T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

3B BİYOYAZICI KULLANILARAK OLUŞTURULAN DOKULARDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRE GEN EKSPRESYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

BÜŞRA BAŞER

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ HAKAN DARICI

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

İSTANBUL - 2022

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

3B BİYOYAZICI KULLANILARAK OLUŞTURULAN DOKULARDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRE GEN EKSPRESYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

BÜŞRA BAŞER

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ HAKAN DARICI

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

İSTANBUL-2022

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “3B Biyoyazıcı Kullanılarak Oluşturulan Dokularda Mezenkimal Kök Hücre Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

BÜŞRA BAŞER

Kıymetli Annem'e

TEŞEKKÜR

Emeğini, eşsiz tecrübelerini aktarmayı esirgemeyen, bizlere daima yol gösteren, kendisiyle çalışabilme fırsatına nail olduğum ve onur duyduğum saygı değer Prof. Dr. Erdal Karaöz'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tezin fikir olarak kafamda oluşmasına yardımcı olan, desteğini, vaktini esirgemeyen, beni her konuda destekleyen, gerek arkadaş gerekse bir danışman olarak hep yanımda olan sevgili hocam Dr. Hakan Darıcı'ya teşekkür ederim.

Maddi manevi tüm zorluklara rağmen eğitim hayatımda arkamda duran canım annem Ayhan Başer'e, pozitifliği ve güler yüzüyle motivasyonumu yükselten canım babam Şaban Başer'e, bana hep inanan, güvenen, her daim arkamda duran çok değer verdiğim kıymetli abim Burak Başer'e, canımdan çok sevdiğim, moral kaynağım olan yeğenlerim Yusuf Emre Demiray'a ve Yiğit Emir Demiray'a ve onların güzeller güzeli annesi bir tanecik ablam Burcu Demiray'a canı gönülden teşekkür ederim.

Uzun yıllardır her anıma şahitlik etmiş olan çok sevgili yol arkadaşım, dostum, en büyük gücüm Alihan Kazdal'a tüm kalbim ile teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans dönemim boyunca bir gün olsun ayrılmadığımız, bana kendimi özel ve şanslı hissettiren, en iyi günümde, en kötü günümde yanı başımda olan, can dostlarım Zehra Armağan'a ve Sevde Ekici'ye tüm kalbim ile teşekkür ederim.

Arkadaşlığı, samimiyeti, bilgisi ve çalışkanlığıyla yardımlarını bir kez olsun esirgemeyen canım arkadaşım R. Okan Akar'a teşekkür ederim.

Son olarak tüm Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Ar-Ge ekip arkadaşlarıma geçirdiğim tüm güzel ve keyifli vakitler için teşekkür ederim.

Büşra BAŞER

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI ..... İ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 3
1.1. Kök Hücreler 3
1.2. Kök Hücre Çeşitleri 4
1.3. Mezenkimal Kök Hücreler 5
1.4. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu 7
1.5. 2B Kültürün Kısa Geçmişi 9
1.6. 2B ve 3B Hücre Kültürlerinin Genel Özellikleri 9
1.7. 2B ve 3B Kültürlerde Proliferasyon, Hücre Morfolojisi ve Popülasyon 10
1.8. 2D kültür karşısında 3D kültürlerde protein ve gen ifadesi 11
1.9. 2B ve 3B Kültürlerin Karşılaştırılması 12
1.10. 3 Boyutlu Kültür Teknolojileri 13
1.10.1. Sferoid 13
1.10.2. Organoid 14
1.10.3. Yapı İskeleleri ve Hidrojeller 15
1.10.4. Çip-Üstü-Organlar 15
1.10.5. 3B Biyoyazıcılar 16
1.11. GENLER 22
1.11.1. ADİPOJENİK GENLER 22

1.11.2. KONDROJENİK GENLER....23
1.11.3. OSTEOJENİK GENLER....24
1.11.4. NÖROJENİK GENLER....26
1.11.5. MEZENKİMAL GENLERİ....28
1.11.6. KÖKLÜLÜK (STEMNESS) GENLERİ....29
1.11.7. FARKLILAŞMA GENLERİ....30
1.11.8. HOUSEKEEPING GENLERİ....32
2. GEREÇ VE YÖNTEM....34
2.1. Kimyasal Malzemeler- Jelatin, Sigma, Almanya....34
2.2. Sarf Malzemeler....34
2.3. Hücre Hatları....35
2.4. Kullanılan Cihazlar....35
2.5. Kullanılan Kitler....36
2.6. Primerler....36
2.7. Kullanılan besiyerinin hazırlanması....38
2.7.1. Hücrelerin Çözülmesi....38
2.7.2. Hücrelerin Pasajlanması....38
2.7.3. Hücre Sayımı....39
2.7.4. Hücrelerin Dondurulması....39
2.7.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Akış Sitometrisinde Karakterizasyonu....40
2.8. 3B Hücre Kültürü Hazırlanması....40
2.8.1. Biyomalzemenin - Aljinat ve Jelatinin Hazırlanması....40
2.8.2. Mezenkimal Kök Hücre ve Biyomalzemenin Birleşimi....41
2.8.3. Mezenkimal Kök Hücre ve Biyomürekkebin Basımı....41
2.8.4. Su Tutma Kapasitesi Tayini....41
2.8.5. Biyobozunurluk Tayini....41
2.9. Canlılık Analizi....42
2.10. Real Time PCR Analizleri....42
2.10.1. RNA İzolasyonu....42
2.10.2. Konsatrasyon Ölçümü....43
2.10.3. RNA'nın cDNA'ya Çevrilmesi....44
2.10.4. Agaroz jel elektroforezi....45

2.10.5. RT-PCR İşlemi....45
3. BULGULAR....48
3.1. Hücrelerin Çoğaltılması, Kültürü ve Saklanması....48
3.2. Hücre Karakterizasyonu....48
3.3. Üç Boyutlu Kültür Hazırlaması....49
3.3.1. Üç Boyutlu Kültür Basım Aşaması Bulguları....50
3.3.2. Su tutma Tayini....51
3.3.3. Canlı/Ölü Hücre tayini....52
3.4. RNA İzolasyonu Bulguları....53
3.5. Konsatrasyon Ölçümleri....54
3.6. cDNA Sentez Sonuçları....55
3.7. Agaroz Jel Elektroforezi....56
3.8. Real-time PCR Bulguları....58
3.8.1. ADİPOJENİK GENLER....58
3.8.2. KONDROJENİK GENLER....59
3.8.3. OSTEOJENİK GENLER....61
3.8.4. NÖROJENİK GENLER....63
3.8.5. MEZENKİMAL GENLER....65
3.8.6. KÖKLÜLÜK GENLERİ....67
3.8.7. FARKLILAŞMA GENLERİ....70
4. TARTIŞMA....72
4.1. 2B ve 3B Hücre Kültürü....72
4.2. 3B Biyobaskı....73
4.3. Çalışmamızdaki Real-Time PCR Bulgularının Analizi....76
4.3.1. ADİPOJENİK GENLER....76
4.3.2. OSTEOJENİK GENLER....76
4.3.3. KONDROJENİK GENLER....77
4.3.4. NÖROJENİK GENLER....78
4.3.5. MEZENKİMAL GENLER....79
4.3.6. KÖKLÜLÜK GENLERİ....80
4.3.7. DİĞER GENLER....81
4.4. 3B Ortamda Kök Hücre Farklılaşması....82

5. SONUÇ 85
KAYNAKÇA 87
İNTİHAL RAPORU 100

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1: Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklı Doku Kaynaklarından Farklılaşma Potansiyeli ve ilgili yüzey belirteçleri. 8

Tablo 1.2: 2B ve 3B Kültürlerin Karşılaştırılması 12

Tablo 1.3: 3B hücre kültürü çalışmalarında kullanabilecek malzemeler 20

Tablo 2.1: Analizlerde kullanılan primerlerin baz dizilimleri 36

Tablo 3.1: 1. gün izolasyonundan elde edilen sonuçlar 54

Tablo 3.2: 7. gün izolasyonundan elde edilen sonuçlar 54

Tablo 3.3: 14. gün izolasyonundan elde edilen sonuçlar 54

Tablo 3.4: 1. gün deneyi cDNA ölçüm sonuçları 55

Tablo 3.5: 7. gün cDNA ölçüm sonuçları 56

Tablo 3.7: 14. gün cDNA ölçüm sonuçları 56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Simetrik ve asimetrik hücre bölünmeleri 3

Şekil 1.2: Kök hücre özellikleri (Kolios vd., 2013). 5

Şekil 1.3: Mezenkimal kök hücrelerin elde edilebileceği kaynaklar ve farklılaşabileceği hücreler (Tavakoli vd., 2020). 6

Şekil 1.4: 2B ve 3B Kültür (Chaicharoenaudomrung ve ark., 2020). 10

Şekil 1.5: Sferoid yapı (Langhan vd., 2018). 14

Şekil 1.6: Biyoyazıcı çeşitleri (Axpe vd., 2016). 17

Şekil 2.1: Nanodrop Cihazı 43

Şekil 2.2: BIO-RAD markalı Thermal Cycler. RNA'nın cDNA'ya çevrilmesinde kullanılmaktadır. 44

Şekil 2.3: Analizlerin yapıldığı real-time PCR Cihazı 47

Şekil 3.1: MKH Akım Sitometrisi Karakterizasyonu 49

Şekil 3.2: Biyomalzemelerin laminar kabinde UV ile sterilizasyonu 50

Şekil 3.3: Hücre ve Biyomalzeme Karışımı 50

Şekil 3.4: 3B Biyobaskı Cihazı (3D Bioprinter) 51

Şekil 3.5: Su tutma tayini cetvel ile ölçüm. a) 0. gün b) 7.gün 51

Şekil 3.6: Su tutma tayini hassas terazi ile ölçüm. a) 0. gün (1.64 g) b) 7. gün (2.88g). 52

Şekil 3.7: Sferoid yapı Live/Dead boyaması 52

Şekil 3.8: İzolasyon sonrası; RNA, DNA ve protein fazları 53

Şekil 3.9: İzole edilen RNA pelleti 53

Şekil 3.10: Agaroz jel elektroforezi görüntüsü 57

Şekil 3.11: PPAR-G PCR Bulgusu 58

Şekil 3.12: LPL PCR Bulgusu 59
Şekil 3.13: ACAN PCR Bulgusu 60
Şekil 3.14: COMP PCR Bulgusu 60
Şekil 3.15: SOX-9 PCR Bulgusu 61
Şekil 3.16: ALP PCR Bulgusu 62
Şekil 3.17: COL1A1 PCR Bulgusu 62
Şekil 3.18: RUNX2 PCR Bulgusu 63
Şekil 3.19: AP-2 PCR Bulgusu 64
Şekil 3.20: NESTIN PCR Bulgusu 64
Şekil 3.21: TUBULIN PCR Bulgusu 65
Şekil 3.22: CD44 PCR Bulgusu 66
Şekil 3.23: THY-1 PCR Bulgusu 66
Şekil 3.24: VIMENTIN PCR Bulgusu 67
Şekil 3.25: I-CAM PCR Bulgusu 68
Şekil 3.26: POU5F1 PCR Bulgusu 68
Şekil 3.27: SOX-2 PCR Bulgusu 69
Şekil 3.28: ZFP42 PCR Bulgusu 69
Şekil 3.29: BMP-2 PCR Bulgusu 70
Şekil 3.30: RUNX-1 PCR Bulgusu 71
Şekil 3.31: V-CAM PCR Bulgusu 71

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

2B (2D) : İki Boyutlu
3B (3D) : Üç Boyutlu
Bioink : Biyomürekkep
CAD : Computer Aided Design; Bilgisayar Destekli Tasarım
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : Dimetil sülfoksit
DOD : Drop on Demand; Talep üzerine damla
ECM : Ekstraselüler Matriks
NEAA : Esansiyel olmayan amino asit
FDA : ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FSS(FBS) : Fetal Sığır Serumu
HLA : İnsan Lökosit Antijeni
ISCT : Uluslararası Hücresel Terapi Derneği
MKH : Mezenkimal Kök Hücre
PBS : Fosfat Tampon Çözeltisi
WJ-MSC : Wharton Jel Mezenkimal Kök Hücre
HKH : Hematopoietik Kök Hücre
TH1 : T Helper 1
TH2 : T Helper 2
ECS : Embriyonik Kök Hücre
iPS : İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
DLP : Dijital Lazer Işlemi
LS : Lazer tabanlı stereoliografi
MRI : Manyetik rezonans görüntüleme
PLA : Polilaktik asit
PGA : Poliglikolik asit

PLGA **:** Polilaktik glikolik asit

PCL **:** Poli kaprolakton

PUR **:** Poli üretan

CO_2 **:** Karbondioksit

DNA **:** Deoksiribonükleikasit

RNA **:** Ribonükleikasit

qRT-PCR **:** Gerçek zamanlı Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA **:** Komplementer DNA

ml **:** Mililitre

ul **:** Mikrolitre

um **:** Mikrometre

CaCl **:** Kalsiyum Klorür

EDTA **:** Etilen Diamin Tetra-Asetik Asit

TAE **:** Tris Asetat EDTA

UV **:** Ultraviyole

ÖZET

BASER, B. (2021). 3B Biyoyazıcı Kullanılarak Oluşturulan Dokularda Mezenkimal Kök Hücre Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, TÜRKİYE.

Hücrelerin *in vitro* ortamdaki analizlerinde klasik olarak iki boyutlu (2B) kültür sistemleri kullanılmaktadır. Ancak bu sistemler, hücrelerin vücut içinde bulundukları 3 boyutlu (3B) ortamını tam olarak yansıtmamaktadır. Vücut ortamını taklit etmek amacıyla, hücrelerin *in vivo* ortamda da olduğu gibi her yöne doğru gelişip birbiriyle etkileşebildiği çeşitli 3B kültür sistemleri geliştirilmiştir. Araştırmalar 3B kültürde gerçekleştirilen deneylerin, 2B kültüre göre daha doğru sonuçlar verdiğini ve kültür çalışmalarının 3 boyutta yapılması gerektiğini işaret etmektedir. 3B yöntemlerinden en ileri teknolojisi 3B biyoyazıcı (bioprinter) kullanılarak yapay dokular üretilmesidir.

Vücutta pek çok yerde bulunan ve hücresel düzeyde homeostazı sağlamakla görevli multipotent bir hücre tipi olan Mezenkimal Kök Hücreler (MKH'ler), doku mühendisliğinde en çok tercih edilen hücrelerdendir. MKH'lerin biyoyazıcılar ile basıldığında içinde yaşadıkları 3B ortamın etkisiyle gen ifadelerinde ne gibi değişiklikler olduğu halen tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda da 3B biyoyazıcı kullanılarak oluşturduğumuz 3B kültürlerde MKH gen ifadelerindeki değişimlerini inceledik. Aljinat/jelatin bazlı hidrojeller içerisinde 3B biyoyazıcıda basılan hücreler 14 gün süre ile kültüre edilerek spontan farklılaşmaya bırakıldı. Aynı sürede konvansiyonel 2B yöntemle kültüre edilen hücrelerden 1, 7, ve 14. günlerde RNA izolasyonu yapılarak çeşitli genlerin ekspresyon düzeyleri incelendi.

Yaptığımız gen ekspresyon analizleri bize 3B biyobaskının çeşitli kök hücre gen ifadelerinde düşüşe ve farklılaşma genlerinde artışa neden olduğunu, farklılaşmanın en çok kondrojenik yönde olduğunu bunu osteojenik ve nörojenik farklılaşmanın takip ettiğini, diğer yandan adipojenik farklılaşmanın 3B ortamda daha az olduğunu gösterdi. Bulgularımız 3B biyobaskı yönteminin özellikle kıkırdak ve kemik doku mühendisliğinde kullanılabileceğini gen düzeyinde ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre (MKH), 3 boyutlu (3B) biyoyazıcı, 2B ve 3B hücre kulturu, Gen Ekspresyonu.

