Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi, Cilt 22, Sayı 1, 2017 ARAŞTIRMA

DOI: 10.17482/uumfd.305203

ÇOK FAZLI SİSTEMLERDE HÜCRE AYRIŞTIRILMASI

Özge AKBULUT [*]

Alınma: 26.09.2016; düzeltme: 17.02.2017; kabul: 22.02.2017

Öz: Bu çalışma, çok fazlı polimer sistemlerinde, nanoparçacık ihtiva eden insan servikal kanser HeLa hücrelerinin, hücreler arasındaki yoğunluk farkına dayanılarak ayrıştırılması üzerinedir. Sulu çok fazlı sistemler, suda çözünen polimer ve/veya sürfaktanların çeşitli kombinasyonlarının karıştırılmasını takiben faz ayrışmasıyla oluşur. Sistemin fazları yoğunluklarına göre üst üste dizilirler ve birbirine komşu her iki fazın arasında yoğunluk-adımı olarak hareket edebilen bir interfaz bulunur. Bu interfaz, nesneleri yakalayabilecek bir bariyer görevi görür ve faz ayrışmasıyla oluştuğu için kararlıdır. Bu sistemler hazırlandıktan ve ayrıştırma için eniyilendikten sonra, hücrelerin sisteme eklenmesi ve sentrifügasyon yardımı ile ayrıştırma sağlanır. Bu çalışmada, altın nanoparçacıklarıyla kontrollü şekilde etkileşen HeLa hücrelerinin, yoğunluklarındaki değişime istinaden, sulu çok fazlı sistemlerde ayrıştırılmaları gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çok fazlı sistemler, hücre ayrıştırması.

Cell Separation with Aqueous Multiphase Systems

Abstract: This study investigates the use of multiphase systems for density-based separation of cervical cancer HeLa cells that contain nanoparticles. Aqueous multiphase systems (MuPSs) are prepared by mixing the various combinations of water-soluble polymers and/or surfactants followed by phase separation. The phases of the system are sorted according to their density and in between neighboring phases there exists an interface that can act as a step-in-density. This interface is also thermodynamically stable since it is formed through phase separation. Subsequent to preparation and optimization of these systems, cells are added to the systems and separation of cells is achieved through centrifugation. In this work, the separation of HeLa cells that interacted with gold nanoparticles, hence experienced a change in their density, was demonstrated.

Keywords: Multiphase systems, cell separation.

1. GİRİŞ

Günümüzde, yoğunluk-bazlı ayrıştırmalar için "yoğunluk gradyent sistemleri" kullanılmaktadır (Ren ve diğ., 2015). Yoğunluk gradyent sistemlerinin kullanımı; bakteri, tek hücreliler ve hatta karbon nanotüplerin ayrılması (Mortimer ve diğ., 2016) ve yüzey gerilimi modelleme çalışmalarında (Liang ve diğ., 2016) önemli bir rol oynamaktadır. Bu sistemler, tek bir çeşit kimyasalın çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltilerinin üst üste eklenmesi ile hazırlanır. Farklı konsantrasyondaki çözeltiler farklı yoğunlukta oldukları için üst üste konulmuş iki çözelti arasında bir yoğunluk-adımı oluşmaktadır. Her ne kadar kullanım alanları yaygın olsa da, bu sistemler, termodinamik olarak kararlı değillerdir; dolayısıyla oluşturulan yoğunluk-adımı zamanla özelliğini kaybeder. Bu durum hem ayrıştırmanın kalitesinin düşmesine hem de ayrıştırmadan sonra örneklerin toplanmasında zorluk yaşanmasına sebep olur. Ayrıca, hücre

[*] Sabancı Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Malzeme Bilimi ve Nano Mühendislik Bölümü, Orhanli - Tuzla, 34956 Istanbul, Türkiye
İletişim Yazarı: Özge Akbulut (ozgeakbulut@sabanciuniv.edu)

ayrıştırmalarında, sükroz gradyent sistemlerinin, stres proteinlerinin salınımını da etkilediği düşünülmektedir (Henderson ve Pockley, 2012). Bu sebeplerden dolayı, kararlı, saklanabilir, kolaylıkla hazırlanabilir yoğunluk-adımlarından oluşan ve güvenilir ayrıştırmaların önünü açacak sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Sulu çok fazlı sistemler faz ayrışmasıyla oluştukları için termodinamik olarak kararlıdırlar, fazların arasında oluşan interfaz moleküler seviyede bir yoğunluk adımı sağlar (Mace ve diğ., 2012). Çok fazlı sistemlerin hazırlanması bir matriks baz alınarak yapılmaktadır. Örneğin, A, B ve C suda çözünen kimyasallar iken; eğer A/B, B/C ve A/C iki-fazlı sistemler oluşturuyorsa, A/B/C sisteminin 3-fazlı olması beklenmektedir. Bu liste ayrıştırmaların yapılabileceği sistemlerin genişliğini göstermesi açısından önemlidir. Mace ve diğ., (2012)'nin çalışmasında 23 polimer ve 11 sürfaktan kullanılarak, birbirleriyle faz ayrışmasına gidip gitmeyecekleri gözlenmiştir (561 adet ikili karışım denemiştir). Yine bu çalışmada gösterilmiş olan 5-fazlı sistem, poli(etil oksazolin) (PEOZ), poli(etilen glikol) (PEG), Fikol, Dekstran ve poli(vinil alkol) (PVA) polimerlerinin karıştırılmasını takiben faz ayrışmasıyla oluşturulmuştur. Bu sisteme 6 adet yoğunluk-standardı boncuk eklenmiştir. Boncuklar yoğunluklarını çevreleyen interfazlara yerleşmişlerdir. Bu sistemlerde fazlar yoğunluklarına göre dizildikleri için üst üste iki faz arasında yer alan interfaz bir yoğunluk-adımı gibi hareket edebilmekte ve maddeleri yoğunluklarına göre tutabilmektedir. Özetle, interfazlar moleküler seviyede belirgin yoğunluk adımları oluştururlar ve mekanik olarak sarsıldıklarında başlangıçtaki özelliklerine sahip olacak şekilde kendiliğinden tekrar oluşabilirler. Bu özellikleriyle, yoğunluk gradyent sistemlerine göre daha üstün davranırlar. Homojen hücre popülasyonları elde etmek için çok fazlı sistemlerde biyolojik kökenli nesnelerin yoğunluk-temelli ayrıştırılması da bu sebeple önemli bir konudur (Kumar ve diğ., 2014).

Çok fazlı sistemlerin kararlı yoğunluk-adımları olarak değerlendirilmeleri tamamıyla yenidir (Mace ve diğ., 2012a, Mahmoudi ve diğ., 2012 ve Akbulut ve diğ., 2011). Bu sistemlerin kararlılıkları başka sistemlerin gösteremeyeceği, 1) nesneleri aralarında 1 mg/cm^3 yoğunluk farkına kadar ayrıştırabilme, 2) istenen hacimde ve kolay hazırlanma ve 3) önceden hazırlanıp saklanabilme gibi özelliklere sahip olmalarını sağlar. Bu nedenle, hücre ayrıştırması için bu sistemlerin kullanılması uygun görülmüştür.

Hücre bölündükten sonra büyürken yoğunluk değişime uğrar (Cooper, 2000 ve Shortman ve diğ., 1967); çok fazlı sistemlerin fazları bu yoğunluk farkını ayrıştırabilecek yoğunluk-adımlarını (interfaz) ihtiva edecek şekilde oluşturulmuş ve istatistiksel veri analizinin yapılmasını sağlayabilecek hacimde ayrıştırma yapılmıştır. Daha sonra, bu hücreler nanoparçacıklarla etkileşerek yüksek işlem hacmiyle ve herhangi bir işaretleme gerekmeden (flüoresan veya manyetik gibi) yoğunluk-bazlı ayrıştırılmıştır. Canlı-kökenli malzeme ayrıştırması için bu sistemlerin pH değerinin, ozmolaritesinin, yoğunluklarının fizyolojik koşullara benzeyecek şekilde eniyilenmesi gereklidir. Bu çalışmada, hücrelerin ayrıştırıldıktan sonra yaşayabilirlikleri de incelenmiştir. Hücre zarının bu işlem sonunda zarar görüp görmediğine bakılmıştır.

