışma kapsamında simülasyonu yapılan analitik modelin, doku kültürü, biyolojik tayin, ilaç taşıyıcı sistemler, ilaç keşfi ve taraması çalışmaları için kullanılacak mikroakışkan platformun geliştirilmesinde sistem tasarımı ve parametre seçimi için temel olarak kullanılabilceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, bu modelin temel fiziği çeşitli hücre kültürü popülasyonları ve tiplerinden oluşan sistemlerde birkaç çözünür bileşenin etkileşimini içeren daha kompleks sistemleri dikkate alacak şekilde genişletilebilir.

KAYNAKÇA

1. **Volpatti, L. R., Yetisen, A. K.** 2014. “Commercialization of microfluidic devices”, *Trends in Biotechnology*, vol. 32, p. 347–350. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.04.010.
2. **Zhang, B., Radisic, M.** 2017. “Organ-on-A-chip devices advance to market”, *Lab on a Chip*, vol. 17, p. 2395–2420. DOI: 10.1039/c6lc01554a.
3. **Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., Ingber, D. E.** 2010. “Reconstituting organ-level lung functions on a chip”, *Science*, vol. 328, p. 1662–1668. DOI: 10.1126/science.1188302.
4. **Huh, D., Leslie, D. C., Matthews, B. D., Fraser, J. P., Jurek, S., Hamilton, G. A., Thorneloe, K. S., McAlexander, M. A., Ingber, D. E.** 2012. “A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice”, *Science Translational Medicine*, vol. 4, p. 147-159. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004249.
5. **Marx, U., Walles, H., Hofmann, S., Lindner, G., Horland, R., Sonntag, F., Klotzbach, U., Sakharov, D., Tonevitsky, A., Lauster, R.** 2012. ‘Human-on-a-chip’ developments: a translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man? *Alternatives to Laboratory Animals*, vol. 40, p. 235–257. DOI: 10.1177/026119291204000504.



6. **Edington, C. D., Chen, W. L. K., Geishecker, E., et al., Griffith, L. G.** 2018. “Interconnected microphysiological systems for quantitative biology and pharmacology studies”, *Scientific Reports*, vol. 8, p. 4530. DOI: 10.1038/s41598-018-22749-0.
7. **Siyan, W., Feng, Y., Lichuan, Z., Jiarui, W., Yingyan, W., Li, J., Bingcheng, L., Qi, W.** 2009. “Application of microfluidic gradient chip in the analysis of lung cancer chemotherapy resistance”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 49, p. 806–810. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.12.021.
8. **Chung, B. G., Choo, J.** 2010. “Microfluidic gradient platforms for controlling cellular behavior”, *Electrophoresis*, vol. 31, p. 3014–3027. DOI: 10.1002/elps.201000137.
9. **Even-Ram, S., Yamada, K. M.** 2005. “Cell migration in 3D matrix”, *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 17, p. 524–532. DOI: 10.1016/j.ccb.2005.08.015.
10. **Zaman, M. H., Kamm, R. D., Matsudaira, P., Laufenburger, D. A.** 2005. “Computational model for cell migration in three-dimensional matrices”, *Biophysical Journal*, vol. 89, p. 1389–1397. DOI: 10.1529/biophysj.105.060723.
11. **Kinsey, S. T., Locke, B. R., Dillaman, R. M.** 2011. “Molecules in motion: influences of diffusion on metabolic structure and function in skeletal muscle”, *Journal of Experimental Biology*, vol. 214, p. 263–274. DOI:10.1242/jeb.047985.
12. **Riahi, R., Yang, Y. L., Kim, H., Jiang, L., Wong, P. K., Zohar, Y.** 2014. “A microfluidic model for organ specific extravasation of circulating tumor cells”, *Biomicrofluidics*, vol. 8, p. 024103. DOI: 10.1063/1.4868301.
13. **Wikswa, J. P., Curtis, E. L., Eagleton, Z. E., Evans, B. C., Kole, A., Hofmeister, L. H., Matloff, W. J.** 2013. “Scaling and systems biology for integrating multiple organs-on-a-chip”, *Lab on a Chip*, vol. 13, p. 3496–3511. DOI: 10.1039/c3lc50243k.
14. **Kuo, J. S., Chiu, D. T.** 2011. “Controlling Mass Transport in Microfluidic Devices”, *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 4, p. 275–296. DOI: 10.1146/annurev-anchem-061010-113926.
15. **Frost, T. S., Estrada, V., Jiang, L., Zohar, Y.** 2019. “Convection–diffusion molecular transport in a microfluidic bilayer device with a porous membrane”, *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 23, p. 114. DOI: 10.1007/s10404-019-2283-1.
16. **Korin, N., Gounis, M. J., Wakhloo, A. K., Ingber, D. E.** 2015. “Targeted Drug Delivery to Flow-Obstructed Blood Vessels Using Mechanically Activated Nanotherapeutics”, *JAMA Neurology*, vol. 72, p. 119-122. DOI: 10.1001/jamaneurol.2014.2886.
17. **Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., Bobryshev, Y. V.** 2017. “Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow”, *Acta Physiologica*, vol. 219, p. 382-408. DOI: 10.1111/apha.12725.
18. **Zhang, X., Jones, P., Haswell, S. J.** 2008. “Attachment and detachment of living cells on modified microchannel surfaces in a microfluidic-based lab-on-a-chip system”, *Chemical Engineering Journal*, vol. 135, p. 82-88. DOI: 10.1016/j.cej.2007.07.054.