ABSTRACT

BASER, B. (2021). Comparison of Mesenchymal Stem Cell Gene Expression in Tissues Created Using a 3D Bioprinter. Istinye University, Institute of Health Science, Stem Cell and Tissue Engineering. Master Thesis. Istanbul.

Conventional two-dimensional (2D) culture systems are widely used for *in vitro* analysis of cells. However, these systems do not fully reflect the 3-dimensional (3D) environment of the cells within the body. In order to mimic the natural environment, various 3D culture systems have been developed in which cells can grow and interact in all directions. Studies indicate that experiments performed in 3D culture give more accurate results than 2D therefore *in vitro* analyses should be done in 3D. The most advanced 3D method to produce artificial tissues is 3D bioprinting. Today, tissues such as cartilage, bone, liver can be produced with 3D bioprinters in small scales.

Mesenchymal Stem Cells (MSCs), are a multipotent cell type, found in many parts of the body and responsible for maintaining homeostasis at the cellular level. MSCs are among the most preferred cells in tissue engineering. However, it is still not clear the changes in gene expressions when MSCs are printed with bioprinters. In our study, we examined the changes in MSC gene expressions after 3D bioprinting. MSCs were bioprinted in alginate/gelatin-based hydrogels and cultured for 14 days. Along with 2D cultured cells they allowed to differentiate spontaneously. The expression levels of various genes on the 1^{st}, 7^{th} and 14^{th} days were examined by real-time PCR method.

Our gene expression analyses showed us that 3D bioprinting causes a decrease in various stem cell gene expressions and increases differentiation genes. The differentiation was mostly in the chondrogenic direction, followed by osteogenic and neurogenic differentiation. On the other hand, adipogenic differentiation was less in the 3D environment. Our findings reveal at the gene level, the 3D bioprinting method can be used especially for cartilage and bone tissue engineering.

Key Words: Mesenchymal Stem Cell, 3D Bioprinting, 2D and 3D cell culture, Gene expression.

GİRİŞ

Bağ dokuda bulunan ve her ortamda farklılaşma özelliğine sahip olan erişkin kök hücreler mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılır. İlk olarak 1924 yılında A. Maximow tarafından farklılaşan hücre grubu olarak keşfedilmiştir. Sadece bağ dokuda bulunmayıp, yaralanma ve ihtiyaç durumunda gerekli bölgeye giderek onarım gerçekleştirebilirler. Farklılaşma yeteneklerinin fazla olması ve stromal destek sağlayarak doku hücrelerinin fonksiyonlarına katkı gösterebilmeleri nedeniyle klinik olarak kullanılmaktadırlar. Bir diğer avantaj ise immünsüpresif ve non-immunojenik özellikte olmalarıdır. Aynı zamanda gen tedavisi için de uygundurlar. Fetal dokuların yanı sıra yetişkin dokularında da bulunmaktadırlar. Başta bağ doku ve alt tipi olan yağ doku olmak üzere, kemik iliği, amniyotik sıvı, amniyotik zar, diş pulpası, endometriyum, menstüral kan, periferal kan, plasenta, fetal membran gibi dokulardan izole edilebilirler.

Kök hücreler 2B kültür ortamında çoğaltılır. Bu alışagelmiş durumun dışında 3B kültür ortamı da kullanılmaktadır. 3B kültürde hücreler vücut içinde doğal ortamlarındaki gibi hissederler. Bu yüzden 2B kültür ve 3B kültür arasında büyük farklar vardır.

Geleneksel 2B hücre kültür sistemleri tek tabakalı kültürün toplam yüksekliği kısmen sabittir. Ancak 3D kültürleri, kullanılan 3B hücre teknolojisine bağlı olarak hücre gelişimi çok yönlü ve çok katmanlı doku benzeri yapılar oluşturmaktadır. İki boyutlu kültürde hücreler komşu hücreler ile etkileşime girerken, tek bir düzlemde ve hücrelerin çevresi ile iletişimi sınırlıdır, ancak 3B hücre kültür modellerinde, hücreler arası iletişim her yöne olmaktadır. Üç boyutlu hücre kültüründe, reseptörler ve adhezyon molekülleri doğal olarak hücre yüzeyine daha eşit bir şekilde yayılırken, iki boyutlu kültür sistemlerin depolarize olur ve bağlayıcı proteinler elastik doku kültürüne yapıştıklarından ventral yüzey üzerinde yoğunlaşma eğilimi gösterirler. Hatta gözenek boyutu, ligand yoğunluğu ve sertliği, kollajen konsantrasyonunun değiştirilmesi veya kimyasal çapraz bağlama bileşiklerinin katılmasıyla, jelin yapısal özelliklerini değiştirmek kolay olmaktadır.

Konvansiyonel 2B kültür koşullarında, hücre dışı matris bileşenleri, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimi, farklılaşma, çoğalma ve hücresel işlevler *in vivoda*

gözlemlenememektedir. Yapılan çalışmalarda, hücrelerin 3B organizasyonu, tümör oluşumu mekanizmasının ve *in vitro* kanser çalışmalarında iyi sonuç alınabileceği bildirilmiştir. Metachromasia ile değerlendirilen kondrojenez ve spesifik kondrosit genlerin ekspresyonu (COL II, COL X) gibi insan kemik iliği stromal hücrelerinde, 3B kültür sistemlerinin kullanılmasına mümkün olmaktadır.

Son zamanlarda 3B kültür ortamını oluşturmak için 3B biyoyazıcılar kullanılmaktadır. 3B biyoyazıcı, canlı hücrelerden taşıyıcı materyali olan veya olmayan bir yapıyı tabakalı bir şekilde yapı üretmek için kullanılan bir teknolojidir. Yazdırılan materyal, canlı hücrelerin basılmasını sağlayan bir mürekkep formülasyonu olarak tanımlanabilen bir "biyoink (biyomürekkep)" olarak adlandırılır.

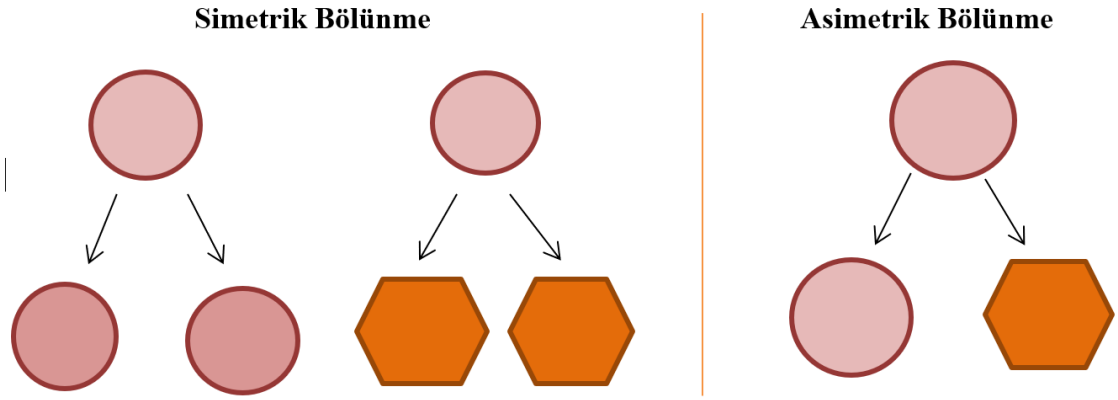
Bu projede amaç; ticari biyoinkler kullanılarak 3B biyoyazıcılar ile 3B kültür ortamı oluşturup, mezenkimal kök hücrelerin kültür ortamındaki gen ekpresyon analizlerini yapmaktır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendini sınırsız yenileyebilme özelliğine sahip, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, hem embriyonun hem de yetişkin yaşamının devam edebilmesi için gerekli olan hücrelerdir. Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran temel özellikler bulunmaktadır ve kök hücrelerin en önemli tanımını oluşturur; kendini yenileyebilme, farklı hücrelere farklılaşma, çoğalabilme yetkinliğidir (He ve ark., 2009).

Kök hücreler çoğalma aşamasında kendi yedeğini oluştururken bir yandan da yenilecek dokunun ihtiyacı olan hücreye dönüşürler. Kök hücreler çoğalma aşamasında simetrik ve asimetrik şekilde bölünür (Şekil 1.1). Simetrik bölüme genel olarak fetal ve embriyonik dönemde gerçekleşirken, ilerleyen süreçlerde asitmetrik bölünmeye geçer (Sherley, 2002).



Şekil 1.1: Simetrik ve asimetrik hücre bölünmeleri

Dokularda ilerleyen dönemlerde kök hücrelerin simetrik bölünmede iki somatik hücreye bölünmesi kök hücre deposunda azalmaya neden olur. Bu da yaşlanan kök hücrelerin yerine yenisi gelemeyeceğinden doku hasarı, organ yetmezliği gibi sorunlara neden olur (Falanga, 2012).

Kök hücrelerin değişimini, başka bir hücreye farklılaşmasını sağlayan çeşitli gen ekspresyonları vardır. Hücrede çeşitli etkenler, farklı hücre soyuna özgü proteinlerin sentezine neden olur. Hücreler bu şekilde farklı soylara yönelirler (Watt & Hogan, 2000).

1.2. Kök Hücre Çeşitleri

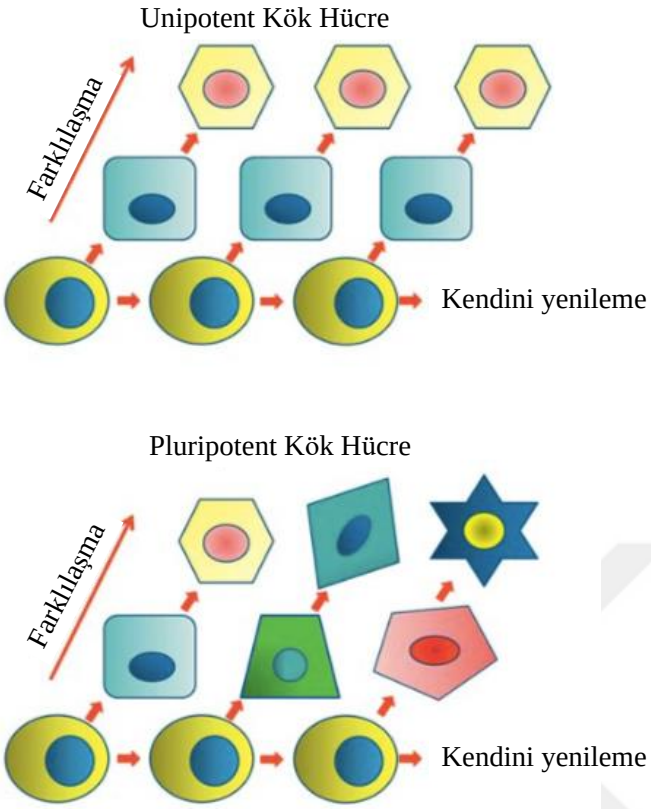
Kök hücreler kendi aralarında bulundukları yere ve farklılaşma potansiyellerine göre ayrılırlar. Totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak sınıflandırılır. Farklılaşma potansiyeli en yüksek totipotent en düşük ise unipotentdir.

Totipotent: Döllenmiş yumurtanın ilk olarak blastomer aşamasında oluşur. Tüm vücudumuzda tüm doku ve hücrelerine dönüşebilme kapasitesine sahiptir (Rossant, 2001).

Pluripotent: Kökenini totipotent kök hücrelerden alır. Yetişkin vücudunda üç germ tabakasından gelişen tüm hücre tiplerine farklılaşama özelliğine sahiptir (Neumüller & Knoblich, 2009).

Multipotent: Yetişkin bir insan vücudunda her hücre tipini oluşturmazlar. Birbirine yakın hücre tiplerini oluşturma potansiyeline sahiptirler. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) ve Hematopoietik Kök Hücreler (HKH) bu gruba dahil olmaktadır (Ratajczak ve ark., 2012).

Unipotent: Sadece tek hücre tipi oluşturabilen kök hücrelerdir (Kolios & Moodley, 2013).



Şekil 1.2: Kök hücre özellikleri (Kolios & Moodley, 2013).

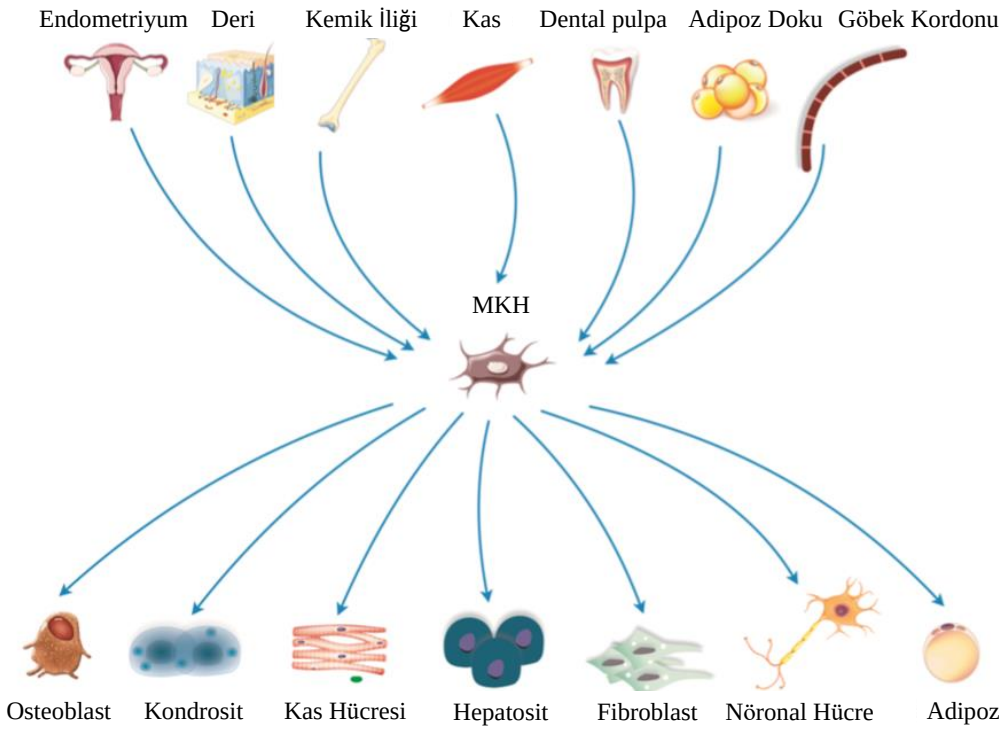
1.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücrelerin ilk keşfi Friedenstein ve ekibi tarafından kemik iliğindeki hücrelerin incelenmesi sırasında gerçekleşmiştir. Keşif sırasında bu hücreler morfolojik olarak fibroblastlara benzediği için ünite-fibroblast (CFU-F) adı verilmiştir (Friedenstein ve ark., 1970). 1991 yılında Dr. Caplan tarafından "Mezenkimal Kök Hücre" ifadesi ise ortaya atılmıştır (Caplan, 1991). MKH'lar fetüs ve yetişkinlerde, farklı somatik veya kök hücrelere dönüşerek homeostazının devamını sağlayan bir kök hücre kavramını ifade eder. Mezenkimal kök hücreler *in vitro* ve *in vivo* ortamda adipojenik, osteojenik, kondrojenik ve nörojenik hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent kök hücrelerdir. *In vitro'*da petri kabına yapışabilen ve kendilerini uzun süreler boyunca çoğaltabilirler (Dominici ve ark., 2006).

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ doku, diş pulpası, periodontal ligament gibi çeşitli bölgelerden de izole edilebilmektedir. Diğer kaynaklara göre

MKH'lar göbek yağ dokusunda daha fazla bulunmaktadır. Lipo-aspirasyon yöntemiyle elde edilen MKH'lar diğer yöntemlere göre daha fazla toplanabilmektedir. Klinikte kullanabilmek için en etkili kaynak yeni doğan göbek kordonu stromasıdır. Bunun sebebi farklılaşabilme potansiyeli daha yüksektir (Kolios & Moodley, 2013; Volarevic ve ark., 2018).