Hücreleri kimyasal metotlarla senkronize etmek hücre fonksiyonlarında değişikliğe yol açabileceği için tercih edilmemektedir. Bu çalışmada kullanılan HeLa hücreleri, genetik olarak farklılaştırılmış; hücrelerin, hücre döngüsü değişimlerini gösterecek antifaz salınımlı proteinler (antiphase oscillating proteins) salgılamaları sağlanmıştır (Shang ve diğ., 2014 ve Sakaue-Sawano ve diğ., 2008). Bu proteinler, hücrelerin G1 fazındaki çekirdeğini kırmızıya ve S/G2'deki çekirdeğini yeşile boyamaktadırlar. G1'den S'e geçerken sarı renk de gözlenmektedir, M fazı ise renksizdir.

Bir diğer ayrıştırma ise nanoparçacıklarla etkileşmiş hücrelerin içerdikleri nanoparçacık miktarıyla orantılı olarak değişen yoğunluklarına göre sınıflandırılmasıdır. Yakın gelecekte nanoparçacıkların gerek hastalık tanısı koymada gerek hastalık tedavisinde sıklıkla kullanılması öngörülmektedir (Kimling ve diğ., 2006). Son zamanlarda öne çıkan nanotoksikoloji

konusundaki araştırmalar da bu tür sınıflandırmalara ihtiyaç duymaktadır (Pappas ve diğ., 2007 ve Chithrani ve diğ., 2007).

Sonuç olarak, hücre ayrıştırmasının, ekonomik, her laboratuvarda bulunan ekipmanlarla yapılabilecek ve kolay kullanılabilir metotlara ihtiyacı vardır. Varolan metotlar ya pahalıdırlar ya da performansları düşüktür. Her ne kadar tek fazlı gradyent sistemlerinde hücre ayrıştırması daha önce çalışılmışsa da, bu yöntem fazlar arasındaki yoğunluk aralığının fazla olması sebebiyle hücre yaşam döngüsü kontaminasyonunu engelleyememiştir. Böylece toplanan hücrelerde başka döngülerden hücrelere rastlanma riski artmıştır. (Everson ve diğ., 1973). Bu sorun, birden fazla polimer kullanılarak oluşturulan ve yoğunluk aralıkları istenilen sıklıkta ayarlanabilen çok fazlı sistemlerle giderilmiştir. Çok fazlı sistemler yüksek hacim ve hassaslıkta hücre ayrıştırmasına olanak sağlamıştır, bu da daha önce yapılamayan sınıflandırmalara erişilmesine imkân vermektedir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. HeLa Hücre Kültürü

2.1.1. Sisplatin ile Hücre Döngüsü Belirleme

Ayrıştırma yapılacak HeLa hücrelerinin hücre döngüsünün hangi fazında olduğunun bulunması için işlem görmemiş hücreler üzerinde flüoresan-aktivasyonlu hücre sınıflandırması (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) yapılmıştır. HeLa hücreleri 48 saat boyunca, % 10 FBS (fetal bovine serum)(Sigma-Aldrich), 2 mM glutamin (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penisilin (Sigma-Aldrich) ve 10 µg/ml streptomisin (Sigma-Aldrich) eklenmiş DMEM'de (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich), %5 CO_2 inkübatöründe 37°C'de büyütülmüştür. 1×10^6 hücre 0.5 µM sisplatine maruz bırakılarak, hücrelerin G2 fazında durdurulmaları sağlanmıştır (Hu ve diğ., 2017, Sui ve diğ., 2016). Daha sonra HeLa hücreleri, FACS işlemi için 1000 rcf'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür. 1.5 mL'lik santrifüj tüpünün dibindeki çökmüş hücreler, 2 defa HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Sigma-Aldrich) ile yıkanmıştır. Bu yıkama sonucunda 300 µl su ile FACS ile hücre döngüsü ayrıştırması gerçekleştirilmiştir.

2.1.2. Altın Nanoparçacık Uygulanması

Sentezi ve karakterizasyonu tamamlanmış altın nanoparçacıklar, HeLa hücrelerine yaşam besiyerlerinde, belirli konsantrasyon ve zaman parametreleriyle uygulanmıştır (Khan ve diğ., 2007). Daha sonra ayrıştırma sistemine katılmak üzere tripsin (Sigma-Aldrich) ile bağlı oldukları petri kabından ayrılıp satrifüjlenerek sisteme eklenmişlerdir.

2.1.3. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Çalışması

Hücreler yıkandıktan sonra, canlılıkları tripan mavisi (Sigma-Aldrich) boyasını içlerine alıp almamalarına göre değerlendirilmiştir; bu boya hücre zarının sağlamlığını test etmek için kullanılır. Hücreler zarlarında bir bozulma yoksa bu boyayı içlerine almazlar (Strober, 2001). Bu değerlendirme ışık mikroskobuyla yapılmıştır.

2.1.4. MTT ile Hücre Canlılığı Çalışması

Altın nanoparçacıkların HeLa hücrelerindeki sitotoksisitesi, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetazolyum bromid)) (MTT) canlılık testi ile gösterilmiştir (Chauhan ve diğ., 2017). Bu testte, formazan MTT molekülünün hücredeki mitokondriyal aktiviteye bağlı olarak enzimatik azalma sebebiyle kolorimetrik ölçümü yapılmaktadır. 96 kuyucuklu plakada HeLa hücreleri, kuyucuk başına 10,000 hücre yoğunluğunda ekilerek 37°C, %5 CO_2 inkübatörde 24 saat boyunca büyümeye bırakılmıştır. Daha sonra, zamana bağlı (1, 3 ve 6 saatlik) ve azalan konsantrasyonlarda (0.6 nM, 1.2 nM, 3 nM, 4.8 nM ve 6 nM) altın nanoparçacık uygulaması yapılarak 10 µm MTT solüsyonu (Sigma-Aldrich) eklenerek tekrar 2 saat inkübe edilmişlerdir. Bu inkübasyonun ardından, sisteme deterjan solüsyonu (Sigma-Aldrich) eklenmiş, karanlıkta 2

saat beklenilmiş ve mikroplaka okuyucuda absorbans değerleri 630 nm ve 570 nm'de ölçülmüştür. Nanoparçacık uygulaması yapılan hücrelerin absorbans değerleri, yapılmamış olanlarla kıyaslanmıştır.

2.2. Nanoparçacık Sentezi ve Karakterizasyonu

2.2.1. Altın Nanoparçacık Sentezi

Hücrelerle etkileştirmek için altın nanoparçacıklar literatürde uzun yıllardır bulunan Turkevich metoduna göre sentezlenmiştir (Kimling ve diğ., 2006); parçacıkların stabilitesi ve biyo uyumluluğu göz önünde bulundurularak, sitrat kaplı parçacık sentezlenmesine karar verilmiştir. Özetle, 0.3 mM kloroaurik asit 20 mL distile suda çözülmüştür. Suyun kaynama sıcaklığına ısıtılan solüsyona 28.8 mM 2 mL trisodyum sitrat hızlıca eklenmiştir. Sitrat tuzu eklenmesiyle solüsyonun siyah renkten saydamlaşması, sonraki 30 dakika içinde de koyu kırmızı bir renge ulaşmasıyla sentezin başarılı olduğu doğrulanmıştır.

2.2.2. Altın Nanoparçacık Karakterizasyonu (DLS, UV-Vis Spektroskopsi)

Parçacıkların kantitatif olarak boyut analizinde dinamik ışın saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) kullanılmıştır. Ekstinksiyon katsayısı, dinamik ışık saçılma ölçümü ile elde etmiş olduğumuz parçacık boyutu verisi ve spektroskopide görünen parçacık dalga boyu sonuçları birleştirilerek, literatürde Lambert – Beer yasası ile analizlenmiş olan ekstinksiyon katsayısı 1.07×10^{-9} mol/L ile absorbans – konsantrasyon eğrisi baz alınarak (Haiss ve diğ., 2007) solüsyondaki altın nanoparçacık konsantrasyonu hesaplanmıştır (Liu ve diğ., 2007). Hücrelere uygulanan optimal konsantrasyon seçimi yine literatürden değerlendirilerek, kademeli dilüsyonla hedef nanoparçacık miktarı UV-Vis spektroskopisi (Shimadzu, UV-3150, Kyoto, Japan) ile MTT deneyleri için belirlenmiştir (Lee ve diğ., 2009). Alınan sonuçlara göre hücrelerin 3 nM nanoparçacık solüsyonuna 3 saat maruz bırakılmasına karar verilmiştir.