19. **Plouffe, B. D., Njoka, D. N., Harris, J., Liao, J., Horick, N. K., Radisic, M., Murthy, S. K.** 2007. "Peptide-mediated selective adhesion of smooth muscle and endothelial cells in microfluidic shear flow", *Langmuir*, vol. 23, p. 5050-5055. DOI: 10.1021/la0700220.
20. **Plouffe, B. D., Kniazeva, T., Mayer, J. E., Murthy, S. K., Sales, V. L.** 2009. "Development of microfluidics as endothelial progenitor cell capture technology for cardiovascular tissue engineering and diagnostic medicine", *FASEB J.* vol. 23, p. 3309-3314. DOI: 10.1096/fj.09-130260.
21. **Sorescu, G. P., Sykes, M., Weiss, D., Platt, M. O., Saha, A., Hwang, J., Boyd, N., Boo, Y. C., Vega, J. D., Taylor, W. R., Jo, H.** 2003. "Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, p. 31128-31135. DOI: 10.1074/jbc.M300703200.
22. **Glen, K., Luu, N. T., Ross, E., Buckley, C. D., Rainger, G. E., Egginton, S., Nash, G. B.** 2012. "Modulation of functional responses of endothelial cells linked to angiogenesis and inflammation by shear stress: differential effects of the mechanotransducer CD31", *Journal of Cellular Physiology*, vol. 227, p. 2710-2721. DOI: 10.1002/jcp.23015.
23. **Stolberg, S., McCloskey, K. E.** 2009. "Can shear stress direct stem cell fate?", *Biotechnology Progress*, vol. 25, p. 10-19. DOI 10.1021/bp.124.
24. **Kshitz, K. K., Park, J., Kim, P., Helen, W., Engler, A. J., Levchenko, A., Kim, D. H.,** 2012. "Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments", *Integrative Biology*, vol. 4, p. 1008-1018. DOI: 10.1039/c2ib20080e.
25. **Panigrahi, P. K.** 2016. "Transport Phenomena in Microfluidic Systems", John Wiley & Sons, pp. 13-19. Print ISBN:9781118298411 |Online ISBN:9781118298428. DOI:10.1002/9781118298428
26. **Yuki, T., Masayuki, Y., Teruo, O., Takehiko, K., Kiichi, S.** 2006. "Evaluation of effects of shear stress on hepatocytes by a microchip-based system", *Measurement Science and Technology*, vol. 17, p. 3167. DOI: 10.1088/0957-0233/17/12/S08.
27. **Yildiz-Ozturk, E., Yucel, M., Yesil-Celiktas, O.** 2018. "A generic model for diffusive dynamics of the substrate and fluorescein tagged enzyme in microfluidic platform", *Microsystem Technologies*, vol. 24, p. 3095-3105. DOI: 10.1007/s00542-018-3746-0.
28. **Yildiz-Ozturk, E., Yucel, M., Muderrisoglu, C., Sargin, S., Yesil-Celiktas, O.** 2017. "Modelling coupled dynamics of diffusive-convective mass transfer in a microfluidic device and determination of hydrodynamic dispersion coefficient", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 80, p. 100-106. DOI: 10.1016/j.jtice.2017.08.033.
29. **Squires, T., Messinger, R., Manalis, S.** 2008. "Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors", *Nature Biotechnology*, vol. 26, p. 417-426. DOI: 10.1038/nbt1388.
30. **Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., Artursson, P.** 2007. "Determination of drug perme-