MKH'lar farklılaşma yeteneklerinin yanında birçok hastalıkta bağışıklık yanıtı gösterirler (Uccelli ve ark., 2006). Bağışıklık sistemi üzerinde T ve B hücrelerinin yanıtını etkileyebilmede önemli rol oynadıkları çeşitli raporlarla belirtilmiştir. T hücreleri üzerindeki etkisi; proliferasyonunu, sitokin salgılanmasını ve sitotoksisiteyi baskılanması ve Th1 / Th2 dengesini düzenlenmesidir (Selmani ve ark., 2008). MKH' ların B hücreleri üzerindeki etkisi; canlılığını arttırır, çoğalmalarını inhibe edebilir ve hücre döngüsünü durdurabilir. Ayrıca antikorların salgılanmasını ve B hücrelerinin ortak uyarıcı moleküllerinin üretimini etkiler (Corcione ve ark., 2006).



Şekil 1.3: Mezenkimal kök hücrelerin elde edilebileceği kaynaklar ve farklılaşabileceği hücreler (Tavakoli ve ark., 2020).

1.4. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

Klinik deneyler ve güvenilir bir kök hücre ürünü oluşturmak için MKH ‘ları homojen bir şekilde izole etmek gerekmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin homojenliğini doğrulamak amaçlı spesifik hücre yüzey belirteçlerini hedefleyen antikorları kullanır (Karaöz ve ark., 2010). Bu antikorlar MKH'lar için kesin olarak spesifik değildir. Fakat mezenkimal kök hücrelerin kimliğini oluşturmak için yeterlidir. Kültürlenen MKH kolonileri CD105, CD73 ve CD90'ı eksprese eder. MKH’ların CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19 ve HLA -DR ekspresе etmediği bilinmektedir (Karaoz ve ark., 2009).

Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ICST) tarafından CD105, CD73 ve CD90 MKH kültürlerinin %95' inden fazlasında ifade edilen birincil belirteçler olarak kabul edilmiştir (Ugurlu & Karaoz, 2020).

Tablo 1.1: Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklı Doku Kaynaklarından Farklılaşma Potansiyeli ve ilgili yüzey belirteçleri.

Kaynak	Hücre Yüzey Belirteçleri	Farklılaşması	Referans
Kemik iliği	Pozitif: SH2, SH3, CD29, CD44, CD49e, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD120a, CD124	Adipojenik,	(Mamidi ve ark., 2012)
	Negatif: CD34, CD45, CD19, CD3, CD31, CD11b, HLA - DR	Kondrojenik,	
		Osteojenik	
Göbek kordonu	Pozitif: CK8, CK18, CK19, CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, HLA - I, HLA - II	Adipojenik,	(Miao ve ark., 2006)
Göbek kordonu kanı	Negatif: CD14, CD31, CD33, CD34, CD45, CD38, CD79, CD133, vWF, HLA - DR	Kondrojenik,	
		Osteojenik,	
		Endotel benzeri hücreler,	
		Nöron benzeri hücreler	
Wharton jeli	Pozitif: CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA - I	Adipojenik,	(Salehinejad ve ark., 2012)
	Negatif: CD14, CD34, CD45, CD31, HLA II	Osteojenik	
Yağ dokusu	Pozitif: CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA - I, HLA - ABC	Adipojenik,	(Wagner ve ark., 2005)
	Negatif: CD10, CD14, CD24, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD117, CD133, SSEA4, CD106, HLA - II, HLA - DR	Kondrojenik,	
		Osteojenik,	
		Nörojenik,	
Amniyotik sıvı	Pozitif: SH2, SH3, SH4, CD29, CD44, CD49, CD54, CD58, CD71, CD73, CD90, CD105, CD123, CD166, HLA - ABC.	Adipojenik,	(In 't Anker ve ark., 2003)
	Negatif: CD10, CD11, CD14, CD31, CD34, CD49, CD50, CD117, HLA - DR, DP, DQ, EMA.	Osteojenik,	
		Nörojenik	
Diş pulpası	Pozitif: CD29, CD44, CD90, CD105, CD, SH2, SH3, HLA - DR, CD117, CD146, DPSC - EZ, DPSC - OG	Adipojenik,	(Seifrtová ve ark., 2012)
	Negatif: CD10, CD14, CD34, CD45, HLA - DR, Stro - 1, NGFR	Kondrojenik,	
		Miyojenik,	
		Osteojenik	
Plesanta	Pozitif: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105	Adipojenik,	(Raynaud ve ark., 2012)
	Negatif: CD45, CD34, HLA - DR	Endotel benzeri hücreler, Nörojenik,	
		Osteojenik	
Tükürük bezi	Pozitif: CD13, CD29, CD44, CD49f, Thy - 1, CD90, CD104, p75NGFR, β2 - microglobulin, CD130	Adipojenik,	(Rotter ve ark., 2008)
	Negatif: CD34, CD38, CD45, CD133	Kondrojenik,	
		Osteojenik,	
		Pankreas endokrin,	
Sinovyal sıvı	Pozitif: CD10, CD166, CD44, CD54, CD90, CD105, CD147, D7 - FIB, STRO - 1	Adipojenik,	(Morito ve ark., 2008)
	Negatif: CD31, CD34, CD45, CD106, CD117, CD166, VEGFR2, Flk - 1, CXCR4, BMPR - 1A, NGFR	Kondrojenik,	
		Osteojenik	

1.5. 2B Kültürün Kısa Geçmişi

İlk olarak 1907'de hücre kültürü Harrison tarafından kurbağa embriyolarından eksplante edilmiş sinir liflerinin kökeni araştırılırken geliştirdi. Geliştirdiği 2B kültür tekniğinde zamanla üzerinde iyileştirmeler yapıldı. Hücrelerin daha kolay büyümesi, beslenmesi için kaplar ve hücrelerin besin kaynağı olarak kullanılan kan plazmasının sentetik ortam kullanımına dönüştürülerek besiyerleri geliştirildi. Hücre mantar ve bakteri enfektesini önlemek için antibiyotikler ve mantar önleyici maddeler geliştirilmiştir (Breslin & O'Driscoll, 2013).

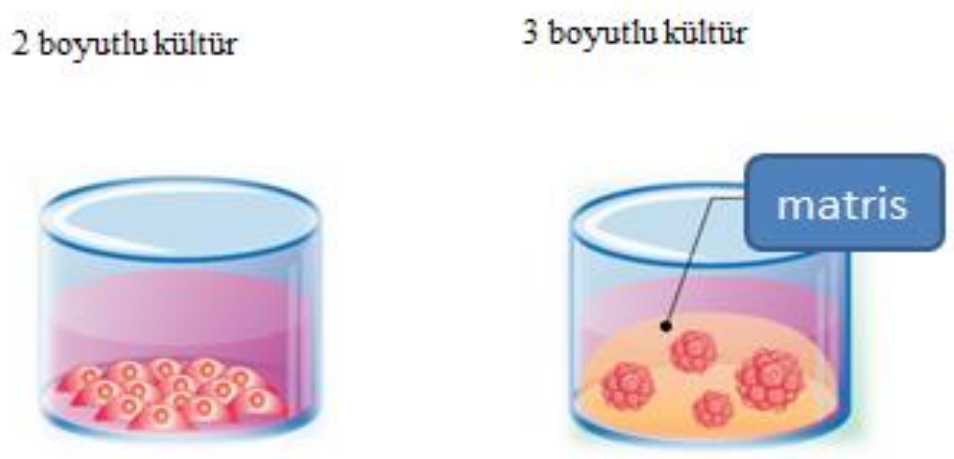
1.6. 2B ve 3B Hücre Kültürlerinin Genel Özellikleri

İki boyutlu hücre kültürü, 1900'lerin başından beri hücreler için kullanılan yöntem olmuştur. Geleneksel 2B hücre kültürü, düz bir yüzeye düz bir yüzeye, kültür şişesine, cam veya polistiren kabına yapıştırmaya dayanır (Breslin & O'Driscoll, 2016). Bu hücrelerin yapışması, yer değiştirmesi ve yayılması x-y düzlemi ile sınırlıdır (Costa ve ark., 2018). 2B kültürün basit ve düşük maliyetli olması avantajlı olabilir, ancak böyle bir kültür *in vivo* ortamı taklit edemez (LaBarge ve ark., 2007). Bu basit ve gerçekçi olmayan koşullar altında büyüyen hücreler, gerçek dokuların temel fizyolojisini tam olarak yansıtmamaktadır. 2B'de kültürlenen hücreler, polarize hücre yapışmasına ve komşu hücrelerle iki boyutlu temasa yol açan tek tabakalarda büyür. Bu fiziksel özellik onların çevreden homojen besinleri ve büyüme faktörlerini almalarına izin vererek anormal hücre yayılmasına, gerçekçi olmayan hücre reseptör dağılımına neden olur (Kramer ve ark., 2013). 2B kültürlenmiş hücreler dokuların doğal yapısını taklit edemedikleri için, dokularda olduğu gibi hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini temsil edemezler. Bu etkileşimler; hücre farklılaşması, çoğalması, canlılığı, gen ve protein ekspresyonu, uyaranlara yanıt, ilaç metabolizması ve diğer hücresel işlevlerden sorumludur (Lei ve ark., 2014).

2B kültürün dezavantajlarına ve sınırlamalarına karşı *in vivo* doğal sistemler ile daha güvenilir ve karşılaştırılabilir 3B kültür sistemleri geliştirilmiştir (Rosso ve ark., 2004). 3 boyutlu yapıların, hücrelerin bulunduğu mikro çevreye daha doğru bir şekilde benzeme yeteneği gösterir. Bu 3 boyutlu kültürlenmiş hücrelerin davranışını etkiler (Langhans, 2018a). *In vivo* koşulların hücre morfolojisi, farklılaşması, polaritesi,

proliferasyon hızı, gen ekspresyon profilleri ve hücre heterojenliğini sunar (Redmond ve ark., 2021).

3D kültür sistemlerinde büyütülen hücreler, matris üzerinde veya süspansiyon ortamında sferoidler oluşturur. Oluşan hücre kürelerinde, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri doğal ortama daha yakın davranır, bu nedenle hücre morfolojisi vücuttaki doğal şekline çok benzer (Cesarz & Tamama, 2016; Redmond ve ark., 2021).



Şekil 1.4: 2B ve 3B Kültür (Chaicharoenaudomrung ve ark., 2019).

1.7. 2B ve 3B Kültürlerde Proliferasyon, Hücre Morfolojisi ve Popülasyon

2B kültüründe hücreler düz bir yüzeye tutunur. Bu düz tabakada hücreler büyüme sırasında besin ve büyüme faktörlerini homojen miktarda alır (Hongzhou Huang ve ark., 2013). 2B kültür; hücre morfolojisi, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, gen ve protein ekspresyonu gibi hücresel süreçleri etkiler (Tibbitt & Anseth, 2009). Bunun sebebi iki boyutlu kültürlerde hücreler vücut içindeki davranışlarını sergileyemezler. Hücrelerin *in vivo* ortamdaki davranışlarını taklit edebilmeleri için 3B kültürlere başvurulmuştur (D. H. Kim ve ark., 2012).

3 boyutlu kültürlerde hücreler matris içinde veya üzerinde sferoidler oluşturur. Hücreler bu şekilde *in vivo* ortamdaki hücre-hücre, hücre-ECM etkileşimlerini taklit

eder ve böylece hücreler morfolojik olarak vücuttaki doğal şekline çok benzer (Cesarz & Tamama, 2016).

Hücre hattına, matrisine göre 3B ve 2B ortamda çoğalma hızında farklılıklar görülür. Çeşitli hücre hatlarında 2B kültüre kıyasla 3B kültürdeki prolifresyon oranı daha düşüktür. Örneğin 3B kültürlenmiş endometriyal kanser hücre hattı 2B kültürdeki hücrelere göre profilerasyonu azalmıştır (Chitcholtan ve ark., 2012). Bazı hücre hatlarında ise 3B kültürlerdeki çoğalma hızı tam tersi durumu göstermektedir. Örneğin meme kanseri hücrelerinde 3B kültürde 2B'dekinden 1.86 kat daha hızlı çoğalma gözlemlenmiştir (Hongisto ve ark., 2013). Genellikle 3B kültürlerde tümörlerin çoğalma hızı *in vivo* ortama benzemektedir.

Hücre canlılığı 3B kültürle ve 2B kültürde karşılaştırıldığında 1-5 gün arasında büyük bir fark gözlenmemektedir (Gurski ve ark., 2009). Kültür süresi uzadığında 3 boyutta hücre canlılığı düşmektedir. Bunun sebebi sferoidlerin yapısından kaynaklıdır. Yapısal olarak küremsi bir şekilde oldukları için sferoid büyüdükçe iç kısımlarına doğru besin ve oksijen alımı zorlaşır. Bu da hücre canlılığını olumsuz yönde etkiler (Tamama ve ark., 2011).

1.8. 2D kültür karşısında 3D kültürlerde protein ve gen ifadesi

İki ve üç boyutlu kültürlerde gen/veya protein ekspresyonu farklılıkları hücreler üzerinde büyüme, proliferasyon, morfoloji, göç ve ilaç duyarlılığı gibi birçok değişikliğe neden olur (Mueller-Klieser, 1997). Çeşitli kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmada, doğal ortamdan *in vitro* ortama geçen kanser hücreleri gen ekspresyon seviyelerinde değişiklik göstermiştir. Ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, genlerin %30'u *in vitro* ortamda farklı eksprese edildiği gösterilmiştir (Birgersdotter ve ark., 2005).

Hücre büyüme ve proliferasyon genleri genellikle 2B ortamlarda daha fazla eksprese edilir. Tam tersi olarak büyüme ve proliferasyonu sınırlayan genlerin ekspresyonu bastırılır. Bu da hücrelerin 3B kültür ortamına kıyasla 2B kültürde daha hızlı çoğaldığını destekler (Birgersdotter ve ark., 2005).

Hücreler 2B ortamda kültürlendiklerinde *in vivo* özellerini kaybeder. Fakat hücreler tekrar ECM'ye benzer bir *in vivo* ortama konulduğunda morfoloji,

proliferasyon ve gen/protein ekspresyonundaki değişiklikler kendini yeniler. 3B ortamlar hücrelerin *in vivo* benzeri gen/veya protein ekspresyon seviyelerinin korunmasını sağladığını göstermiştir (Kenny ve ark., 2007).

1.9. 2B ve 3B Kültürlerin Karşılaştırılması

Tablo 1.2: 2B ve 3B Kültürlerin Karşılaştırılması

	2D	**3D**	Referans
Kültür oluşma Zamanı	Dakikalar içinde	Birkaç saat- Birkaç gün	(Costa ve ark., 2016)
Kültür maliyeti	3B kültürü kullanmaktan daha ucuz	2B kültürden daha pahalı ve zaman alıcı	(Ravi ve ark., 2015)
Hücre şekli/ morfolojisi	Yüzeyde hücreler düz ve uzundur	Hücreler 3 boyutlu kümeler / sferoidler halindedir.	(Langhans, 2018a)
Hücre çoğalması	*İn vivo* dan daha hızlı	Hücre tipine ve 3B model sistemine bağlı olarak 2B kültürden daha hızlı veya daha yavaş	(Ravi ve ark., 2015)
Kültür çevresi ile etkileşimi	Tek katmanlı hücreler, kültür ortamındaki bileşenlerle eşit şekilde etkileşir	Küresel yapının iç katmanlarındaki hücreler, kültür ortamındaki bileşenlere yeterince maruz kalmayabilir.	(Langhans, 2018a)
Gen / Protein ekspresyonları	*In vivo* modellere kıyasla farklıdır, farklı gen ve protein ekspresyon seviyelerini gösterir	*In vivo* gen / protein ekspresyonlarına benzer	(Costa ve ark., 2016), (Szot ve ark., 2011)
İlaç duyarlılığı	Hücreler ilaçlara karşı çok az direnç gösterir ve ilaçları iyi metabolize eder	Hücreler ilaçlara karşı daha dirençlidir ve ilaçları çok iyi metabolize eder	(Hongisto ve ark., 2013)
Kullanım ve analiz	Yüksek düzeyde tekrarlanabilir, uzun vadeli kültür ve yorumlanması kolay	Tekrarlanabilmesi ve kültürleri yorumlamak zordur	(Kapałczyńska ve ark., 2018)
Kök hücre gelişimi	2D kültürlerdeki kök hücreler yavaş gelişir	3B kültürlerdeki hücreler, 2B kültürlerdekinden daha hızlıdır	(Feng ve ark., 2021)

1.10. 3 Boyutlu Kültür Teknolojileri

Günümüzde hücreleri 3 boyutlu yapılara dönüştürmek için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bunlar; çok hücreli sferoidler, organoidler, iskele ve hidrojeller, yonga organları ve 3B biyobaskı teknolojileri olarak düşünülebilir. Her tekniğin kendi avantajları ve dezavantajları vardır ve tek bir model tüm uygulamalar için uygun değildir. Her 3B kültür tekniği hem ilke hem de protokol açısından farklı olsa da, amaç morfolojik, işlevsel ve mikro çevresel yönlerden *in vivo* hücrelerin benzer özelliklerini sağlamaktır. Bu bölüm, her tekniğin temel özelliklerini kısaca açıklamayı amaçlamaktadır (Souza ve ark., 2018).