2.3. Polimer Solüsyonlarının Hazırlanması

Hücrelerle etkileşmesinde sorun olmayan polimerler/sürfaktanlar belirlenmiştir. Bunun için fizyolojik pH ve uygun ozmolaritedeki polimer ve sürfaktan çözeltilerinde (herhangi bir ayrıştırma amacı olmaksızın) hücreler bir süre santrifüjlenerek bekletilmiştir. Daha sonra tripan mavisi boyaması ile canlılık testi yapılmıştır. Fikol, Dekstran ve PVP (poli(vinil prolidon)) farklı konsantrasyonlarda suda çözülerek, polimer solüsyonları hazırlanmıştır. Polimer solüsyonlarının ozmolaritesi sodyum klorür solüsyonu ilavesiyle, pH değerleri ise hidroklorik asit veya sodyum hidroksit solüsyonlarının ilavesiyle ayarlanmaktadır. Sisteme bir kimyasal kullanmak yerine su eklenerek, yoğunluk adımlarının aralıkları ayarlanmıştır. Ozmolarite ve yoğunluk ölçümleri yapılarak, hücrelerin eklendiğinde fizyolojik ortamlarına yakın bir sistem oluşturulması sağlanmıştır. Böylece tek fazlı, iki fazlı ve çok fazlı ayrıştırma sistemleri oluşturularak, HeLa hücrelerinin yoğunlukları belirlenmiştir.

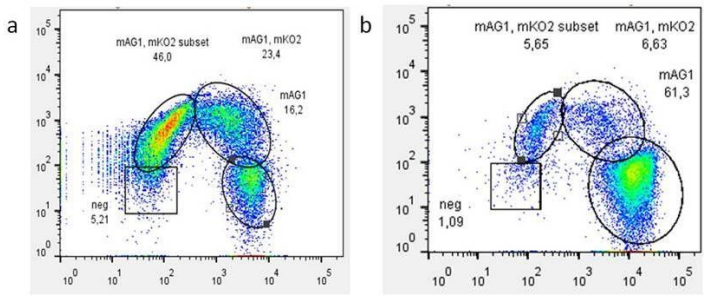
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1.Flüoresanla Modifiye Edilmiş HeLa Hücrelerine Ulaşılması

Miyawaki (2008) grubunun genetik olarak değiştirilerek hücre döngüsü değişimlerini gösterecek antifaz salınımlı proteinler salgılayan HeLa hücrelerinin kullanılmasıyla başka bir işaretlemeye gerek duymadan hücrelerin sınıflandırılması imkanı doğmuştur. Modifiye edilmiş hücreler G1 fazında kırmızı, G1–S fazı arasında sarı, diğer fazlarda ise yeşil renkte görülmektedir. Hücre modifikasyonunun yapıldığı makalede (Sakaue-Sawano ve diğ., 2008) flüoresan-aktivasyonlu hücre sınıflandırmasında farklı hücre fazlarındaki hücreler gösterilmiştir (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS).

Elde edilen modifiye edilmiş hücrelerin büyüme performansının takip edilmesi için, hücre DNA'sına çapraz bağlanarak, hücre ölümüne sebep olan bir kemoterapi ilacı olan sisplatin

değişen miktarlarda 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Şekil 1'de sisplatin ilacına maruz kalan hücrelerin, FACS sonuçları görülmektedir. FACS sonuçları ilaçtaki artışla görülen hücre sayısındaki azalmayı ve hücrelerin bölünmelerine engel olunmasını göstermektedir. Normal hücre düngüsüne sahip HeLa hücrelerinin bir kısmı kontrol örneği olarak bırakılarak, diğer kısmı ise 0.5 μM sisplatine maruz bırakılarak, hücrelerin G2 fazında durdurulmaları sağlanmış; bu sayede hücre döngüsü ve FACS ayrıştırma optimizasyonu yapılmıştır.



Şekil 1:
a) HeLa hücrelerinin başlangıç dağılımı, b) 0.5 μM sisplatinle etkileşen hücrelerin dağılımı; hücreler beklenildiği gibi G2 fazında kalmışlardır.

3.2. Hücrelerin Polimer Sistemleriyle Ayrıştırma Çalışmaları

HeLa hücrelerini ayrıştırma için Fikol-Dekstran-PVP polimer sistemi kullanılmıştır. Sistemlerin yoğunluğu sistemi oluşturan kimyasalların konsantrasyonu değiştirilerek veya su yerine D_2O ve suda çözünen tuzlar eklenerek yapılabilir (Mace ve diğ., 2012). Bu gibi sonradan eklenen kimyasallar, her faza eşit dağılmadıkları için sistemlerin yoğunlukları hassasiyetle ayarlanabilir. Ancak, biyolojik ayrıştırmaların yapılacağı sistemlerde bu iki metodu da kullanmak mümkün değildir (Waber ve Sakai, 1974, Rothstein ve diğ., 2006). Canlı hücrelerin canlılığını korumak, ayrıştırma işleminde önem taşımaktadır. Bu sebeple, sistemin yoğunluğu için su ve 3 farklı polimer kullanılarak istenilen yoğunluk aralığında iki fazlı sistem elde edilmiştir. Bu sayede hassas yoğunluk adımlarına sahip çok fazlı sistemlerde, hücre döngüsünün farklı evrelerindeki hücreler ayrıştırılabilmiştir.

PEOZ, PEG ve PVP, Fikol-Dekstran çözeltisine değişen miktarlarda eklendiğinde, 3. bir faz oluşturmamakta, ancak her iki fazın da yoğunluğunu arttırabilmektedir. Öncelikle, hücrelerin bu polimerlerin varlığında nasıl davrandığı incelenmiştir. PEOZ bulunan solüsyonlara maruz kalan hücreler tripan mavisi ile boyandığında hücrelerin boyayı içlerine aldıkları dolayısıyla hücre zarı bütünlüğünün bozulduğu tespit edilmiştir. PEG'de ise istenen ozmolarite seviyelerine ulaşmakta problem yaşanmıştır. PVP'de hücrelerin granüleritelerinde ufak bir artış gözlemlenmiş ve pH ayarlaması esnasında daha fazla sodyum hidroksit kullanılması gerekmiştir.

Bu durumda, ayrıştırmaya ve hücre canlılığına önemli bir etkide bulunmadığı için PVP'nin kullanılması uygun görülmüştür. Çok fazlı sistemlerin en güçlü yönü, fazlar arasındaki yoğunluk farkının çok az olabilmesi ve bu sayede ayrıştırmanın çözünürlüğünün yükselmesidir. Ancak, PVP ile yoğunluğu arttırma esnasında alt ve üst faz arasındaki fark da açılmıştır. Tablo 1'de PVP eklenen Fikol-Dekstran sistemlerinin alt ve üst faz yoğunluğu verilmektedir. Sistemi hazırlamak için kullanılan solüsyonların içindeki polimer miktarları Fikol %21, Dekstran %20 ve PVP %30 şeklindedir.

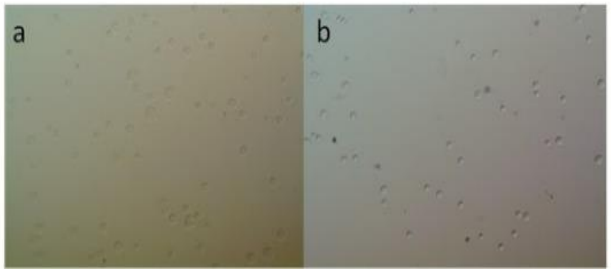
Fikol-Dekstran farklı oranlarda kullanılarak yoğunluk farkı azaltılmaya çalışılmış, gerektiğinde su da eklenerek iki fazın yoğunluğunun birbirine yakınlaşması sağlanmıştır (Tablo 1). Tablo 1'in 2–5 sütunları sistemin tamamında sırasıyla Fikol, Dekstran, PVP ve suyun hangi oranda olduğunu belirtmektedir. Örneğin üçüncü sıradaki sistem, 1 mL Fikol, 1.5 mL Dekstan,

1 mL PVP ve 0.5 mL su karıştırılarak hazırlanmıştır. Faz ayrışmasından sonra, alt ve üst fazın yoğunlukları ölçülmüştür (Anton-Paar DMA 35). Bu metotla istenilen yoğunluk seviyesinde ve yoğunluklukları birbirine yakın olan iki fazdan oluşan bir sistem hazırlanabilmiştir; "*" ile gösterilen sıralardaki yoğunluk oranları ayrıştırma deneylerinde kullanılmıştır.