- ability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers”, *Nature Protocols*, vol. 2, p. 2111–2119. DOI: 10.1038/nprot.2007.303.
31. **Siyan, W., Feng, Y., Lichuan, Z., Jiarui, W., Yingyan, W., Li, J., Bingcheng, L., Qi, W.** 2009. “Application of microfluidic gradient chip in the analysis of lung cancer chemotherapy resistance”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 49, p. 806–810. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.12.021.
 32. **Malmstadt, N., Yager, P., Hoffman, A. S., Stayton, P. S.** 2003. “A smart microfluidic affinity chromatography matrix composed of poly (N-isopropylacrylamide)-coated beads”, *Analytical Chemistry*, vol. 75(13), p. 2943–2949. DOI: 10.1021/ac034274r.
 33. **Kim, T. H., Lee, J. M., Ahrberg, C. D., Chung, B. G.** 2018. “Development of the microfluidic device to regulate shear stress gradients”, *BioChip Journal*, vol. 12(4), p. 294-303. DOI: 10.1007/s13206-018-2407-9.
 34. **Yazdian Kashani, S., Keshavarz Moraveji, M., Bonakdar, S.** 2021. “Computational and experimental studies of a cell-imprinted-based integrated microfluidic device for biomedical applications”. *Scientific Reports*, vol. 11: 12130, p. 1-17. DOI: 10.1038/s41598-021-91616-2.
 35. **Calamak, S., Ulubayram, K.** 2019. “Controlled synthesis of multi-branched gold nanodendrites by dynamic microfluidic systems”, *Journal of Material Science*, vol. 54, p. 7541-7552. DOI: 10.1007/s10853-019-03403-0.
 36. **Barata, D., Spennati, G., Correia, C., Ribeiro, N., Harink, B., Blitterswijk, C.v., Habibovic, P., Rijt, S. v.**, 2017. “Development of a shear stress-free microfluidic gradient generator capable of quantitatively analyzing single-cell morphology”, *Biomedical Microdevices*, vol. 19: 81, p. 1-10. DOI: 10.1007/s10544-017-0222-z.
 37. **Rosa, P. M., Gopalakrishnan, N., Ibrahim, H., Haug, M., Halaas, Q.** 2016. “The intercell dynamics of T cells and dendritic cells in a lymph node-on-a-chip flow device”, *Lab on a Chip*, vol. 19, p. 1-14. DOI: 10.1039/c6lc00702c.
 38. **Zimmerman, W. B. J.** 2004. “COMSOL Process modeling and simulation with finite element methods”, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
 39. **Huang M., Fan, S., Xing, W., Liu, C.** 2010. “Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics”, *Mathematical and Computer Modelling*, vol. 52, iss. 11–12, p. 2036-2042. DOI: 10.1016/j.mcm.2010.01.024.
 40. **Hutmacher, D. W., Singh, H.** 2008. “Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture”, *Trends in Biotechnology*, vol. 26, iss. 4, p. 166-172. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.11.012.
 41. **Kleinstreuer, C.** 2010. “Basic Theory and Selected Applications in Macro- and Micro-Fluidics”, *Modern Fluid Dynamics*, Springer Netherlands, XVIII, 622, e-book ISBN: 978-1-4020-8670-0, 1.
 42. **Wong, J. F., Simmons, C.A., Young, E. W. K.** 2017. “Modeling and Measurement of Bi-