1.10.1. Sferoid

Çok hücreli sferoid kültürler Sutherland ve ark. tarafından 1970 yılında insan tümör hücrelerinin fonksiyonel fenotipini ve radyoterapi tepkilerini araştırmak için geliştirilmiştir (Sutherland ve ark., 1970). Sferoid kültürler, tek tabakalı kültürlerde görülen birçok eksikliği telafi eder. Örneğin sferoidler; oksijen, besin, metabolit ve çözünür sinyal gradyanlarını iyileştirebilir. Böylece heterojen hücre popülasyonları oluşturabilir (Irvine & Venkatraman, 2016).

Sferoid kültür sisteminde kültürlenen kök hücrelerin morfolojisi, tek tabakalı kültür sistemindeki hücrelerin morfolojisinden farklıdır. Sferoid kök hücreler, hücrelerin proliferasyonunu, canlılığını ve göçünü etkileyen daha yüksek seviyelerde sitokin ve kemokin salgılar ve ayrıca tek katmanlı kök hücrelerde salgılananlardan daha yüksek anjiyogenez salgılar. Hipoksinin neden olduğu gen ekspresyonunun yukarı regülasyonu ile düzenlenen sferoid kök hücreler, artırılmış canlılığa, anjiyojenik faktörlerin ve kemokinlerin salgılanmasına sahiptir. Ek olarak sferoidlerin mezenkimal kök hücreleri, hücre-hücre dışı matris etkileşimleriyle fenotipik özelliklerini korurlar (Cesarz & Tamama, 2016).



Şekil 1.5: Sferoid yapı (Langhans, 2018b).

1.10.2. Organoid

Organoidler, embriyonik kök hücrelerden, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden veya yetişkin kök hücrelerden gelişen, memelilerdeki orijinal dokuların yapısal ve fonksiyonel özelliklerini taşıyan organ benzeri 3 boyutlu *in vitro* kültür sistemleridir (Lancaster & Knoblich, 2014).

"Organoid" terimi, hücre "sferoid" veya "agregat" ile karıştırılabilir. Sferoidler genellikle bir veya daha fazla hücre çizgisi kullanılarak elde edilen 3 boyutlu hücre peletleridir. Bu yapılardaki hücreler, orijinal organda oldukları için organize olmazlar ve genellikle organ fonksiyonları göstermezler. Organoidler, hem fiziksel hem de işlevsel olarak orijinal dokuya en çok benzeyen yapılardır.

Organoidler, organ tomurcuklarının nasıl oluştuğuna bağlı olarak doku ve kök hücre organoidleri olarak sınıflandırılır (Huch & Koo, 2015). Doku organoidleri, çoğunlukla doku benzeri yapılarda kendi kendine organize olabilmeleri nedeniyle epitel hücrelerine uygulanır. Kök hücre organoidleri, embriyonik kök hücrelerden (ECS'ler) veya uyarılmış pluripotent kök hücrelerden (iPSC'ler) veya dokuda bulunan neonatal doku kök hücreleri veya yetişkin kök hücreler gibi birincil kök hücrelerden üretilir (Shamir & Ewald, 2014).

Organoidler, biyomedikal uygulamalarda, ilaç geliştirmede ve kişisel tedavide büyük potansiyele sahip olan yapılardır. Gen ifadesini manipüle etmeye uygun yapılar oldukları için gen mutasyonlarının araştırılmasında kullanılırlar.

1.10.3. Yapı İskeleleri ve Hidrojeller

İskeleler, belirli bir dokunun matris özelliklerini taklit edebilen yapılardır. Hücreler için yapışma, proliferasyon ve farklılaşma için bir platform sağlar. Yapı iskeleleri farklı geçirgenlik, gözenek ve yüzey kimyası özelliklerine sahip biyouyumlu üç boyutlu destek elemanlarıdır. İskelenin içine yerleştirilen hücreler, iskele liflerine bağlanabilir ve lifler arasında yer değiştirebilir. Lifler arasındaki boşluk, hücrelerin büyümesi ve bölünmesiyle doldurulur ve böylece üç boyutlu yapılar oluşur (Kraehenbuehl ve ark., 2011).

Malzeme özelliklerinin hücreler üzerindeki etkilerine örnek olarak iskele özellikleri; saf mezenkimal kök hücrelerin soylarını koruduğunu, bu durumun substrat mekanik sertliğine aşırı duyarlı ve fenotiplere bağlı olduğu gösterilmiştir. MKH, yumuşak matrislerde nörojenik özelliktedir, ancak kemiği taklit eden nispeten sert matrislerde miyojenik ve osteojeniktir. Çözünür faktörlerle muamele edildikten sonra, MKH'ların matris esnekliği ile belirlenen soylara göre farklılık gösterdiği bulundu (Griffith & Swartz, 2006).

Hidrojeller, çapraz bağlı polimer zincirlerinden veya doğal/sentetik kökenli protein molekülleri ağlarından oluşur. Doğal dokuya çok benzer olup, 3B kültür için oldukça etkili destek malzemesidir. Hidrojellerin mekanik ve biyokimyasal özellikleri hücre yapısı, migrasyonu ve yapışması gibi araştırılmalar için avantaj sağlar (Tibbitt & Anseth, 2009).

1.10.4. Çip-Üstü-Organlar

Çip üstü organ (Organ-on-a-chip) teknolojisi, cam veya polimer malzemeler içerisine özel tasarlanmış kanalları kapsayan ve organların mekaniğini, fonksiyonlarını ve fizyolojik özelliklerini taklit eden 3 boyutlu hücre kültürü yapılarını yerleştiren bir teknolojidir (Khademhosseini ve ark., 2006). Bu teknoloji sayesinde, 3 boyutlu mikro akışkan hücre kültürü çipleri oluşturulmuş ve ilk kez insan organlarının *in vitro* olarak modellenmesi mümkün olmuştur (Huh ve ark., 2011). Çip organlar, bir organ tipinin veya bir hastalık modelinin özelliklerini taklit edebilen yapılardır. Hastalıklar üzerinde fenotipik incelemeler ve farmakolojik tepkileri test etmek için kullanılırlar. Çip

organlar, *in vitro* koşullarda test ve analizlerin kolay ve güvenli bir şekilde yapılmasını mümkün kılar (Sarkar ve ark., 2015).

1.10.5. 3B Biyoyazıcılar

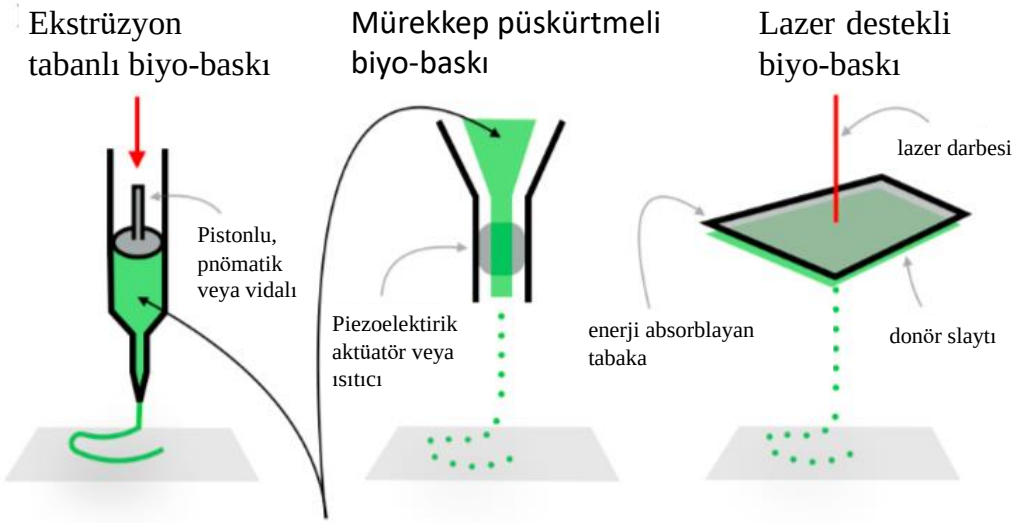
3B baskı, 1986 yılında Charles W. Hull tarafından geliştirilen ve orijinal olarak "stereolitografi" olarak adlandırılan bir tekniktir (Alonzo ve ark., 2019). 3B baskı, karmaşık bir yapıyı yüksek hassasiyetle üretmek için kullanılan hızlı bir prototipleme ve eklemeli üretim tekniğidir (Zhang & Wang, 2019).

3B biyoyazıcı, canlı hücreleri hidrojel bazlı iskele ile birlikte depolayan bilgisayar destekli bir üretim sürecidir (Alonzo ve ark., 2019; Choudhury ve ark., 2018). 3D bioprinting baskı işlemi beş aşamadan oluşur: 1) hedef dokunun taranması yapılır; 2) model, görüntüleme girdisi kullanılarak CAD-CAM yazılımı ile geliştirilir; 3) Yazdırılacak dokuya göre biyomateryal iskeleler ve hücreler seçilir. 4) Doku, biyoyazıcı kullanılarak yazdırılır; 5) Biyopsi dokusunun olgunlaşmasına izin verilir (Alonzo ve ark., 2019).

3B biyo-baskı mürekkep püskürtmeli, ekstrüzyon tabanlı ve lazer destekli baskı olarak ayrılır. Her birinin kendine özgü uygulamaları, avantajları, kusurları ve sınırlamaları vardır (Midha ve ark., 2019). Mürekkep püskürtmeli baskı ve ekstrüzyon, 3B baskı mühendisliği teknolojisine odaklanır (Zhang & Wang, 2019).

Bugüne kadar, organ sisteminin eksiksiz üretimini başarıyla sağlayabilecek hiçbir biyoyazıcı yöntemi bulunmamaktadır. Uygun bir 3B biyoyazıcı seçerken dikkat edilmesi gereken noktalar; biyoink üzerine uygulanan basınç, biyo-bağın dağıtılması için gereken süre, biyoink'in viskozitesi ve çapraz bağlama yöntemleridir (Midha ve ark., 2019).

3B biyoyazıcı, hücrelerin, proteinlerin, DNA'nın, ilaçların, büyüme faktörlerinin ve diğer biyoaktif malzemelerin yerleşimi üzerinde hassas mekansal-zamansal kontrol sağlar. Hastaya özel tedavi amaçlı doku oluşturmak için kullanılır (Zhang & Wang, 2019).



Şekil 1.6: Biyoyazıcı çeşitleri (Axpe & Oyen, 2016).

1.10.5.1. Ekstrüzyon tabanlı biyo-baskı

Ekstrüzyon baskı, mürekkep püskürtmeli baskının bir modifikasyonudur. Ekstrüzyon bazlı biyo baskı, biyoink'i syink-inge veya nozul tabanlı bir sistemden basılı yapının CAD tasarımına dayalı bir yapı platformuna bırakır (Leberfinger ve ark., 2019). Bu sistemde biyo-mürekkepleri dağıtmak için bir hava pompası veya mekanik bir vidalı piston kullanır. Bu sistemde biyoinki sürekli bir kuvvet uygulayarak sürekli silindirik çizgiler halinde baskı yapabilir. Bu nedenle, yapışkan malzemeleri basmak için mürekkep püskürtmeli yazıcılar uygun olmadığından ekstrüzyon tabanlı biyo-baskı sistemleri kullanır (Mandrycky ve ark., 2016).

Ekstrüzyon tabanlı sistemlerin, yaygın kullanımı çoğunlukla sade ve net bir yönteme sahip olmaya dayanır (Derakhshanfar ve ark., 2018). Baskıdan sonra hücre canlılığı genellikle % 40 ile % 80 arasındadır. Biriktirme hızı, basınç, sıcaklık ve malzeme seçimi gibi baskı parametrelerinin kontrolü ile hücre canlılığı %97' ye kadar çıkabilir (Leberfinger ve ark., 2019). Mürekkep püskürtmeli baskı ile karşılaştırıldığında, ekstrüzyon tabanlı baskı daha yüksek hücre yoğunlukları, ancak daha düşük hız ve çözünürlük sunar (Derakhshanfar ve ark., 2018). Üç tür baskı tekniği arasında ekstrüzyon tabanlı baskı tekniği, 10 ila 50 µm / s aralığında en düşük baskı hızına sahiptir (Ma ve ark., 2018).

Diğer işlemlerle karşılaştırıldığında, iskeletsiz mürekkepler (doku küreleri ve teller gibi) veya iskele bazlı mürekkepler (hidrojeller gibi) dahil olmak üzere çok çeşitli biyo-mürekkepler kullanılabilir (Leberfinger ve ark., 2019). Bioink, nozül tıkanmasını önlemek için sıvı fazda olmalıdır (Derakhshanfar ve ark., 2018). Ekstrüzyon tabanlı sistemlerde kapsüllenmiş hücreler mekanik strese maruz kaldığından, hücre canlılığında azalma meydana gelir. Sistemdeki mekanik güç çok çeşitli malzeme basımı için elverişlidir (Mandrycky ve ark., 2016).

Kemik, kıkırdak ve organoid gibi mikro ölçekli özelliklere sahip olmayan doku modelleri, ekstrüzyon bazlı biyoyazıcı kullanılarak güvenli bir şekilde oluşturulabilir. (Ma ve ark., 2018).

1.10.5.2. Mürekkep püskürtmeli biyo-baskı

Mürekkep püskürtmeli biyoyazıcı, biyoink damlacıkları içeren katmanları ayrı katmanlarda biriktirerek 3B nesneler oluşturan temassız bir yöntemdir (Luo ve ark., 2018). Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, inkjet baskı mürekkep püskürtmeli baskıya göre hızlı üretim sunar ancak düşük hücre yoğunlukları sağlar. Üç sistem arasında termal yaklaşım, baskı sonrası yüksek hücre canlılığı, kullanıcı dostu tasarım ve genellikle daha düşük maliyet nedeniyle daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Ma ve ark., 2018).

Termal inkjet baskının, 200 °C'yi aşabilen çok yüksek sıcaklıklardan kaynaklanan aktivite kaybından dolayı doku mühendisliğinde yaygın olmadığı unutulmamalıdır (Derakhshanfar ve ark., 2018).