Tablo 1. Fikol-Dektran sistemine PVP eklendikten sonraki alt ve üst faz yoğunluğu

Üst/Alt Faz Yoğunluğu gr/cm^3	Fikol (%21)	Dekstran (%20)	PVP (%30)	H_2O (mL)
1,045/1,059	1	1	1	-
*1,048/1,050	1	1,5	1	-
*1,049/1,051	1	1,5	1	0,5
1,052/1,059	1,2	1,2	1	0,1
*1,050/1,052	1,5	1	1	0,5
1,047/1,050	1,2	1,2	1	0,5

Literatürde, uzun yıllardan beri kullanılan HeLa hücrelerinin yaşaması için en iyi ozmolaritenin 290±15 mOsm aralığı ve en iyi pH'ın da 7.4 olduğu belirtilmektedir (Stubblefield ve Mueller, 1960)—bu değerler kan için de aynıdır (Stadler ve diğ., 2008). Bu ozmolarite ve pH'taki polimer solüsyonunda santrifüjlenen HeLa hücrelerinin yaşayıp yaşamadığı tripan mavisi ile boyanarak tespit edilmiştir. Bu çalışma, ayrıştırmada kullanılan bütün polimerler için yapılmıştır. Şekil 2a'da hücrelerin Fikole maruz bırakılmadan önceki Şekil 2b'de ise sonraki halleri görülmektedir. Işık mikroskopisinde gözle yapılan sayımlarda hücrelerin %95–99 oranında yaşadıkarı tespit edilmiştir.



Şekil 2:
HeLa hücrelerinin Fikole a) maruz bırakılmadan, b) maruz bırakıldıktan sonraki tripan mavisiyle boyanmasının ışık mikroskopisiyle görüntüleri

Elde edilen HeLa hücrelerinin yoğunlukları laboratuvarımızda empirik olarak belirlenmiştir. Hücreler yoğunluğu bilinen Fikol solüsyonunda, 2000 rcf'de 1 saat santrifüjlenmiştir. Hücreler yoğunluğu 1.048 gr/cm^{3}olan %17 Fikol solüsyonunda çökmüşlerdir, %18.5 Fikol içeren ve yoğunluğu 1.053 gr/cm^{3}olan solüsyonun içinde ise ilerleyememişlerdir. 1.048–1.053 gr/cm^3 aralığında ise bir kısım hücrenin solüsyonda ilerleyemediği bir kısmının asılı kaldığı, bir kısmının ise çöktüğü gözlemlenmiştir.

HeLa hücrelerini farklı fazlardaki gruplarına göre ayrıştırmak için gerek hücre yoğunluklarının yakalanması gerekse hücrelere zarar vermedikleri için Fikol-Dekstran sistemi seçilmiştir. Bu sistemlerin hazırlanması için farklı konsantrasyondaki (ağırlık/hacim) Fikol ve Dekstran çözeltileri karıştırılıp, faz ayrışmasından sonra alt ve üst fazların yoğunlukları ölçülmüştür. HeLa hücrelerinin ayrıştırılması için üst fazının yoğunluğu 1.048–1.059 gr/cm^3 ve alt fazının yoğunluğu 1.049–1.062 gr/cm^3 arasında değişen sistemler hazırlanmıştır. Tablo 2'de

ağırlık/hacim yüzdeleri verilen Fikol ve Dekstran sistemlerinin faz ayrıştırmasından sonraki alt ve üst fazlarının yoğunlukları verilmektedir.

Tablo 2. Fikol (%16– 20) ve Dekstran (%16–20) iki fazlı sistemlerinin alt/üst faz yoğunlukları (gr/cm^3)

Üst/Alt Faz Yoğunluğu gr/cm^3	Fikol (%16)	(%17)	(%18)	(%19)	(%20)
Dekstran (%16)	1,048/1,049	1,049/1,050	1,050/1,053	1,051/1,053	1,051/1,064
(%17)	1,049/1,050	1,051/1,052	1,051/1,054	1,053/1,054	1,053/1,056
(%18)	1,051/1,052	1,052/1,053	1,053/1,057	1,054/1,057	1,055/1,058
(%19)	1,052/1,054	1,053/1,055	1,055/1,059	1,057/1,059	1,057/1,060
(%20)	1,054/1,056	1,055/1,057	1,057/1,062	1,059/1,061	1,059/1,062

3.3. Altın Nanoparçacıkların Ayrıştırma Üzerindeki Etkileri

3.3.1. Altın Nanoparçacık Sentez Ve Karakterizasyonu

Öncelikle, altın nanoparçacıkların HeLa insan servikal kanser hücreleri üzerindeki sitotoksisite değenlendirilmesi yapılmıştır. Altın nanoparçacıklar, diğer nanoparçacıklara göre daha biyo uyumlu oldukları için tercih edilmiştir (Geha ve diğ., 1973). Dinamik ışın saçılımı deneyleri sonucunda sitrat kaplı altın nanoparçacıkların ortalama hidrodinamik çapı 18 nanometre olarak bulunmuştur. Bundan daha büyük boyuttaki parçacıklar, flüoresan molekülünden daha fazla emisyon yapacakları için FACS verilerinin etkileneceği düşünülmüş; deneyler ilk aşamada sadece bu parçacık boyutuyla yapılmıştır.

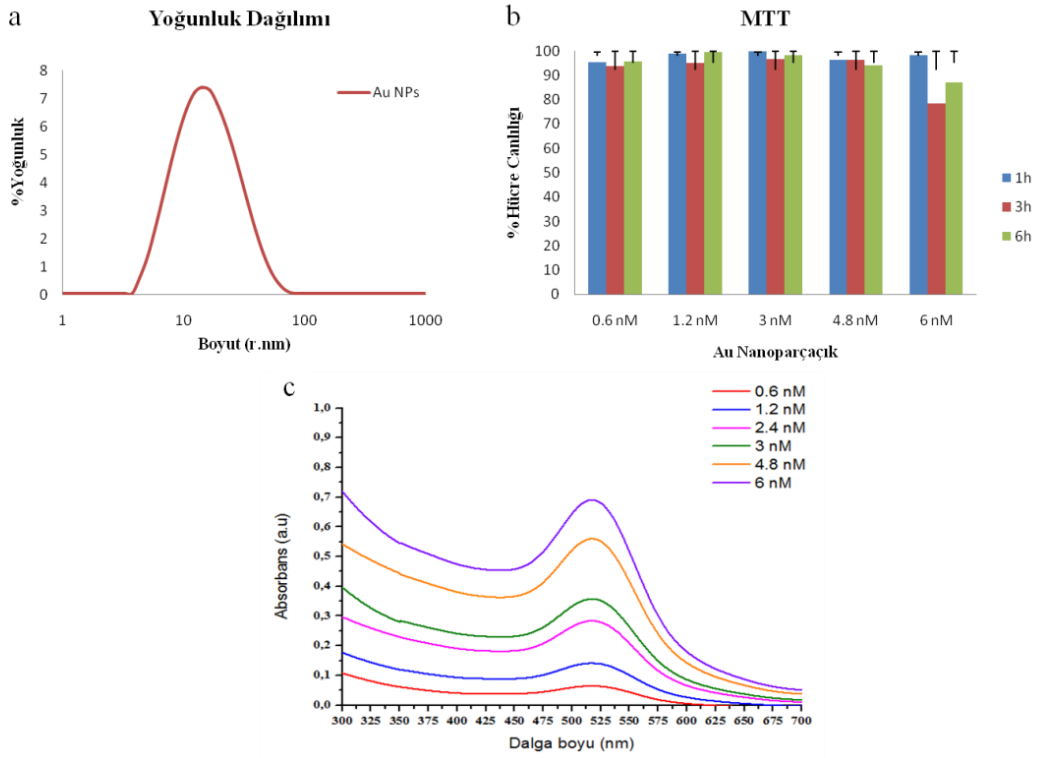
Nanoparçacıkların boyutları hücre membranından nasıl geçeceğini doğrudan etkilemektedir. Hücreler, bu nanoparçacıkların boyutlarına göre hücre dışı sıvıdan fagositoz, pinositoz ve makropinositoz ile hücreye kabul edilmektedir (Everson ve diğ., 1973). Altın nanoparçacıklar literatürde HeLa hücreleri ile sıklıkla etkileşime sokulmuştur (Fratoddi ve diğ., 2015). 20–80 nm boyutundaki altın nanoparçacıklarla etkileştirilen HeLa hücrelerinin, parçacık boyutu arttıkça hücrelerin daha az parçacık aldığı görülmüştür (Pappas ve diğ., 2007). 14–100 nm boyut aralığındaki altın nanoparçacıklarda 50 nm boyutunda en yüksek hücreye alınım gözlenmiştir (Markx, 1994); ancak 15–25 nm boyutundaki parçacıklar daha az sitotoksisite yaratmaktadır (Hartwell, 1970). Hücrelerin tiplerine ve hücre döngüsüne göre nanoparçacıkların hücrelere giriş miktarının değiştiği de bilinmektedir. Dinamik ışın saçınımı deneyi ile parçacık boyutları gözlemlenmiştir (Şekil 3a).