- omolecular Transport and Sensing in Microfluidic Cell Culture and Analysis Systems”, Modeling of Microscale Transport in Biological Processes, Elsevier Inc, p. 41-75.
43. **Nguyen, N. T., Wereley, S. T.** 2002. “Fundamentals and applications of microfluidics”, British Library Cataloguing in Publication Data, Artech House, Inc.
 44. **Byun, C. K., Abi-Samra, K., Cho, Y. K., Takayama, S.** 2014. “Pumps for microfluidic cell culture”, Electrophoresis, vol. 35, p. 245–257. DOI: 10.1002/elps.201300205.
 45. **Inamdar, N. K., Griffith, L. G., Borenstein, J. T.** 2011. “Transport and shear in a microfluidic membrane bilayer device for cell culture”, Biomicrofluidics, vol. 5, p. 022213. DOI: 10.1063/1.3576925.
 46. **Stone, S. D., Hollins, B. C.** 2013. “Modeling Shear Stress in Microfluidic Channels for Cellular Applications”, 2013 29th Southern Biomedical Engineering Conference, p. 117-118. DOI: 10.1109/SBEC.2013.67.
 47. **Glossop, J. R., Cartmell, S. H.** 2009. “Effect of fluid flow-induced shear stress on human mesenchymal stem cells: Differential gene expression of IL1B and MAP3K8 in MAPK signaling”, Gene Expression Patterns, vol. 9(5), p. 381-388. DOI: 10.1016/j.gep.2009.01.001.
 48. **Kreke, M. R., Goldstein, A. S.** 2004. “Hydrodynamic Shear Stimulates Osteocalcin Expression But Not Proliferation of Bone Marrow Stromal Cells”, Tissue Engineering, vol. 10, p. 5-6. DOI: 10.1089/1076327041348455.
 49. **Leclerc, E., David, B., Griscom, L., Lepioufle, B., Fujii, T., Layrolle, P., Legallais, C.** 2006. “Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment”, Biomaterials, vol. 27, iss. 4, p. 586-595. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.002.
 50. **Leclerc, E., Kirat, K. E., Griscom, L.** 2008. “In situ micropatterning technique by cell crushing for co-cultures inside microfluidic biochips”, Biomedical Microdevices, vol. 10, p. 169–177. DOI: 10.1007/s10544-007-9122-y.
 51. **Hung, P. J., Lee, P. J., Sabounchi, P., Aghdam, N., Lin, R., Lee, L. P.** 2005. “A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array”, Lab on a Chip, vol. 5, p. 44-48. DOI: 10.1039/b410743h.
 52. **Brown, A., Meenan, B. J.** 2007. “Investigating the Effects of Fluid Shear Forces on Cellular Responses to Profiled Surfaces in-vitro: A Computational and Experimental Investigation”, Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS Cité Internationale, Lyon, France August 23-26, 2007. DOI: 10.1109/IEMBS.2007.4353560.
 53. **Maguire, T., Usta, O. B., Yarmush, M. L.** 2011. “Computational Fluid Dynamic Analysis of a Cell-based Microfluidic Drug Screening Platform”, Nano Life, vol. 01, p. 03n04. DOI: 10.1142/S1793984410000201.
 54. **Tourlomousis, F., Chang, R. C.** 2014. “Computational Modeling of 3D Printed Tissue-on-a-Chip Microfluidic Devices as Drug Screening Platforms”, ASME 2014 Inter-



national Mechanical Engineering Congress and Exposition, Vol. 3: Biomedical and Biotechnology Engineering, IMECE2014-38454, V003T03A038; 9 pages, ISBN: 978-0-7918-4646-9. DOI: 10.1115/IMECE2014-38454.

55. **Tourlomousis, F., Chang, R. C.** 2015. “2D and 3D Multiscale Computational Modeling of Dynamic Microorgan Devices as Drug Screening Platforms”, ASME 2015 International Mechanical Engineering Congress and Exposition, Vol. 3: Biomedical and Biotechnology Engineering, IMECE2015-52734, V003T03A051; 10 pages, ISBN: 978-0-7918-5738-0. DOI: 10.1115/IMECE2015-52734.
56. **Kohl, Y., Biehl, M., Spring, S., Hesler, M., Ogourtsov, V., Todorovic, M., Owen, J., Elje, E., Kopecka, K., Moriones, O. H., Bastús, N. G., Simon, P., Dubaj, T., Rundén-Pran, E., Puentes, V., William, N., von Briesen, H., Wagner, S., Kapur, N., Mariussen, E., Nelson, A., Gabelova, A., Dusinska, M., Velten, T., Knoll, T.** 2021, “Microfluidic In Vitro Platform for (Nano)Safety and (Nano)Drug Efficiency Screening”, *Small*, vol. 17, 2006012, p. 1-15. DOI: 10.1002/sml.202006012.
57. **Ahmed, F., Yoshida, Y., Wang, J., Sakai, K., Kiwa, T.** 2021. “Design and validation of microfluidic parameters of a microfluidic chip using fluid dynamics”, *AIP Advances*, vol. 11, iss. 7, p. 075224. DOI: 10.1063/5.0056597.