Mevcut mürekkep püskürtmeli biyoyazıcılar saniyede yüzlerce milimetre ve saniyede 20 μm'ye kadar yüksek baskı çözünürlüğü sağlar (Luo ve ark., 2018; Ma ve ark., 2018). Basılı yapıların çözünürlüğü nozül çapına ve bioink'in özelliklerine bağlıdır. Küçük çaplı püskürtme uçları genellikle daha yüksek baskı çözünürlüğü sağlar, ancak aynı zamanda tıkanma potansiyelini de artırır. Bu nedenle mürekkep püskürtmeli yöntemle basılabilen malzemeler sınırlıdır. Biyomürekkepler, mürekkep kartuşuna ilk yüklendiğinde iyice karıştırılır. Biyoink'in viskozitesi arttıkça yazıcı kafası tıkanır (Mandrycky ve ark., 2016). Tıkanma olasılığını en aza indirmek için yalnızca düşük

viskoziteli malzemeler veya su bazlı malzemeler kullanılır. Malzeme üzerindeki sınırlamalar, baskı hızının yavaşlamasına ve termal stres nedeniyle hücre hasarına neden olabilir (Ma ve ark., 2018).

Mürekkep püskürtmeli baskının avantajları şunları içerir: ticari yazıcılara benzer yapı nedeniyle düşük maliyet, yüksek baskı hızı ve birçok deneysel sonuçla belirlenen hücre canlılığı mevcuttur (Mandrycky ve ark., 2016).

1.10.5.3. Lazer destekli biyo-baskı

Bu tekniğin platformu yukarıdan aşağıya üç katmandan oluşur: enerji soğurucu katman, verici katman ve bioink katman (Luo ve ark., 2018). Sistemin önemli bir parçası, uygulanan lazer ışınına yanıt veren bir verici katmandır. Bu katmanın üstüne bir enerji soğurucu katman eklenir. Enerji soğurucu katmana seçici bir lazer ışını uygulandığında, verici katmanın karşılık gelen konumu buharlaşır ve ara yüzde yüksek basınçlı bir kabarcık oluşturur (Sarker ve ark., 2018). Verici katmanın ve alıcı alt katmanın hareketini kontrol ederek, önceden tasarlanmış yapılara sahip 3B nesneler üretilebilir (Heinrich ve ark., 2019; Luo ve ark., 2018).

İki tür lazer destekli biyo-baskı esas olarak dokuya uygulanır; Dijital lazer işleme (DLP) tabanlı baskı ve lazer tabanlı stereolitografi (LS). DLP tekniği, detaylı olmayan büyük yapılar için uygundur. Lazer tabanlı stereolitografi (LS), 3B vasküler ağlar oluşturmak için birden çok 2B düzlemsel yüzeyin birleştirilmesini ortadan kaldırmak için geliştirilmiştir. LS, büyük ve ayrıntılı vasküler yapıları yazdırmak için daha uygundur. Bu teknikte, bilgisayar kontrollü altındaki ultraviyole lazer ışını, ışığa duyarlı bir model üzerinde bir desen oluşturur. Araştırmacılar LS tekniği ile vazküler ve karmaşık yapılar basarak verimli sonuçlar elde ettiler (Sarker ve ark., 2018).

Özellikle, dijital lazer projeksiyon (DLP) ve lazer tabanlı stereolitografi, CAD yazılımı, bilgisayar tomografisi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) taranmış bilgilerden geliştirilen tasarımlara dayanan karmaşık mimarileri yazdırmak için kullanıldı (Sarker ve ark., 2018).

Mürekkep püskürtmeli baskı ile karşılaştırıldığında, lazer destekli baskı, dağıtıcı ve biyo-mürekkepler arasındaki teması önleyebilir (Heinrich ve ark., 2019; Mandrycky ve ark., 2016). Baskının temassızlığı, hücrelerde strese neden olmadığından, yüksek

hücre canlılığı ile sonuçlanır. Lazer destekli baskı, yüksek viskoziteli malzemeleri de basabildiği gibi yüksek çözünürlüğe sahiptir (Leberfinger ve ark., 2019; Mandrycky ve ark., 2016; Sarker ve ark., 2018). En büyük avantajı, iyi hücre yoğunluğuna sahip birden çok malzemeyi basabilmesidir. Çoklu hücre tipi baskı, karmaşık organ ve dokuların yazdırılması için avantajlar sağlar (Leberfinger ve ark., 2019) .

Çeşitli çalışmalarda, damar hücreli ve kılcal oluşumlu desenli yapıları basmak için lazer bazlı biyoyazıcı kullanıldı. Örneğin, HUVEC'leri ve insan mezenkimal kök hücrelerini kalp yamasında tanımlanan bir modelde yazdırmak için LIFT tabanlı hücre yazdırma tekniğini kullanan bir çalışma, enfarktüslü kalplerin artmış kılcal yoğunluğu ve fonksiyonel iyileşmesini bildirdi (Sarker ve ark., 2018).

Bu sistemde yüksek çözünürlük ve hızlı baskı avantajdır. Dezavantajı ise çok yüksek maliyetli olmasıdır (Heinrich ve ark., 2019; Sarker ve ark., 2018).

Tablo 1.3: 3B hücre kültürü çalışmalarında kullanabilecek malzemeler

Malzeme	Özellikleri	Referans
Sentetik malzemeler		
Poli (laktik asit) (PLA)	İyi mekanik dayanım, lineer yapı, metil grubu sayesinde amorf ve hidrofobik, organik çözücülerde çözünebilir.	(Lasprilla ve ark., 2012)
Poli (glikolik asit) (PGA) ve Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	Yüksek kristallik, yüksek erime noktası, Organik çözücüde çözünmez, hidrofilik, İyi biyouyumluluğu, ayarlanabilir bozunma hızı	(Sabir ve ark., 2009)
Poli (ε-caprolactone) (PCL)	Düşük erime noktası, yarı kristalize yapı, Yavaş bozunma, kontrollü gözenek büyüklüğü	(Giannitelli ve ark., 2015)
Poli (üretan) (PUR)	Lif oluşturabilme özellikleri, esneklik,	(Giannitelli ve ark., 2015)

Doğal malzemeler		
Kollojen	Vücutta bozunma hızı yüksek, işletilmesi zor, kullanımı zor, sitotoksik yanıt, yüksek su affinitesi, iyi hücre uyumluluğu, lifli yapı, mekanik mukavvemeti düşük	(Dong & Lv, 2016)
Fibrin	Çapraz bağlanabilme, lifli yapı, mekanik mukavemeti zayıftır	(Sheikh ve ark., 2015)
Jelatin	Hücre bağlanmasını, farklılaşmasını ve çoğalmasını destekleme potansiyeline sahip, düşük maliyetli, suda çözünür, kolayca işlenebilir	(Echave ve ark., 2019)
Aljinat	Biyouyumluluk, bozunabilirlik ve düşük immünojeniklik, suda çözünür, kolay işlenebilir	(Sun & Tan, 2013)
Hiyalünorik asit	İyi biyouyumluluk, kolaylıkla bulunabilir, suda çözünebilirlik, hızlı emilim, dokuda kalım süresi kısa	(Cui ve ark., 2015)
Kitosan	Kontrol edilebilir biyobozunurluk, mükemmel biyouyumluluk, işlenebilirlik kolaylığı, kontrol edilebilir mekanik özellikler, düşük mekanik mukavemet ve suda çözünmezlik	(Yang, 2011)
Selüloz	Nano lifli yapı, yüksek kristallik, yüksek gerilme mukavemeti ve iyi biyouyumluluk, işlenmesi kolay, por boyutu küçük	(Puppi ve ark., n.d.)
İpek	Yüksek dayanıklılık, biyouyumluluk, oksijen geçirgenliği, yavaş biyobozunurluk	(Stratton ve ark., 2016)

1.11. GENLER

Çalışmamızda kök hücrelerin 3B ortamda kültüre edildiğinde ekspresyon düzeylerindeki değişim miktarlarını analiz etmek adına seçtiğimiz kök hücre karakterizasyonunda ve farklılaşmada kullanılan genler ve her gen ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

1.11.1. ADİPOJENİK GENLER

LPL

Lipoprotein lipaz (LPL; triacilgliseroprotein acilhidrolaz), triasilgliserol metabolizmasında rol oynayan önemli bir enzimdir. 475 amino asit proteini, kromozom 8p22'ye haritalanmış ve tamamen dizilenmiş olan 30 Kb'lik bir gen tarafından kodlanır. Gen, mRNA belirleyen dizinin 10 ekzona bölündüğü yaklaşık 30 kilobaz (kb) çifti uzunluğundadır (Deeb & Peng, 2002).

Lipoprotein lipaz, lipid metabolizmasında merkezi bir rol oynar ve bu enzimi (LPL) kodlayan gen, kardiyovasküler hastalık için bir aday duyarlılık genidir.

Klinik ve biyokimyasal çalışmalar, LPL'nin metabolizmalarının ilk adımında kilomikronların ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) trigliseritlerini hidrolize etmede anahtar bir rol oynadığını göstermektedir. LPL'nin, bir dizi üç ana işlemden sonra kılcal endotel hücre yüzeyinde işlevsel olarak aktif bir formda alındığına inanılmaktadır: (1) LPL'nin adipositler tarafından sentezi ve salgılanması, (2) LPL'nin adipositlerden kılcal endotel, ve (3) LPL'nin, endotelyumun plazma zarında lokalize olan heparan sülfat proteoglikan zincirlerine bağlanması (Hu ve ark., 2018).

PPAR-G

PPAR'lar, nükleer reseptör transkripsiyon faktörlerinin bir alt ailesidir. PPARα, PPARβ ve PPAR-γ olarak üç izoformdan oluşur (Schmuth ve ark., 2004). *PPARG* insan kromozom 3p25 bulunur. Yağlı asit metabolitleri ya da sentetik ilaçlar tarafından aktive edilen bir nükleer reseptör (PPAR-γ) kodlar.

PPAR-γ esas olarak suprabazal keratinositler, adiposit dokusu, vasküler endotelyal hücreler, makrofaj hücreleri ve düz kas hücrelerinde bulunur. *PPARG geni*, adiposit farklılaşmasını düzenler, lipid ve glikoz homeostazında yer alan genlerin ifadesini kontrol eder. Ayrıca inflamatuar etkilerin üretimini kısıtlar bu sebeble antiinflamatuar etkiye sahiptir. PPARG Obezite, diyabet, ateroskleroz ve kanser patolojisinde rol oynamaktadır (H. Y. Wang ve ark., 2016).

1.11.2. KONDROJENİK GENLER

ACAN

ACAN geni, agrekan proteinin üretilmesi emrini verir. ACAN tarafından kodlanan agrekan, büyüme plakası ve eklem kıkırdağındaki hücre dışı matrisin önemli bir proteoglikan bileşenidir. Agrecan, eklemlerin yük taşıma özellikleri için önemli olan hidratlanmış jel yapısını sağlar ve kıkırdak ve kemik morfogenezinde kilit rol oynar (Fahy ve ark., 2014). Bir çalışmada, kondrositlerde aggrecan (ACAN) ve kollajen (COL10A1) ekspresyonunu yükselmiştir.

COMP

Kıkırdak oligomerik matris proteini (COMP), kıkırdak ve diğer dokulardaki çoklu hücre dışı matris proteinleri ile etkileşime giren büyük bir pentamerik glikoproteindir. COMP'un kollajen sekresyonunda, kondrosit proliferasyonunda ve tendonların mekanik mukavemetinde rol oynadığı bilinirken, COMP fonksiyonlarının tam aralığı tanımlanmaya devam etmektedir. Mutasyonların çoğunluğu kalsiyum bağlanma alanlarındadır ve protein katlanmasını tehlikeye atar. KOMPopatiler, kondrosit ER'de COMP mutasyonu hücresel stresi uyardığı ER depolama

bozukluklarıdır. Mutasyon, kondrosit ölümüne ve uzun kemik büyümesinin kaybına yol açan oksidatif ve enflamatuar süreçlere neden olur. Buna karşılık, COMP ekspresyonunun düzensizliği, fibroz, kardiyomiyopati, meme ve prostat kanserleri dahil olmak üzere birçok hastalıkta bulunur. COMP'nin idiyopatik pulmoner fibroz ve kıkırdak dejenerasyonu ile ilişkili osteoartrit ve romatoid için biyobelirteç olarak ve eklem yaralanması için prognostik bir belirteç olarak kullanılması klinik uygulamalarindan biridir. COMP'nin tek gen bozukluklarında ve multifaktöriyel hastalıklarda sürekli genişleyen rolleri, yeni terapötik yollar geliştirme hedefine doğru ECM ve doku homeostazındaki işlevlerinin daha iyi anlaşılmasına yol açacaktır (Posey ve ark., 2018). Bir çalışmada COMP'in kondrosit proliferasyonunu ve kondrogenezi uyardığı gösterilmiştir (Haleem-Smith ve ark., 2012).

SOX9

SOX9, kondrogenezdeki çoklu olayları düzenleyen bir ana transkripsiyon faktörüdür. Embriyo gelişimi sırasında kondrojenez taahhüdü de dahil olmak üzere hücre kaderi kararları için kritik olan SRY ile ilişkili yüksek hareketlilik grubu (HMG) box (SOX) transkripsiyon faktörleri ailesine aittir. SOX transkripsiyon faktörleri, HMG alanlarının homolojisine dayanarak AH alt gruplarına ayrılır. Bununla birlikte, amino asit dizileri ve HMG alanı dışındaki fonksiyonel alanların varlığı her alt gruba özgüdür.

SOX9, DNA'daki tek veya çift HMG-box bölgelerine etkili bir şekilde bağlanır ve böylece eklem kıkırdağı gelişimi için özelliklere sahip olan Col2a1 (tip II kollajen) ve Acan (Agrekan) gibi hedef genlerini transaktive eder (Song & Park, 2020).

1.11.3. OSTEOJENİK GENLER

ALP

Alkalin fosfatazlar (ALP); ortofosforik monoester fosfohidrolaz (alkalin optimum) plazma membranına bağlı glikoproteinlerdir. Bu enzimler, bazı yüksek bitkiler hariç, prokaryotlar ve daha yüksek ökaryotlar dahil olmak üzere doğada yaygın olarak dağılmıştır. Alkalin fosfataz, genellikle hücre yüzeyi ile sınırlı olan geniş bir

dimerik enzim ailesi oluşturur, inorganik fosfat salınımı ile optimum pH'da çeşitli monofosfat esterlerini hidrolize eder (Breathwaite ve ark., 2020; Sharma ve ark., 2014). Mezenkimal kok hücrelerin osteojenik farklılaşma çalışmalarında analiz amacıyla belirteç olarak da kullanılmaktadır.

BMP2

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında aynı zamanda kemik oluşumunun düzenlenmesinde kemik morfogenetik proteinleri (BMP) önemli rol oynar (Hong Huang ve ark., 2018). Ayrıca sitokin-sitokin reseptör etkileşiminde ve büyüme faktörü TGF- β sinyal yolağında da rol alır. BMP2'nin yapılan çalışmalara göre hücre tiplerinde osteogenezi indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda kemik dejenerasyonunu tedavi etmek, *in vivo* yeni kemik oluşumunu indüklemek için kök hücrelerle beraber BMP2 'nin de kullanıldığı gösterilmiştir (K. J. Kim vd., 2019)

BMP2 klinikte uygulanmak için onaylanmıştır. Fakat hala altta yatan mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır (Hong Huang vd., 2018).

COL1A1

Kolajen, memelilerde en fazla bulunan yapısal proteindir ve çeşitli dokularda ifade edilir (Chang ve ark., 2014). Kolajenler, birçok doku ve organda önemli yapısal roller oynayan hücre dışı matris proteinleridir. 23 genin ürünü olan on üç tip kolajen tarif edilmiştir. Kollajen genlerinin çoğu gelişimsel olarak düzenlenir; belirli bir doku veya hücre tipi, kolajen genlerinin yalnızca bir alt kümesini ifade eder. Omurgalı bağ dokularında en bol bulunan protein olan Tip I kollajen, hiyalin kıkırdak dışındaki çoğu mezenkimal kökenli hücre tarafından üretilir. Her doku veya hücre tipi, tip I kolajen genlerini karakteristik bir oranda ifade eder (Sengupta ve ark., 2005).