Kademeli dilüsyon ile MTT hücre canlılık testleri (Şekil 3b) ve UV-VIS spektroskopi absorbans değerleri (Şekil 3c) sonucunda hücrelerin 3 nM nanoparçacık solüsyonuna 3 saat maruz bırakılmasına karar verilmiştir. HeLa hücreleri yoğunluğu ayarlanmış Fikol solüsyonlarında (tek fazlı sistem), 1700 rcf'de 50 dakika santrifüjlenerek, yoğunluk ayrıştırma deneyleri yapılmıştır. FACS deneyleri sonucu farklı hücre döngüsünün farklı fazlarındaki ayrıştırma yüzdeleri belirlenmiştir.

3.3.2. Nanoparçacıklarla Etkileşmiş Hücrelerin Tek Fazlı Sistemlerde Ayrıştırma Çalışmaları (FACS)

Daha önceki çalışmalarda HeLa hücrelerinin yoğunluğunun 1.048–1.052 gr/cm^3 aralığında olduğu tespit edildiği için tek fazlı deneylerde 1.046, 1.048 ve 1.050 gr/cm^3 yoğunluğuna sahip Fikol çözeltileriyle çalışılması uygun görülmüştür. Yoğunluğu düşük olan 1.046gr/cm^3

sisteminde, nanoparçacıklarla etkileşmiş hücrelerin tamamı kabın altına inerken (alt int.), yoğunluğu 1.048 ve 1.050 gr/cm^3 sistemlerde parçacıkların bir kısmı üstte (üst int.) kalmışlardır. İnterfaz olarak belirtilen kısım ise iki polimer fazının arasındaki yerdir.



Şekil 3:

a) Dinamik ışın saçınımı ile altın nanoparçacık boyutu tespiti, b) Farklı konsanstrasyondaki nanoparçacıklara maruz bırakılan HeLa hücrelerinin zamana bağlı sitotoksisite deney sonuçları, c) Sentezlenen nanoparçacıkların konsantrasyonun tayini için yapılan UV-Vis spektroskopisi

Tablo 3. Farklı miktarda Fikol içeren çözeltilerin yoğunlukları

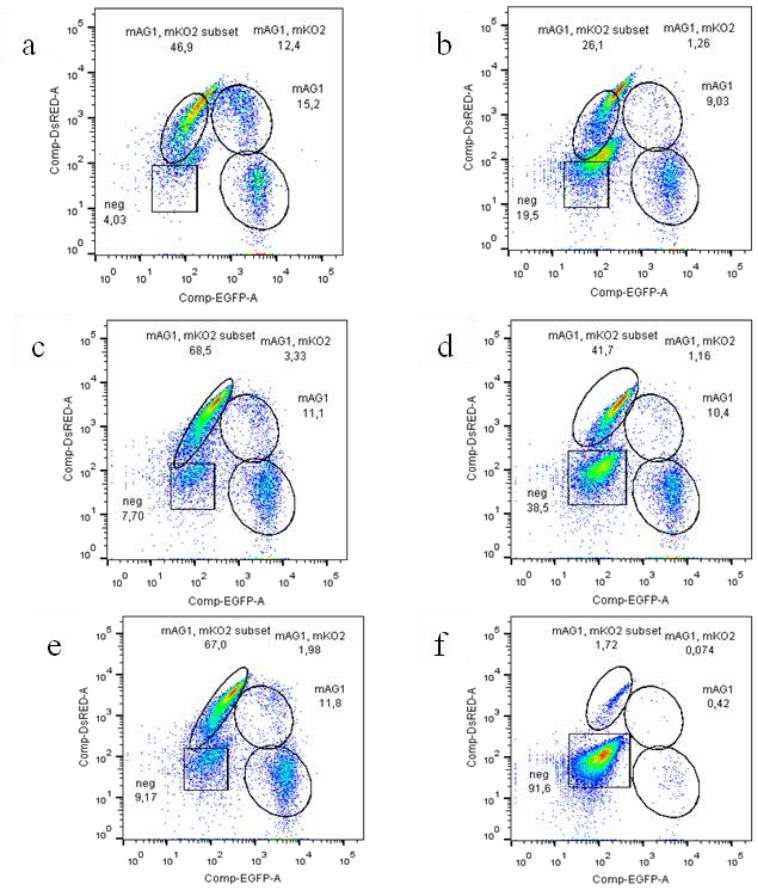
Çözeltideki Fikol yüzdesi	Fikol yoğunluğu (gr/cm^3)
%24	1,065
%22	1,060
%20	1,054
%18	1,052
%17	1,050
%16	1,048
%15	1,046

Şekil 4'te ise, 1.048 gr/cm^{3}yoğunluklu sistemde %7'den %38'e, 1.050 gr/cm^3'lik sistemde ise %9 seviyesinden %91 seviyesine bir artış görülmektedir. Bu sonuçlara bakarak M/G1 hücrelerinin, nanoparçacık etkileşimi sonucunda yoğunluklarının arttığı ve bu yoğunluk artışıyla içerisinde nanoparçacık olan M/G1 hücrelerinin bir hayli zenginleştirilebileceği söylenebilir.

3.3.3. Nanoparçacıklarla Etkileşmiş Hücrelerin Çok Fazlı Sistemlerde Ayrıştırılmasının FACS ile İncelenmesi

Öncelikle yoğunluk aralıkları 1.048–1.052 gr/cm^3 yakınlığında olan çok fazlı sistemler oluşturulmuştur. Alt fazın yoğunluğu, hücrelerin interfazda asılı kalmalarını sağlamak amacıyla

1.052 gr/cm^3 olarak belirlenmiştir. Daha önce tek fazlı Fikol sisteminde 18 nm altın nanoparçacıklarla etkileşen hücrelerin, yine aynı boyuttaki nanoparçacıklarla etkileşim zamanına bağlı değişikliklerini incelemek amacıyla hücreler 1 ve 3 saat boyunca bu parçacıklara maruz bırakılmıştır. Yine tek fazlı Fikol, tek fazlı Dekstran ve iki fazlı Fikol/ Dekstran/PVP/su sisteminde nanoparçacıklara maruz bırakılmış ve kontrol grubu olarak nanoparçacıklara maruz bırakılmamış hücreler, 1700 rcf'de 50 dakika boyunca santrifüjlenerek, HBSS solüsyonunda yıkanıp FACS'la ayrıştırma oranları incelenmiştir. Dekstranın tek fazda ayrıştırmada belirgin bir etkisi olmadığı görülmüştür.



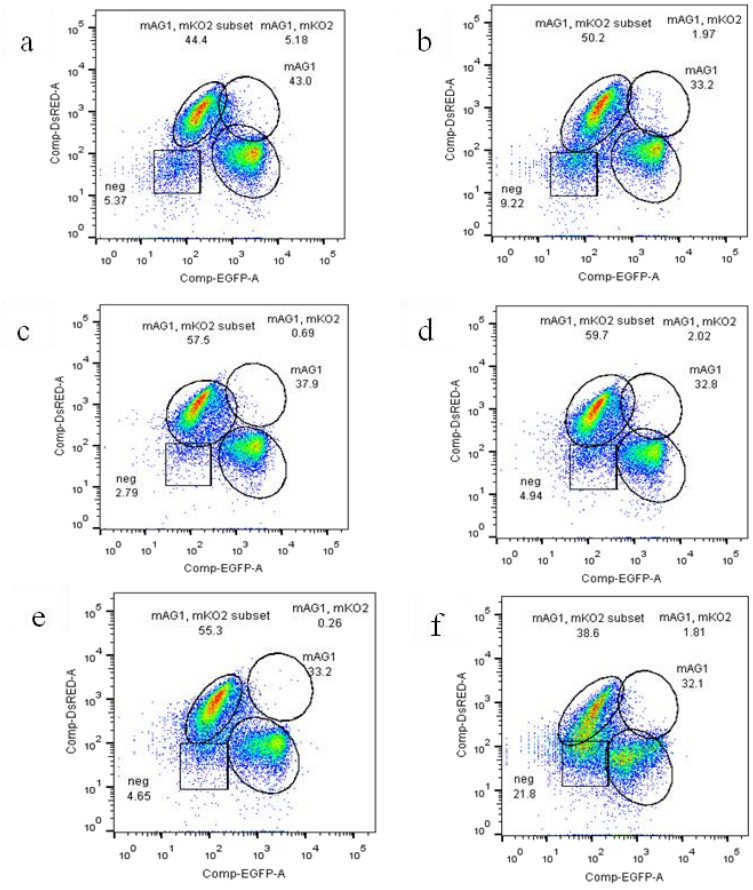
Şekil 4:

Nanoparçacıklarla etkileşmiş HeLa hücrelerinin a)Başlangıç (ayrıştırılmamış) popülasyonu üst ve (b) alt interfaz, c) Yoğunluğu 1.048 gr/cm^3 olan sistemin üst ve (d) alt interfazından alınan hücrelerin ayrıştırma sonuçları, e)Yoğunluğu 1.050 gr/cm^{3}olan sistemin üst ve (f) alt interfazından alınan hücrelerin ayrıştırma sonuçları

Parçacıklarla etkileşmemiş hücreler ayrıştırıldığında M/G1 aralığındaki hücrelerin popülasyonu (FACS'taki sol alt kuadrant, yoğunluk deneylerindeki en yoğun hücre) %9 civarında iken, Şekil 5'te görülen 1 saatlik nanoparçacık etkileşiminde (f) %22 civarına çıkmıştır.

Bu sonuçlara bakarak, Fikol/Dekstran/PVP/su iki fazlı sisteminde diğer tek fazlı sistemlere kıyasla farklı olarak hücre döngüsünün G1 fazındaki hücrelerin, nanoparçacık etkileşimi süre artışı sonucunda yoğunluklarının arttığı gözlemlenmiştir. Tüm sistemlerde hücreler bir faz aşağıya doğru ilerlemiştir. Bu sayede hücrelerin bu boyuttaki nanoparçacıklarla etkileşiminin olduğu da doğrulanmıştır. Turkevich metoduna göre sentezlenmiş, sitrat kaplı nanoparçacıkların sentez sonlandırma süresi, farklı boyuttaki nanoparçacıkların elde edilmesini sağlamaktadır.

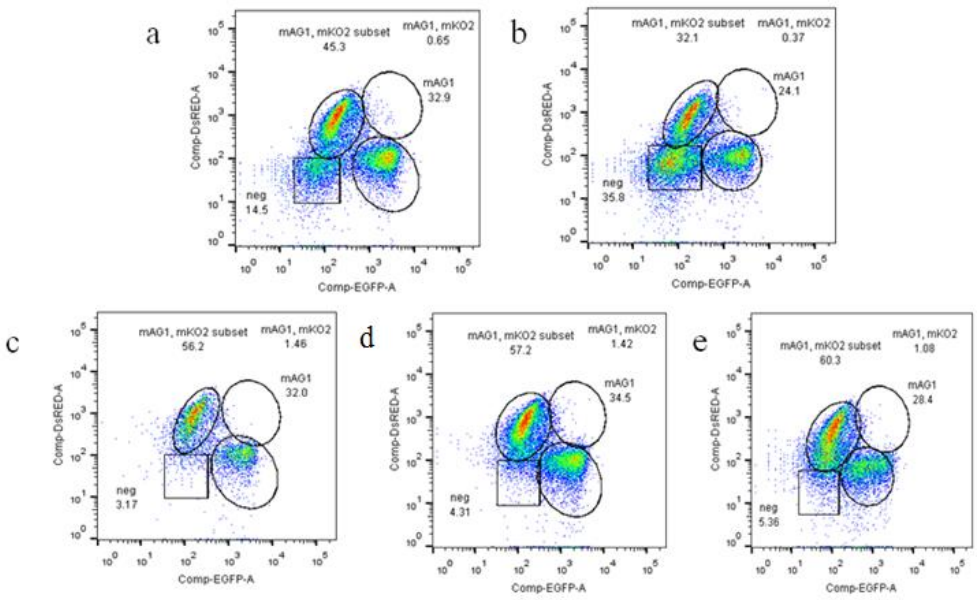
Nanoparçacık boyutunun, parçacıkların hücre içine girişindeki etkilerini de gözlemlemek için 123 nm ve 58 nm boyutlarındaki parçacıkların tek ve iki fazlı ayrıştırma sistemlerindeki etkileri incelenmiştir. 1,700 rcf'de 50 dakika santrifüjleyerek, yoğunluk-temelli ayrıştırma deneyleri yapılmıştır. Yine FACS deneyleri için HBSS solüsyonuyla yıkama gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucu farklı hücre döngüsünün farklı fazlarındaki ayrıştırma yüzdeleri aşağıdaki gibidir:



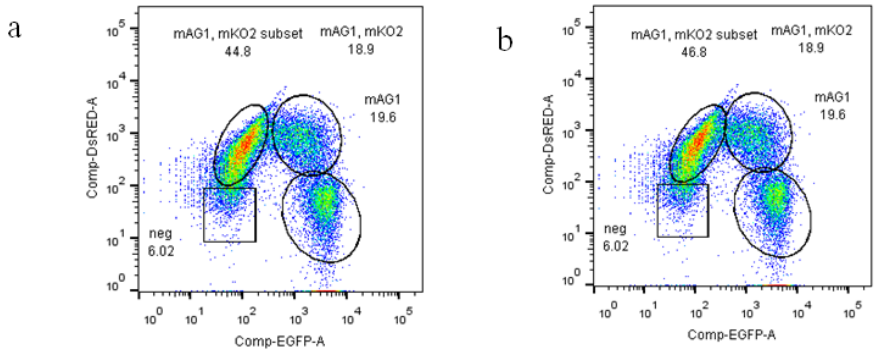
Şekil 5:

HeLa hücrelerinin 1.048 – 1.052 gr/cm^3 Fikol tek fazlı sistemindeki, a) Nanoparçacıklarla etkileşmemiş üst ve (b) interfazından alınan popülasyonu, c) Nanoparçacıklarla 1 saat etkileşmiş üst ve (d) interfazından alınan hücrelerin, e) Nanoparçacıklarla 3 saat etkileşmiş interfaz ve (f) alt fazından alınan hücrelerin ayrıştırma sonuçları

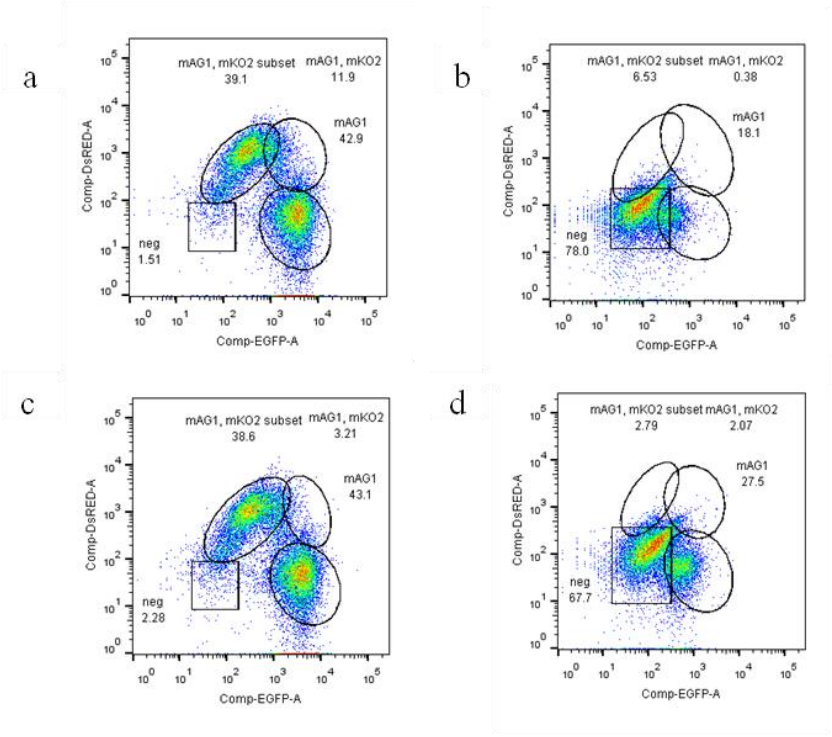
Yapılan bu deneylerde, sadece Dekstranın olduğu tek fazlı sistemlerin hücre ayrıştırmasında etkili olmadığı gözlemlenmiştir. Hücrelerin sadece üst ve interfazda kaldığı, aşağı faza inemediği FACS sonuçlarında açıkça görülmüştür. M/G1 hücrelerinin, nanoparçacık etkileşimi sonucunda yoğunluklarının arttığı ve böylece, hücre döngüsünde M/G1 fazında olan hücrelerin nanoparçacıklarla etkileşerek iki fazlı sistemlerle ayrıştırılabildiği gözlemlenmiştir. 123 nm'deki parçacıklarla 1 saatlik etkileşime maruz kalmış hücrelerde, bu artışın sebebi nanoparçacıkların toksisite özelliği göstermeden, hücre içine, hücre zarlarındaki reseptöre bağlı endositoz yoluyla alınarak hücre yoğunluklarını büyük ölçüde arttırıp M/G1 fazını zenginleştirmesi olarak bulunmuştur.