Kolajen ekspresyonu, gelişimsel ve dokuya özgü bir şekilde kontrol edilir. İki tip I kollajen geni (*COL1A1* ve *COL1A2*), promoterlerinde farklı düzenleyici sekanslara sahip ayrı kromozomlar içindedir, ancak düzgün çalışmayı sağlamak için koordineli olarak düzenlenmeleri gerekir (Sengupta ve ark., 2005).

RUNX2

Runx2, DNA bağlayıcı etki alanına sahip olan Runx ailesine aittir. Aile, Runx1, Runx2 ve Runx3 genlerinden oluşur. Runx2, Cbfb ile heterodimerize olarak gelişmiş DNA bağlanma kabiliyeti ve protein stabilitesi kazanır. Runx2'nin iki promotörü vardır, P1 ve P2 ve P1'den gelen transkript tip II Runx2'yi kodlar. P2'den gelen tip I Runx2'yi kodlar. Runx2 osteoblastlarda ve kondrositlerde eksprese edilir (Komori, 2019).

Mezenkimal kök hücrelerin osteoblast ve kondrositlere farklılaşması için RUNX2 geninin regulasyonu kilit rol oynamaktadır. Bunun için eksozomları stimule etmenin yanı sıra miRNA'ların upregule edilmesi ile de hücrelerin farklılaşması üzerine çalısmalar sürmektedir (Almalki & Agrawal, 2016).

1.11.4. NÖROJENİK GENLER

AP2

Plazma zarında, iki büyük a ve b2 alt birimi, orta büyüklükte bir m2 alt birimi ve küçük bir d2 alt biriminden oluşan heterotetramerik adaptör protein kompleksi 2 (AP2), endositik çukurlara en bol adaptör koordiating kat alımı ve kargo seçimidir. Son zamanlarda seçilen kargo membran proteinlerinin içselleştirilmesi için diğer alternatif klatrin ile ilişkili sıralama proteinleri (CLASP) tanımlanmıştır. Bu nedenle, sinapslar membran homeostazını korumak için farklı mekanizmalar geliştirmiştir. Yoğun araştırmalara rağmen, endositik yolakların kesin moleküler bileşenleri hakkında öğrenilecek çok şey vardır (Piccini ve ark., 2017).

APache, aksonal işlemlerde ve presinaptik terminallerde önceden preslenmiş, CCV'lerde AP2 ile spesifik olarak etkileşime giren nörona özgü bir proteindir. Çalışmalar, Apache'nin nöronal gelişimde rol oynadığını ve olgun nöronlarda normal SV geri dönüşümünü sürdürmek için gerekli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle APache, sinapsta normal sinaptik iletim için gerekli olan klatrin aracılı endositik mekanizmanın önemli bir aktörü olarak düşünülebilir (Piccini ve ark., 2017).

NESTİN

Nestin, ilk olarak 1990 yılında merkezi sinir sistemi gelişimi sırasında nöronal kök hücre/progenitör hücre belirteci olarak tanımlanan bir ara filaman proteinidir (Lendahl ve ark., 1990).

Ara filaman proteinler altı alt tipte sınıflandırılır, epitel hücrelerinde keratin, mezenkimal hücrelerde vimentin, kas hücrelerinde desmin, nöronal hücrelerde nörofilaman ve glial fibriller gibi spesifik hücre tiplerinde eksprese edilir.

Nestin, merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi, miyojenik ve diğer dokulardaki gelişimin erken evresinde bölünen hücrelerde ifade edilir. Farklılaşma ile nestin aşağı regüle edilir ve dokuya özgü ara filaman proteinleri ile değiştirilir. Bu sebeble yaygın bir şekilde nöronal kök hücre belirteci olarak kullanılır. Nestin ayrıca normal dokulardaki nöron dışı hücrelerde olgunlaşmamış veya progenitör hücrelerde eksprese edilir.

Patolojik koşullarda nestin, merkezi sinir sistemi, kas, karaciğer ve enfarktüslü miyokarddaki onarım süreçlerinde eksprese edilir. Nestin, beyin tümörleri, rahim ve rahim ağzı kanserleri, prostat kanseri, mesane kanseri, baş ve boyun kanserleri, yumurtalık kanseri, testis kanseri, pankreas kanseri ve habis rabdoid tümörleri gibi çeşitli tümör hücrelerinde kanser kök hücre belirteci olarak da belirlenmiştir (Jimeno ve ark., 2009).

TUBB3

TUBB3 nöronal yapı ve işlevinde kritik bir rolü olan ve Merkezi (CNS) ve periferik (PNS) sinir sisteminin oluşumunda bir rol oynamaktadır, insan TUBB3 heterozigot missense mutasyonlarının ciddi beyin ve sinir malformasyonlarına neden olduğunu gösteren kanıtlarla da önerilmektedir. Bir dizi TUBB3 mutasyonu, bazı durumlarda periferik sinir dejenerasyonunun eşlik ettiği kranial sinirlerin primer yanlış yönlendirilmesine neden olur ve ikinci bir seri, kortikal gelişim ve pontoserebellar hipoplazinin primer malformasyonları ile sonuçlanır. Bir dizi TUBB3 mutasyonu, bazı durumlarda periferik sinir dejenerasyonunun eşlik ettiği kranial sinirlerin primer yanlış yönlendirilmesine neden olur ve ikinci bir seri, kortikal gelişim ve pontoserebellar hipoplazinin primer malformasyonları ile sonuçlanır (Latremoliere ve ark., 2018).

1.11.5. MEZENKİMAL GENLERİ

CD44

CD44 geni 20 ekzona sahiptir ve standart formu 1–5, 16–18 ve 20 ekzonları tarafından kodlanır. N-terminal sinyal dizisi (ekzon 1), Link-homoloji hiyalüronan bağlanma modülü (ekzon 2 ve 3), gövde bölgesi (ekzon 4, 5, 16 ve 17), transmembran alanı (ekzon 18) ve sitoplazmik alan (ekzon 20)dır. Ayrıca, kapsamlı alternatif ekleme ile oluşturulan çok sayıda CD44 vardır (Dzwonek & Wilczyński, 2015).

CD 44 tip I transmembran glikoproteinidir. Hücre farklılaşmasını, hücre göçünü, hücre-hücre ve hücre-matriks yapışmasını, hücrenin hayatta kalmasını sağlamak gibi hücresel faaliyetler ile ilgilidir (Chen vd, 2020). Ayrıca epitelden mezenkimale geçiş ve metastaz gibi süreçlerde de anahtar rol oynar (Márquez-González vd., 2020).

CD44 transmembran protein ailesinin üyeleri, hematopoez, bağışıklık sistemi, organogenez ve kanser gibi birçok süreçte işlevlere sahiptir (Ponta vd., 2003).

CD90 / THY1

CD90 olarak da bilinen timus hücre antijeni 1 (THY-1), ilk olarak timoma hücrelerini tanıyan spesifik antikorların araştırılması sırasında tanımlandı. Geçmişte, THY-1 esas olarak spesifik hücreler veya lipit bakımından zenginleştirilmiş hücre altı fraksiyonları için bir belirteç olarak kullanıldı veya alternatif olarak, THY-1 hücreye özgü gen ekspresyonu / silinmesi için kullanıldı. Örneğin, THY -1'e özgü antiseralar, T ve B hücreleri arasında ayrım yapabilen ilk reaktiflerdi. Bununla birlikte, Thy-1 eksikliği olan farelerin son çalışmaları ve analizleri, belirli hücre tiplerinin bir belirteci olmanın ötesinde önemli fonksiyonel etkisini ortaya koymuştur. Thy-1'in fibroblastlar, nöronlar, endotel hücreleri ve timositler üzerindeki yapısı, ekspresyonu ve işlevi zaten mükemmel bir şekilde gözden geçirilmiştir. Uzun yıllar boyunca, Thy-1 MKH'lar tanımlamak için bir belirteç olarak kullanılmıştır.

MKH'larda ifade edilen CD90 olarak da bilinen (THY-1), MKH'ların kader kararında kritik bir rol oynamaktadır. Son zamanlarda, THY-1'in MKH'ların osteojenik

farklılaşmasını ve dolayısıyla kemik oluşumunu teşvik ettiği, adipogenik farklılaşmayı inhibe ettiği ve yağ dokusu birikimini kısıtladığı gösterilmiştir (Saalbach & Anderegg, 2019).

VIM

Vimentin, bir tip III ara filament proteinini kodlar. Ara filamentler, mikrotübüller ve aktin mikrofilamentleri ile birlikte hücre iskeletini oluşturur. Kodlanmış protein, hücre şeklini ve sitoplazmanın bütünlüğünü korumaktan ve hücre iskeleti etkileşimlerini stabilize etmekten sorumludur. Bu protein, kolesterol taşınmasında rol oynar ve hücre bağlanma, göç ve sinyalleşmede rol oynayan bir dizi diğer kritik proteinin organizatörü olarak işlev görür. Bakteriyel ve viral patojenlerin konakçı hücre yüzeyinde bu proteine bağlandığı gösterilmiştir. Bu gendeki mutasyonlar, insan hastalarda konjenital katarakt ile ilişkilidir.

Vimentinler, çeşitli epitel dışı hücrelerde, özellikle mezenkimal hücrelerde bulunan sınıf III ara filamentlerdir. Vimentin çekirdeğe, endoplazmik retikuluma ve mitokondriye yanal olarak bağlanır. COL1A1 ve COL1A2 için tip I kollajen mRNA'ların stabilizasyonunda LRP6 ile yer alır (Pattabiraman ve ark., 2020).

1.11.6. KÖKLÜLÜK (STEMNESS) GENLERİ

OCT4 / POU5F1

Diğer bilinen ismiyle Oct3 veya Oct3/4 olarak da adlandırılan bu gen pluripotensitiyi düzenlemede anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür.

POU5F1 insan embriyolarında iç hücre kitlesinde ve fare embriyosunda sentezlenirken yetişkinlerde germ hücrelerinde sentezlenmektedir. Embriyoda Oct4 ekspresyonun miktarının hassas bir sekilde ayarlanması gerekmektedir. Oct 4 normalden 1,5 kat yüksek miktarda sentezlenirken embriyonik kök hücreleri mezoendoderm hattına farklılaştırırken normalden %50 daha az ekprese edilir. Bu da hücrelerin trofoektoderme yönelmesine neden olur.

Pou5f1‘in apoptozu baskılayan ve hücre çoğalmasını arttıran rolleri keşfedilmiştir. Aynı zamanda çeşitli kanser türlerinde yüksek ekpresyon seviyelerine rastlanmıştır (J. Lee ve ark., 2006).

SOX2

SOX2, POU5F1 gibi pluripotensinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Erken embriyonik süreçte iç hücre kitlesinde, epiblast ve germ hücrelerinde PO5F1 ile birlikte koeksprese edilir (L. Chen & Daley, 2008). Yetişkin beyninde sentezlenen Sox2 nöronların canlılığı ile ilişkilidir. Yokluğunda nörodejenerasyon ortaya çıkmaktadır. SOX2 geninin aynı zamanda göğüs kanseri, prostat kanseri ve akciğer kanseri ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur.

ZFP42 / REX1

Rex1 (ZFP42) geni, YY1 de dahil olmak üzere çinko parmak proteini ailesinin bir üyesi olan bir proteini kodlar. Rex1 (ZFP42) geni şu anda embriyonik kök hücrelerin bir belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (M. Y. Lee ve ark., 2010).

Rex1 (ZFP42), esas olarak farklılaşmamış kök hücrelerde, hem embriyoda hem de yetişkinde eksprese edilen bir çinko parmak proteinidir. Murin embriyonik kök hücrelerinin all-trans retinoik asit kaynaklı farklılaşması üzerine, Rex1 mRNA seviyeleri birkaç kat azaldığı gösterilmiştir (Scotland ve ark., 2009).

1.11.7. FARKLILAŞMA GENLERİ

I-CAM

Diş etlerinin yüzeyindeki bir yapışma proteini olan hücresel yapışma molekülü (I-CAM), hücreler ve hücre dışı matriksleri arasındaki yapışmanın önemli bir bileşenidir. I-CAM, esas olarak hücre bilgi iletimi, iltihaplanma ve immün yanıtın katılımı yoluyla periodontitin ortaya çıkması ve gelişmesinde rol oynar. I-CAM'ın eklem epiteli üzerindeki özgüllüğünün yardımıyla, polimorfonükleer lökosit (PMN), sterilizasyonun rolünü oynayarak dişeti ve periodontal cebe girebilir. I-CAM seviyesi

periodontal inflamasyon derecesi ile pozitif korelasyon gösterir (L. Wang ve ark., 2016).

Perisitler ve epitel hücreler üzerindeki I-CAM-1 ile birlikte endotel yüzeyindeki hücreler arası hücre adezyon molekülü (I-CAM)-1 ve I-CAM-2, dokulara nötrofil trafiginde için çok önemlidir.

I-CAM-1 (CD54) ve I-CAM-2 (CD102), immünoglobulin süper ailesinin transmembran glikoproteinleridir (Lyck & Enzmann, 2015).

RUNX1

Runx ailesi genleri, büyük ölçüde doku kök hücre davranışını düzenlemede , farklılaşmasında ve kanserde önemli roller oynar (Wang vd., 2017). Runt – ilişkili transkripsiyon faktörü 1 (RUNX1), AML1 olarak da adlandırılır. RUNX1 geni hematopoietik kök hücrelerin olgun kan hücrelerine farklılaşmasını düzenlemede görev alır. RUNX1 genini içeren kromozomal translokasyonlar, çeşitli lösemi türleri ile ilişkilidir (Zhao vd, 2019).

RUNX1, Mezenkimal kök hücrelerde de yüksek oranda ifade edilir (Zhao ve ark., 2019). Mezenkimal kök hücrelerde proliferasyonu ve miyofibroblast farkılaşmasında önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörüdür (W. Kim vd, 2014).

VCAM1

Vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), reaktif oksijen türleri ve TNFa ve interlökin-1 gibi proinflamatuar sitokinler dahil olmak üzere birçok hücre dışı uyarandan herhangi biri tarafından aktivasyon üzerine endotel hücrelerinde indüklenebilir ve ağırlıklı olarak eksprese edilebilen 90 kda'lık bir glikoproteindir (T. K. Kim ve ark., 2017).

Hücreler arası adezyon molekülü 1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1) Ig süper ailesine aittir. ICAM-1, lökositler, endotel hücreleri, monositler, sinovyal hücreler, fibroblastlar ve epitel hücreleri üzerinde yaygın olarak eksprese edilir. İmmünolojik ve enflamatuar reaksiyonlarda, ICAM-1 ve VCAM-1, hücre yapışmasını teşvik etme ve lökositleri gorevlendirme yeteneğine sahiptir. ICAM-

1 ve VCAM-1'in bu yeteneklerinin romatoid artritte rol oynadığı bulundu. (Jian ve ark., 2020)

1.11.8. HOUSEKEEPING GENLERİ

GAPDH

Housekeeping genleri genellikle temel hücresel fonksiyonun sürdürülmesi için gerekli olan ve bir organizmanın hemen hemen tüm hücrelerinde eksprese edildiği bulunan kurucu genler olarak kabul edilir. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), yenidoğan ve yetişkin kalp hücreleri için housekeeping genlerine kıyasla en tutarlı şekilde eksprese edilen gendir (J. Lin & Redies, 2012).

LDHA

LDHA geni tarafından kodlanan LDHA genellikle tetramer (LDH-5) olarak bulunur. LDHA, bilobal bir yapı oluşturan 332 amino asit içerir. Daha büyük Rossmann alanı, kofaktörlerin bağlanması için alanlar sağlarken, alt tabakalar için daha küçüktür.

LDHA'nın ana işlevi piruvatı laktata dönüştürmek ve NADH'yi NAD+'ya dönüştürmektir. Daha sonra, Arg105 inaktive edilmiş daireler yapışmış piruvatı tutarken, hidrojen anyonu NADH'nin nikotinamid halkasından piruvatın karbonilindeki oksijen atomuna geçecektir.