Şekil 6:
HeLa hücrelerinin 1.048–1.052 gr/cm^3 Fikol/Dekstran/PVP/su iki fazlı sistemindeki a) Nanoparçacıklarla etkileşmemiş üst ve (b) interfazından alınan popülasyonu, c) Nanoparçacıklarla 1 saat etkileşmiş interfaz ve (d) alt fazından alınan hücrelerin, e) Nanoparçacıklarla 3 saat etkileşmiş alt fazından alınan hücrelerin ayrıştırma sonuçları

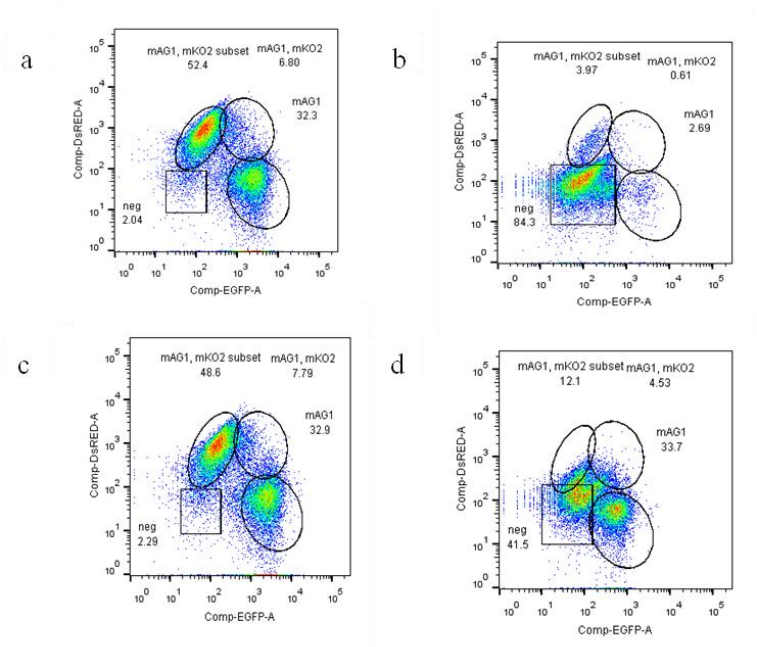


Şekil 7:
Nanoparçacıklarla etkileşmemiş HeLa hücrelerinin 1.048–1.052 gr/cm^{3}a) Fikol tek fazlı sistemindeki üst fazından alınan popülasyonu, b) Fikol/Dekstran/PVP/su iki fazlı sistemindeki üst fazından alınan popülasyonu



Şekil 8:

123 nm boyutundaki altın nanoparçacıklarla etkileşmiş HeLa hücrelerinin 1.048–1.052 gr/cm^3 a) Fikol tek fazlı sistemindeki üst ve b) alt fazından alınan hücrelerin ayrıştırma sonuçları, c) Fikol/Dekstran/PVP/su iki fazlı sistemindeki üst ve d) alt fazından alınan hücrelerin ayrıştırma sonuçları



Şekil 9:

58 nm boyutundaki altın nanoparçacıklarla etkileşmiş HeLa hücrelerinin 1.048–1.052 gr/cm^3 a) Fikol tek fazlı sistemindeki üst ve b) alt fazından alınan hücrelerin ayrıştırma sonuçları, c) Fikol/Dekstran/PVP/su iki fazlı sistemindeki üst ve d) alt fazından alınan hücrelerin ayrıştırma sonuçları

4. SONUÇ

Bu çalışmanın amacı, heterojen hücre popülasyonlarını yoğunluklarına göre ayrıştırabilen bir sistemin geliştirilmesidir. Hücre ayrıştırmasını, güvenilir, ölçeklenebilir ve kolay kullanılabilir sistemlerde, hücre işaretlemesi olmadan yapılabilmesi, birçok analizin önünü açacaktır. Polimerlerin faz ayrışmasıyla oluşturulan yoğunluk adımlarının hücre ayrıştırmasındaki performansı incelenmiştir. Nanoparçacıklarla etkileşmiş hücrelerin ayrıştırılmasında yüksek başarı elde edilmiştir. Parçacıklarla etkileşmemiş hücreler ayrıştırıldığında M/G1 aralığındaki hücrelerin popülasyonu (FACS'taki sol alt kuadrant, yoğunluk deneylerindeki en yoğun hücre) ancak %2 civarından %11 civarına arttırılmıştr. Şekil 6'da ise, 1.048 sistemde %7'den %38'e, 1.050'lik sistemde ise %9 seviyesinden %91 seviyesine bir artış görülmektedir. Bu sonuçlara bakarak M/G1 hücrelerinin, nanoparçacıklarla etkileşimleri sonucunda yoğunluklarının arttığı ve bu fazdaki hücrelerin ayrıştırıldığı sonucuna varılmıştır.

Fikol/Dekstran/PVP/su iki fazlı sisteminde diğer tek fazlı sistemlere kıyasla farklı olarak hücre döngüsünün G1 fazındaki hücrelerinin, nanoparçacık etkileşimi süre artışı sonucunda yoğunluklarının arttığı ve bu yoğunluk artışıyla içerisinde nanoparçacık olan G1 hücrelerinin artışı gözlemlenmiştir. Tüm sistemlerde hücreler bir faz aşağıya doğru ilerlemiştir. Bu ilerleme, hücrelerin nanoparçacıkları içlerine alarak yoğunluklarını arttırdıklarını göstermektedir. Tek fazlı sistemlerde, Dekstran tek başına kullanıldığında herhangi bir hücre ayrıştırılması verisine rastlanamamıştır. Hücrelerin sadece üst ve interfazda kaldığı, aşağı faza inemediği FACS sonuçlarında açıkça görülmüştür. Çok fazlı sistemlerin kullanılmasının en büyük avantajı, sistemin istenilen yoğunluk aralıklarının rahatlıkla oluşturulabilmesidir. Bu sayede, hücrelerin az miktardaki yoğunluk değişimleri dahi incelenebilmektedir. Şekil 8 ve 9'da üst ve interfazdan toplanan hücrelerin, her iki boyuttaki nanoparçacık etkileşimi sonrasında, neredeyse aynı kuadrant yüzde değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Ancak, 58 nm ve 123 nm boyutundaki nanoparçacıklarla etkileşime giren HeLa hücrelerinin hem Fikol tek fazlı sisteminde hem de Fikol/Dekstran/PVP/su iki fazlı sistemindeki alt fazından toplanan hücrelerin yüksek ölçüde ayrıştırıldığı görülmüştür. Bu hücreler ayrıştırıldığında M/G1 aralığındaki hücrelerin popülasyonunda (FACS'taki sol alt kuadrant, yoğunluk deneylerindeki en yoğun hücre) ancak %6'dan %80 civarına artış görülmektedir. Hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücre popülasyonlarını ayırabilmek, birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bu makalede önerilen iki fazlı sistemlerle, ve hücrelerde toksik özellik göstermediği belirlenen boyut ve konsantrasyondaki altın nanoparçacıkların sayesinde, HeLa servikal kanser hücreleri büyük ölçüde ayrıştırılmıştır.

5. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tamamı TÜBİTAK-MAG grubu, 3501 Ulusal Genç Araştırmacı Destekleme Programı kapsamında, 112M683 no'lu proje katkısı ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya desteklerinden dolayı, Özge Akbulut (TÜBİTAK) Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkür eder.

KAYNAKLAR

1. Akbulut Halatcı, O., Mace, C. R., Kumar, A. A., Nie, Z., ve Whitesides, G. M. (2012) Multiphase Systems Having Multiple Phase Properties. U.S. Patent Application No. PCT/US11/48675.

2. Chauhan, G., Chopra, V., Tyagi, A., Rath, G., Sharma, R. K. ve Goyal, A. K. (2017) Gold Nanoparticles Composite-Folic Acid Conjugated Graphene Oxide Nanohybrids For targeted Chemo-Thermal Cancer Ablation: In Vitro Screening and In Vivo Studies, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 351-361. doi: 10.1016/j.ejps.2016.10.011.

3. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., ve Chan, W. C. W. (2006) Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, *Nano Letters*, 6(4), 662–668. doi: 10.1021/nl052396o.

4. Cooper, G. M. (2000) *The Cell: A Molecular Approach*, Sinauer Associates, US. ISBN-10: 0-87893-106-6.

5. Everson, L. K., Buell, D. N., ve Rogentine, G. N. Jr. (1973) Separation of Human Lymphoid Cells into G1, S, and G2 Cell Cycle Populations by the Use of a Velocity Sedimentation Technique, *The Journal of Experimental Medicine*, 137(2), 343– 358. doi: 10.1084/jem.137.2.343.

6. Fratoddi, I., Venditti, I., Cametti, C. ve Russo, M. V. (2015) The puzzle of toxicity of gold nanoparticles. The case-study of HeLa cells, *Toxicology Research*, 4(4), 796-800. doi: 10.1039/C4TX00168K.

7. Geha, R. S., Rosen, F. S., ve Merler, E. (1973) Identification and Characterization of Subpopulations of Lymphocytes in Human Peripheral Blood After Fractionation on Discontinuous Gradients of Albumin, *The Journal of Clinical Investigation*, 52(7), 1726-1734. doi: 10.1172/JCI107354.

8. Haiss, W., Thanh, N. T., Aveyard, J., ve Fernig, D. G. (2007) Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV−Vis Spectra, *Analytical Chemistry*, 79(11),4215-4221. doi: 10.1021/ac0702084.

9. Hartwell, L. H. (1970) Periodic density fluctuation during the yeast cell cycle and the selection of synchronous cultures, *Journal of Bacteriology*, 104(3), 1280-1285. PMC248288.

10. Henderson, B., ve Pockley, A. G. (2012) *Cellular Trafficking of Cell Stress Proteins in Health and Disease*, Springer Publishing. ISBN: 978-94-007-4740-1.

11. Hu, K., Li, F., Zhang, Z. ve Liang, F. (2017) Synthesis of Two Potential Anticancer Copper (II) Complex Drugs: Their Crystal Structure, Human Serum Albumin. DNA Binding and Anticancer Mechanism, *New Journal of Chemistry*, doi: 10.1039/C6NJ02483A.

12. Khan, J. A., Pillai, B., Das, T. P., Singh, Y. ve Maiti, S. (2007) Molecular Effects of Uptake of Gold Nanoparticles in HeLa Cells, *ChemBioChem*, 8, 1237-1240. doi: 10.1002/cbic.200700165.

13. Kimling, J., Maier, M., Oken, B., Kotaidis, V., Ballot, H., ve Plech, A. (2006) Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *Journal of Physical Chemistry B.*, 110(32), 15700–15707. doi: 10.1021/jp061667w.

14. Kumar, A. A., Patton, M. R., Hennek, J. W., Lee, S., D'Alesio-Spina, G., Yang,X., Kanter, J., Shevkoplyas, S.,Brugnara, C., ve Whitesides, G. M. (2014) Density-based separation in multiphase systems provides a simple method to identify sickle cell disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences*,111(41), 14864-14869. doi: 10.1073/pnas.1414739111.

15. Lee, J., Lilly, G. D., Podsiadlo, P., ve Kotov, N. A. (2009) In vitro Toxicity Testing of Nanoparticles in 3D Cell Culture, *Small*, 5(10), 1213-1221. doi: 10.1002/smll.200801788

16. Liang, X., Michelsen, M. L., Kontogeorgis, G. M. (2016) A density gradient theory based method for surface tension calculations, *Fluid Phase Equilibria*, 428(25), 153-163. doi: 10.1016/j.fluid.2016.06.017.

17. Liu, X., Atwater, M., Wang, J., ve Huo, Q. (2007) Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), 3-7. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.08.005.

18. Mace, C. R., Akbulut Halatcı, O., Kumar, A. A., Shapiro, N. D. ve Whitesides, G. M. (2012a) Multiphase Systems for Analysis of Solid Materials, WO/024691 (HU4263).

19. Mace, C. R., Akbulut, O., Kumar, A. A., Shapiro, N. D., Derda, R., Patton, M. R., ve Whitesides, G. M. (2012) Aqueous Multiphase Systems of Polymers and Surfactants Provide Self-assembling Gradients in Density, *Journal of American Chemical Society*, 134(22), 9094-9097. doi:10.1021/ja303183z.

20. Mahmoudi, M., Saedi, S., Shokrgozer, M., Azadmanesh, K., Hassanlou, M., Kalhor, H., Burtea, C., Rothen, B., Laurent, S., Sheibani, S., ve Vali, H. (2012) Cell vision: complementary factor of protein corona in nanotoxicology, *Nanoscale*, 4, 5461–5468. doi: 10.1039/c2nr31185b.

21. Markx, G. H., Talary, M. S., ve Pethin, R. (1994) Separation of viable and non-viable yeast using dielectrophoresis, *Journal of Biotechnology*, 32(1), 29-37. doi: 10.1016/0168-1656(94)90117-1.

22. Mortimer, M., Petersen, E. J. , Buchholz, B. A. ve Holden, P. A. (2016) Separation of Bacteria, Protozoa and Carbon Nanotubes by Density Gradient Centrifugation, *Nanomaterials*, 6(10), 181. doi: 10.3390/nano6100181.

23. Pappas, D., ve Wang, K. (2007) Cellular Separations: A Review of New Challenges in Analytical Chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 601(1), 26-35. doi: 10.1016/j.aca.2007.08.033.

24. Ren, T., Yu, S., Mao, Z., ve Gao, C. (2015) A complementary density gradient of zwitterionic polymer brushes and NCAM peptides for selectively controlling directional migration of Schwann cells, *Biomaterials*, 56, 58-67. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.03.052.

25. Rothstein, E. L., Hartzell, R. W., Manson, Jr. L. A. ve Kritchevsky, D. (2006) Effects of D_2O on Cellular Components of Mammalian Cells Grown in Tissue Culture, *Annals of New York Academy of Sciences*, 84(16), 721-726. doi: 10.1111/j.1749-6632.1960.tb39103.x.

26. Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., ve Miyawaki, A. (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression, *Cell*, 132, 487-498. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.033.

27. Shang, L., Nienhaus, K., ve Nienhaus, G. U. (2014) Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters,*Journal of Nanobiotechnology*, 12, 3–11. doi: 10.1186/1477-3155-12-5.

28. Shortman, K., Haskill, J. S., Szenberg, A., ve Legge, D. G. (1967) Density Distribution Analysis of Lymphocyte Populations, *Nature*, 216(5121), 1227-1229. PMC1455948.

29. Stadler, A. M., Digel, I., Artmann, G. M., Embs, J. P., Zaccai, G., ve Büldt, G. (2008) Hemoglobin Dynamics in Red Blood Cells: Correlation to Body Temperature, *Biophysics Journal*, 95(11), 5449-5461. doi: 10.1529/biophysj.108.138040.

30. Strober, W. (2001) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, *Current Protocols in Immunology, Appendix3B*, doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.

31. Stubblefield, E., ve Mueller, GC. (1960) Effects of Sodium Chloride Concentration on Growth, Biochemical Composition, and Metobolism of HeLa cells, *Cancer Research*, 20, 1646-1655. Print ISSN: 0008-5472.

32. Sui, X., Luo, C., Wang, C., Zhang, F., Zhang, J. ve Guo, S. (2016) Graphene Quantum Dots Enhance Anticancer Activity of Cisplatin via Increasing Its Cellular and Nuclear Uptake,

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 12(7), 1997-2006. doi: 10.1016/j.nano.2016.03.010

33. Waber, J., ve Sakai, W. S. (1974) The Effect of Growth in 99.8% Deuterium Oxide on the Ultrastructure of Winter Rye, *Plant Physiology*, 53, 128-130. PMC541348.