LDHA esas olarak sitoplazmada bulunur, ancak LDHA mitokondri ve çekirdekte de bulunmuştur. Çekirdeğin dışında LDHA, glikolizde kritik bir rol oynarken, çekirdekte LDHA, muhtemelen DNA duplikasyonuna ve transkripsiyonuna katılan tek iplikli bir DNA bağlayıcı protein (SSB) olarak işlev görür (Feng vd., 2018). Hipoksinin etkisine odaklanan Lavrentieva ve ark. (2010), hipoksinin, glikolitik genler glukoz taşıyıcı 1 (GLUT1), laktat dehidrojenaz A (LDHA) ve fosfogliserat kinaz 1'in (PGK1) gen ekspresyonunu analiz ederek aerobikten anaerobik metabolizmaya geçişi kolaylaştırdığını bildirmiştir (Wagegg ve ark., 2012).

Çalışmamızda iki housekeeping geni de incelenmiş, daha stabil ekspresyon verdiği için referans geni olarka GAPDH tercih edilmiştir. Ancak metabolik etkileri nedeniyle LDHA da analizlerde kullanılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Malzemeler- Jelatin, Sigma, Almanya

- Fetal sığır serumu (FBS), Gibco, USA

- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Gibco, ABD

- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, ABD

- DMEM/F12, Multicell

- %0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, ABD

- TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red, Gibco, ABD

-Tripsin, Gibco, ABD

- Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya

- Alkol, Tekkim Kimya

- TRIzol ™ Reagent, Sigma, Almanya

-Kloroform, Sigma, Almanya

- Isopropanol

-EZView Stain (Alternative to EB), Biomatik

-1Kb DNA ladder, Biomatik

-6X Loading Dye, Biomatik

-CaCl

2.2. Sarf Malzemeler

- 25,75,175 cm2 ’lik kültür kapları, Isolab

- Serolojik pipetler 5, 10, 25, Isolab

- 6 kuyucuklu plate, Nest

-Mikrosantrifüj tüpleri (0,2- 1 – 1,5 - 2 ml ependorf), Eppendorf

- 10-100-1000 µl'lik pipet uçları, Isolab

- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Corning

- Steril santrifüj tüpleri (15-50 ml), Nest

- 2 ml – 4 ml Kriyoviyal, BD Falcon

- Petri kabı 60x15 mm ve 80x15 mm, Isolab

2.3. Hücre Hatları

Tez kapsamında daha önce, ATCC 'den satın alınan Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre hattı (WJ-MKH) kullanılmıştır.

2.4. Kullanılan Cihazlar

- Floresans Mikroskobu, Zeiss Axio

- pH Metre, Ohaus

- Hassas Terazi, SHIMADZU AUW220D

- Santrifüj, Hitachi, Japonya

- Soğutmalı santrifüj

- Buz yapma makinesi

- cDNA cihazı

- Nanodrop cihazı

- Spektrofotometre

- Distile su cihazı

- Otomatik Mikro pipet

- Vorteks

- Pipet Aid

- StepOne Plus qRT-PCR, Applied Biosystem

- Hücre Kültürü İnkübatörü (CO_2 inkübatörü), Panasonic

- Steril Kabin, Telstar

- Inverted Mikroskop, Nikon, Japonya

- Çalkalamalı su banyosu

- +4°C, -20°C, -86°C Buzdolabı, Panasonic

- Mikropipet, Rainin, Eppendorf, Isolab

2.5. Kullanılan Kitler

- LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, Thermo Fisher

- SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit, Bioline

- SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit, Bioline

- MKH karakterizasyon kiti, BD, US

2.6. Primerler

Tablo 2.1: Analizlerde kullanılan primerlerin baz dizilimleri

GEN	Yön	Baz Dizilimi ($5' \rightarrow 3'$)
AP2	F	GTGGCTGGCATGGCCAAACCTA
	R	CATGACGCATTCCACCACCAGTTT
PPARG	F	TGGTGACCAGAAGCCTGCAT
	R	CCCAAAGTTGGTGGGCCAGA
LPL	F	AAGGCTCCTTCATGTGGCGT
	R	TGATTCGTGCCGCGGAAAAG

ALP	F	GCTGATCATTCCCACGTTT
	R	CTGGGCCTGGTAGTTGTTGT
COL1A1	F	CCGAGGCTCTGAAGGTCCC
	R	GGGTTCACCTCGAGCTCCTC
RUNX2	F	GAACCACAAGTGCGGTGCAA
	R	GTCGGCGATGATCTCCACCA
SOX9	F	CAGACGCACATCTCCCCCAA
	R	GGAGATGACGTCGCTGCTCA
ACAN	F	GCTACGAAGGGGACCTGTGT
	R	TTCCACTCGCCCTTCTCGTG
COMP	F	CCGGGCAACATAACTGCGTC
	R	CGGGAAGCCGTCTAGGTCAG
NESTİN	F	GCCGGCGTCTTGGATCTTTG
	R	CTGGCCAAGGTAGGGGTACG
TUBB3	F	AGATCGGGGCCAAGTTCTGG
	R	CACTGTCCATGGTTCCGGGT
CD44	F	AACCCAGAAGCACACCCTCC
	R	TGGCTGGTATGAGCTGAGGC
VCAM1	F	ACGAATGAGGGGACCACATC
	R	CACTCCTCACCTTCCCGCTC
THY1	F	ACAGTCTTGCAGGTCTCCCG
	R	TCCCGATGGGCAAGGATGAC
POU5F1	F	GTAGTCCCTTCGCAAGCCCT
	R	CCCCACATCGGCCTGTGTAT
SOX2	F	ATGGAGACGGAGCTGAAGCC
	R	CTGTCCATGCGCTGGTTCAC
ZFP42	F	ACCATCGCTGAGCTGAAACAAA
	R	GACAAGCGATTGCGCTCAGA
VIM	F	ACGTATGGCGCCTCTCCAAA
	R	GGAAGCGCACCTTGTCGATG
ICAM	F	CTGCCCATCGGGGAATCAGT
	R	GGGGCCTCAGCATACCCAAT
BMP2	F	GGCCCTCATCAAGGGTTGGA
	R	AGGGTGGGCAGAAAACACGA
RUNX1	F	TTGGGTAGCCTGGCAGTGTC
	R	GAACATCCCCTAGGGCCACC
GAPDH	F	TTCTTTTGCGTCGCCAGCC
	R	CCGTTCTCAGCCTTGACGGT

2.7. Kullanılan besiyerinin hazırlanması

Hücre kültüründe kullanılan besiyeri olarak DMEM/F12 kullanıldı. DMEM/F12 içerisine filtrelerden geçirilerek %10 FBS VE %1 penisilin antibiyotik konuldu. Hazırlanan besi yerinden bir miktar alınarak petri kabına kontrol amaçlı konuldu ve 37℃'ye kaldırıldı. Hücre besiyeri olarak kullanılacak DMEM/12 4℃'ye kaldırıldı.

2.7.1. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurma solüsyonu içerisindeki DMSO sıvı haldeyken oldukça toksik olduğundan bu işlemin hızlıca yapılması çok önemlidir. Bu işlem hücrelerin sağlıklı büyümeleri ve çoğalmaları için çok dikkat edilmesi gereken bir işlemdir.

-80℃'den hücreler alınıp el ısısıyla hızlı bir şekilde çözüldü. Hücreler kabinin içine alınıp kriyojenik tüpten pipet yardımı ile 15ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 5 ml DMEM/F12 alınıp yavaşça hücrelerin üzerine verildi. Her birkaç damlada bir sol eldeki tüp hafifçe sallanarak karıştırıldı. Santrifüj 500g 5 dk olarak ayarlanarak santrifüj edildi. Santrifüjden alınan hücreler kabine konulup, pellete dikkat edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet DMEM/F12'de çözülerek T75'lik flaska ekildi.

2.7.2. Hücrelerin Pasajlanması

Mezenkimal kök hücreler adherent yani kültür kabınının yüzeyine yapışan hücrelerdir. Hücreler içinde bulunduğu besi ortamında çoğalırlar ve %70 yoğunluğa (konfluent duruma) geldiği zaman besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir ve kültür kabında yeterli yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalma hızları düşer veya durur. Bu nedenle hücrelerin pasajlanmaları gereklidir. Kültürün bölünmesiyle birlikte hücrelerin besi ortamı değiştirilir.

Hücreler mikroskopta kontrol edilip kültür kabının yüzeyini %70 oranında doldurduğunda pasajlama işlemi yapıldı. Kültür kabındaki besi yeri serolojik pipet yardımıyla atık kabına aktarıldı. Kültür kabının yüzey alanına bağlı olarak serolojik pipet ile PBS eklendi birkaç kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. PBS ortamdan serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Tripsin/EDTA solüsyonundan kullanılan kültür kabının yüzey alanına uygun miktarda serolojik pipet ile alınarak kültür

kabına eklendi ve 37℃'de 3 dakika inkübe edildi. Mikroskopta hücreler kontrol edilip, hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra kültür kabına konulan Tripsin/EDTA solüsyonunun iki katı miktarda serum içeren besi yeri eklendi. Kültür kabının yüzeyindeki tüm hücrelerin alındığından emin olarak santrifüj tüpüne aktarıldı. 500g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı pelet besiyerinde çözülerek. 10 µl hücre hücre sayımı için ayrı bir santrifüj tüpüne alındı. Kalan hücreler yüzey alanı daha geniş flaska ekildi. İnkübatöre (37℃) kaldırıldı.

2.7.3. Hücre Sayımı

Sayım için 1.5 mL santrifuj tüpünün içine mikropipet ile 10 µl hücre ve 10 µl trypan mavisi eklendi. Bu karışımdan 10 µl alınarak mikroskopta hemasitometri üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerindeki hücre sayısı hesaplandı.

2.7.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücre hatlarını stoklayabilmek, çalışmalarda geriye dönme olasılığı elde edebilmek ve artan pasaj sayısının olumsuz etkilerinden hücreleri koruyabilmek için hücre dondurma işlemi gerçekleştirilir. Dondurma işleminin ilk birkaç basamağı pasajlama ile aynıdır. Farklılık hücre pelletini elde ettikten sonra başlar. Bu teknikte kullanılan dondurma solüsyonu, %90 FBS (fetal sığır serumu) ve %10 DMSO (Dimetil sülfoksit)'dan oluşur. DMSO, hücreler için oldukça toksik bir maddedir ve suyun donarken kristalleşerek hücrelere zarar vermesini önlemek için kullanılır. Bu sayede su amorf bir şekilde donar ve hücreler su kristallerinden korunmuş olur. FBS ise hücreler donarken yapılarından dolayı birbirlerine zarar vermemelerini için hücreler arasında "yastık" görevi görür. Dondurma solüsyonu hücrelere yavaşça eklenmeli ve eklendikten sonra hızlı bir şekilde -80℃'ye hücreler kaldırılmalıdır. Bu noktalara dikkat edildiğinde, dondurmanın hücrelere verdiği hasar minimuma indirgenmiş olur.

Hücre kültürü şişesindeki besi yeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Flaska Tripsin eklenerek inkübatöre kaldırıldı ve 5 dk inkübe edildi. Daha sonra üzerine DMEM/F12 eklenerek santrifüj tüpüne aktarıldı ve santrifüj edildi. Santrifüj devam

ederken, kriyojenik tüplerin üzerine asetat kalemiyle “Hücre Adı - Pasaj Numarası - Günün Tarihi - Dondurma işlemi yapan kişinin adı - Biliniyorsa hücre sayısı” tüplerin üzerine yazıldı. Santrifüjden sonra pellete zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan sıvı ile pelleti çözdükten sonra dondurma solüsyonu karışımından 1ml yavaşça eklendi ve pipetle karıştırıldı. Kriyojenik tüpe bu karışım hızlı bir şekilde konuldu ve kapağı kapatılarak -80°C dondurucuya kaldırıldı.

2.7.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Akış Sitometrisinde Karakterizasyonu

- $1x10^6$ mezenkimal kök hücre üzerine 300 µl PBS solüsyonu ilave edildi.
- Pozitif, negatif ve kontrol olmak üzere üç sitometri tüpü hazırlandı.
- Pozitif tüpe; 5 µl Pozitif kokteyl antikorları (CD90, CD105, CD73, CD44),
- Negatif tüpe; 2.5 µl Negatif kokteyl antikorları (CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR)
- Kontrol tüpüne; 1.5 µl izotip kontrol pozitif ve 1.5 µl izotip kontrol negatif antikorlar
- Karışımlar vortekslendi ve 30 dakika oda ısısında inkübe edildi, tüplere 1 ml PBS solüsyonu eklendi. 1800 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantı döküldü. Her tüpe okutma yapmak için PBS solüsyonu eklenerek süspanse edildi.

2.8. 3B Hücre Kültürü Hazırlanması

2.8.1. Biyomalzemenin - Aljinat ve Jelatinin Hazırlanması

Kullanıcak olan toz aljinat ve jelatin hassas terazide ölçüldü. %2 aljinat ve %8 jelatin olarak yüzdelik hesaplama yapıldı. Tartılan aljinat ve jelatin steril edilmek için 2-3 saat boyunca UV ışığı altında bekletildi.

Steril aljinat ve jelatin karışımı toz 50 ml’lik falkon tüpe alındı. Üzerine 20 ml besi yeri eklendi. Toz ve besiyeri steril serolojik pipet yardımıyla karıştırılarak homojen bir hale getirildi. Toz halindeki aljinat ve jelatinin tam olarak besi yerinde çözülmesine yardımcı olmak için bir süre 37°C su banyosunda bekletildi. Ardından santrifüj edildi ve 3B kültür ortamımız hazır hale getirildi.

2.8.2. Mezenkimal Kök Hücre ve Biyomalzemenin Birleşimi

Tripsin ile kaldırılan hücreler santrifüj ardından sayım için 10 µl ayrıldı. Sayıma göre 1 ml biyomürekkep de 1 milyon hücre olacak şekilde hücreler besi yeri ile sulandırıldı. Hazırlanan biyomürekkep karışımı üzerine eklendi. Hücre ve aljinat-jelatin karışımı biyomürekkep falcon tüp içerisinde karıştırıldı. 3B biyoyazıcı için hazır hale getirildi.

2.8.3. Mezenkimal Kök Hücre ve Biyomürekkebin Basımı

Hücre içeren karışım 3B biyoyazıcının kartuşlarına yüklendi. 3B baskı aşamasından hazırlanan biyomürekkebe uygun basınç, hız gibi ayarlar yapılarak denemeler yapıldı. En uygun basınç, hız gibi değişkenler belirlendi. Baskı sırasında polimerlerde çapraz bağlanması sağlanması için belirli aralıklarla CaCl2 püskürtüldü. Deney süreci 1. Gün, 7. gün ve 14. Gün analiz edilecek şekilde basımı gerçekleştirildi.

2.8.4. Su Tutma Kapasitesi Tayini

Çalışmada üretilen aljinat ve hidrojel karışımı hidrojelin su tutma kapasitesi ölçümü medıum ortamında gerçekleştirilmiştir. %2 aljinat ve %8 jelatin konsantrasyonun da hazırlanan hidrojel 24 saat sonra şişme ortamından uzaklaştırılarak, nemleri alınarak hassas terazide ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Şişme ortamına konulmadan önce ve sonra boyut ölçümleri yapılmıştır. Tekrardan şişme ortamına konularak yaş ağırlık değeri ve hidrojellerin kuru haldeki başlangıç ağırlığı eşitlikte yerine konularak “şişme oranı” hesaplanmıştır.

Şişme Oranı (Q) = (Şişmiş Ağırlık – Kuru Ağırlık) / Kuru Ağırlık

2.8.5. Biyobozunurluk Tayini

Yürütülen tez çalışmasında %2 aljinat ve %8 jelatin karışımı hidrojelleri besiyeri içinde 37℃’deki inkübatörde bekletildi. Bozunma durumu 1. gün, 7. gün ve 14. günlerde gözlemlenmiştir.

2.9. Canlılık Analizi

3 boyutlu hücrelerin jel içerinde canlılık analizini yapmak için LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit kullanıldı. Kit içerisinden çıkan calcein ve EDT ölü ve canlı hücreleri boyayarak onları analiz etmede yardımcı olur. Uygulamada ilk olarak besi yeri çekilmiş 3 boyutlu hücreler:

- PBS ile birkaç defa yıkandı.
- Ayrı bir tüpte 1 ml PBS içine kit içinden çıkan 2 µl calcein ve 4 µl EDT-1 eklendi.
- Hazırlanan karışım 3B kültür üzerine yüzeyi kaplayacak miktarda konuldu.
- İnkübatör de (37°C) karanlıkta 20 dk bekletildi.
- Hazırlanan karışım çekilir ve kültür ortamı PBS ile birkaç tur yıkandı.
- Ölü ve canlı hücre analizi için floresan mikroskopta görüntüleme yapıldı.

2.10. Real Time PCR Analizleri

Deney sürecinde 1. gün, 7. gün ve 14. gün sonunda hücreler real-time cihazı hazırlandı. İlk olarak total RNA izolasyonu yapıldı. Ardından RNA'lar cDNA' ya çevrildi. cDNA'lar uygun primerler ile real time PCR cihazında analiz edildi. İncelenilen genlerin ekspresyonlarındaki artış ve azalmalar değerlendirildi.

2.10.1. RNA İzolasyonu

Tez çalışmasında iki boyutlu ve 3 boyutlu kültürlere 1., 7. ve 14. günde RNA izolasyonu yapıldı. Her iki koşuldaki hücreler trizol ile izole edildi.

- İlk aşamada 2 ve 3 boyutlu kültürler trizol ile muamele edildi. 3 boyutlu hidrojelin trizolde çözünmesine yardımcı olmak için pipetaj yapıldı.
- Trizolde çözünmüş hücreler santrifüj tüplerine alındı.
- Ardından 1:2 oranında kloroform eklendi.
- Oluşan fazı yok etmek için örnekler bir süre vortekslendi ve 4°C'de 15 dk bekletildi.
- Bekleme işleminden sonra tüpler 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj ardından tüplerde üç faz oluştu.

- En üst faz dikkatlice çekilerek yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Aktarılan üst fazın üzerine 1:1 oranında isopropanol eklendi.
- Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi ve 12.000 rpm'de tekrar 10 dk santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası süpernatant ve pellet oluştu. Süpernatant atıldı ve pellet %95'lik etanolde yıkandı.
- Yıkanmadan sonra kurutuldu ve pellet DNaz/RNaz free suda çözüldü.
- RNA konsantrasyonları ölçüldü.

Bu işlemler 7. ve 14. günlerde tekrarlandı.

2.10.2. Konsatrasyon Ölçümü

Tez çalışması için her iki kültür ortamından izole edilen RNA'lar nanodrop cihazı ile ölçüldü.

Ölçüm için blank olarak RNA'ları çözdüğümüz Pellet DNaz/RNaz free su kullanıldı. Daha sonra tüm örneklerden 2'şer µl alınarak cihaza yerleştirildi. Çıkan konsantrasyon sonucu ile cDNA sentezi için hesaplamalar yapıldı. Bu işlemler 7. ve 14. günlerde tekrarlandı.



Şekil 2.1: Nanodrop Cihazı

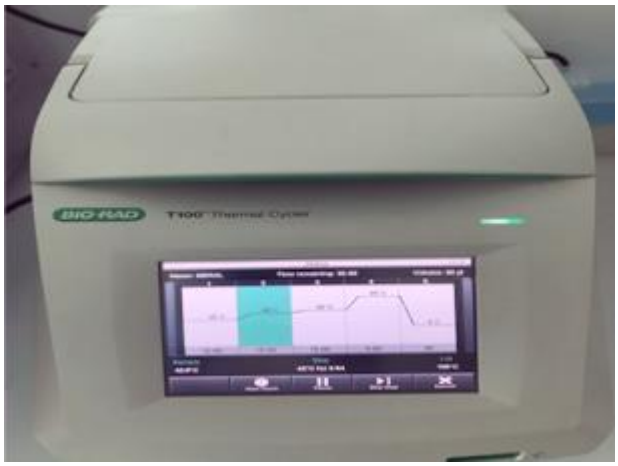
2.10.3. RNA'nın cDNA'ya Çevrilmesi

İzole edilen RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi için Bioline marka SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Yapılan tüm işlemler firmanın önerdiği protokole göre yapıldı. Deneyin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi.

Kullanılacak tüm malzemeler ilk olarak buz üzerine yerleştirildi. Örneklerin hazırlanması için protokol:

İzole edilen total RNA	Değişken
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
DNase/RNase free-water	20 µl' yi tamamlayacak kadar
Toplam	20 µl

Örnekler protokoldeki oranlara göre hazırlandı. Hazırlanan örnekler BIO-RAD markalı Thermal Cycler cihazına yerleştirildi. Cihaz aşamaları protokolde belirtiği gibi ayarlandı.



Şekil 2.2: BIO-RAD markalı Thermal Cycler. RNA'nın cDNA'ya çevrilmesinde kullanılmaktadır.

25℃	10 dk	Primer Yapışması
42℃	15 dk	Ters Transkripsiyon
48℃	15 dk	Yüksek Yapılandırılmış RNA
85℃	5 dk	İnaktivasyon
4℃	Bekletme veya buzda soğutma	

2.10.4. Agaroz jel elektroforezi

RNA' dan çevrilen cDNA'ların eldesini kontrol amaçlı cDNA örnekleri jelde yürütülmüştür. Örnekler 0,7'lik jelde yürütülmüştür. Jel hazırlama ve örnekleri yükleme aşaması:

- 294 ml distile su- 6 ml TAE olucak şekilde toplam 300 ml 1X'lik TAE hazırlandı.
- 300 ml TAE'nin 70 ml 'i ayrılarak 0,49 gr toz agaroz eklendi.
- Agaroz'un TAE' de çözülmesine yardımcı olmak için mikrodalgada ısıtıldı.
- Agaroz kasete dökülmeden önce 3,5 µl EZView Stain konuldu.
- Üzerine agaroz jel döküldü ve pipet ucuyla dağıtımı sağlandı.
- Kasete tarak yerleştirilerek kurumaya bırakıldı.
- Soğuyan agaroz jelin tarağı çıkartılarak tanka yerleştirildi ve üzerine TAE eklendi.
- İlk kuyucuğa DNA ladder yüklendi.
- Diğer kuyucuklara 5 µl örnek 1 µl lodding day olacak şekilde örnekler yüklendi.
- Örnekler 70 V de yürütülmeye bırakıldı.
- Yürüme işlemi tamamlandıktan sonra kaset tanktan alınarak görüntülenmesi için cihaza yerleştirildi.

2.10.5. RT-PCR İşlemi

Analiz için 1., 7. ve 14. gün deneylerinden elde edilen cDNA'lar kullanıldı. RT- PCR işlemi için karışım hazırlama aşaması; önce su, sonra master mix ardından cDNA'lar eklendi. Kullanılan master mix hazır olarak SensiFAST SYBR Hi-ROX

Kit (Bioline) olarak kullanıldı. Kit içindeki protokol uygulanarak kuyucuk başına toplam 20 µl olacak şekilde belirtilen oranlarda örnekler koyuldu. Protokolde belirtilen miktarlar:

2x SensiFAST SYBR Hİ-ROX Mix	10 µl
10 µl forwad	0,8 µl
10 µl reverse primer	0,8 µl
cDNA	8,4 µl 'ye kadar
H_2O	20 µl 'ye tamamlayacak miktarda
Toplam	**20 µl**

Karışım sürecinde örnekler degredasyonu önlemek amaçlı buz üzerinde tutuldu. PCR tüplerinde hazırlanan örnekler karıştırılma amacıyla kısa bir süre santrifüj edildi. PCR karışımı hazırlandıktan sonra öncesinden analiz verileri girilmiş ve hazır hale getirildi.

Döngü	**Sıcaklık**	**Zaman**	**Aşama**
1	95°C	2 dakika	Polimeraz akitivitesi
	95°C	5 saniye	Denatürasyon
40	60-65°C	10 saniye	Bağlanma
	72°C	5-20 saniye	Uzama

Cihaz tablodaki belirtilen verilere göre hazır hale getirildikten sonra örnekler cihaza yerleştirildi ve başlatıldı.



Şekil 2.3: Analizlerin yapıldığı real-time PCR Cihazı

Analiz sonunda veriler Excel tablosuna aktarıldı. Analizlerde cihazın verdiği Ct değerleri kullanılarak delta-delta-CT değerleri üzerinden gen ekspresyonlarındaki değişiklikler hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Hücrelerin Çoğaltılması, Kültürü ve Saklanması

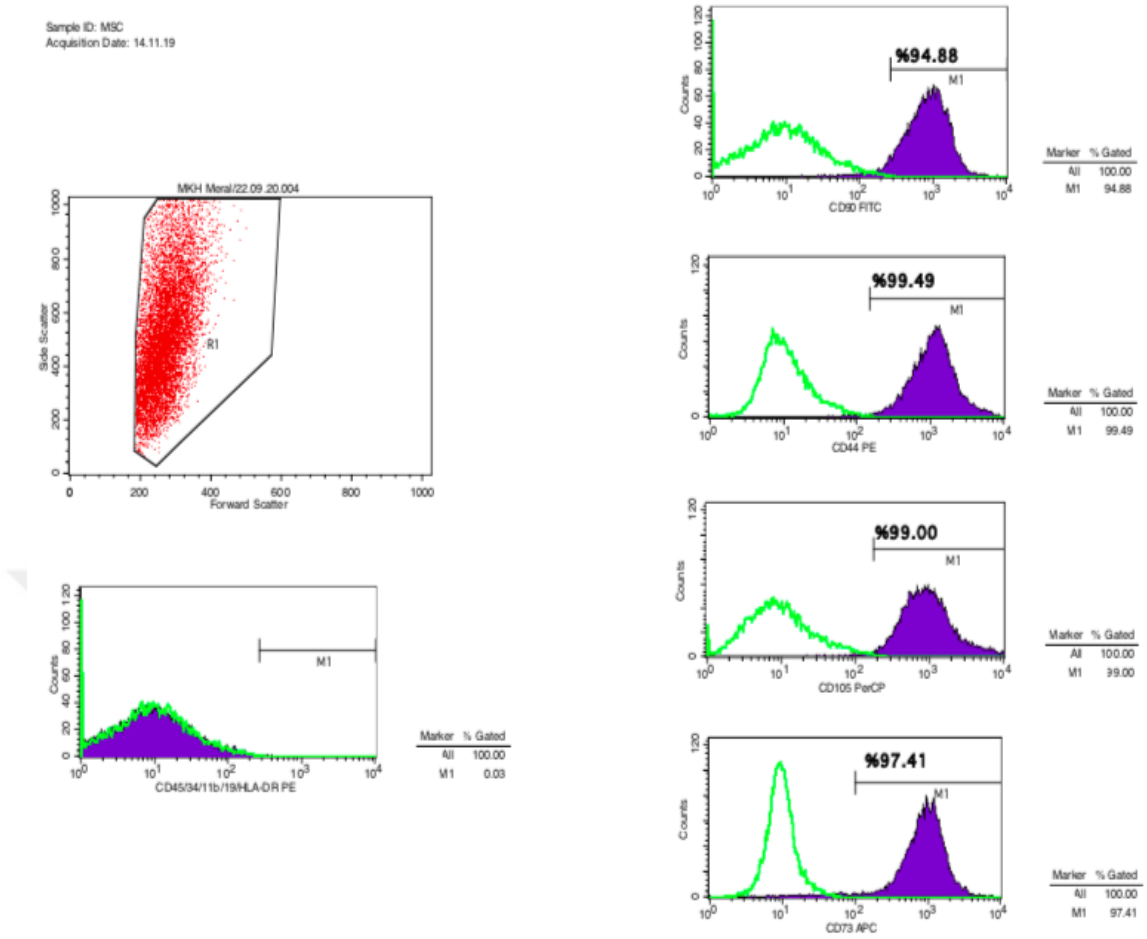
Birinci pasajda açılan hücreler 6 kuyucuklu platelerde kültüre edildi. 3 adet plate 1. Gün, 7. Gün ve 14. Gün olarak ayrıldı. Kültür kaplarında 2 boyut ve 3 boyutlu farklı kuyucuklarda bir arada tutuldu.

Hücrelerin çoğalmasını gözlemlemek ve pasaj yapmadan çoğalabilmeleri için her kültür kabına ekilen hücre miktarı bir diğerinden farklıydı. 14. gün sonunda kuyucuklarda %90 konfluensi olacak şekilde hesaplamalar yapıldı.

Kültür aşamalarında kontaminasyon kontrolleri sıklıkla yapıldı. Şüpheli durumlarda kültür ortamları tekrardan hazırlandı.

3.2. Hücre Karakterizasyonu

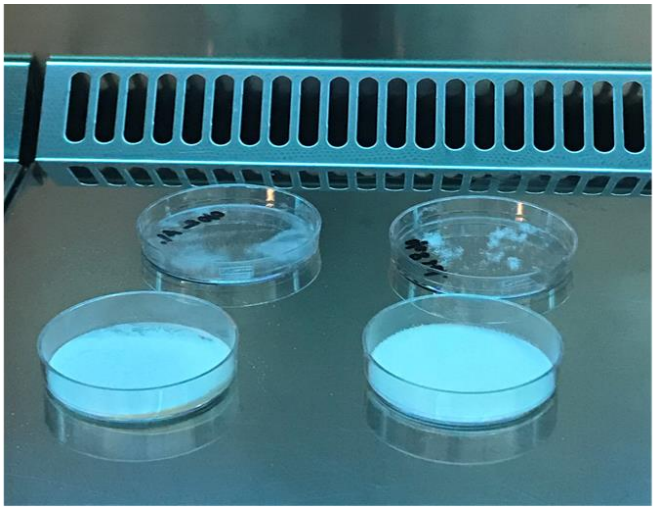
ATCC firmasından daha önce satın alınmış ticari MKH'ların kök hücre karakterinde değişiklik olup olmadığını kontrol etmek amacıyla deney öncesi flow sitometri analizleri yapıldı. Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon sonucunda CD90 (%94.98), CD44 (%99.49), CD105 (%99.00) ve CD73 (%97.41) pozitif sonuç verdiği ve hücrelerin MKH karakterini taşıdığı doğrulandı.



Şekil 3.1: MKH Akım Sitometrisi Karakterizasyonu

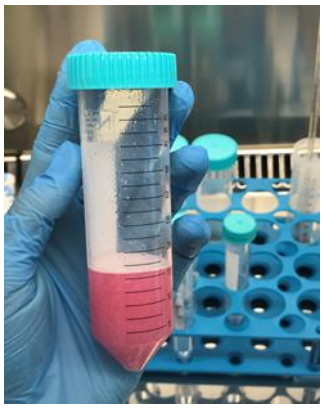
3.3. Üç Boyutlu Kültür Hazırlaması

Üç boyutta kullanılacak olan biyomalzemeler sterilizasyonu son derecede önemlidir. Kullanılan aljinat ve jelatinin sterilizasyonu için UV kullanıldı.



Şekil 3.2: Biyomalzemelerin laminar kabinde UV ile sterilizasyonu

Sterilizasyon sonrası aljinat ve jelatin medyum içerisinde çözüldü ve jel kıvamına getirildi. Bu aşamada önemli unsurlardan bir tanesi hazırlanan jelin tamamen homojen ve steril olmasıydı. Tüm bu unsurlar dikkate alınarak hazırlanan 3 boyut kültür matrisimiz birkaç defa santrifüj aşamasından sonra üzerine kök hücreler eklenerek yazıcı ile basıma hazır hale getirildi.



Şekil 3.3: Hücre ve Biyomalzeme Karışımı

3.3.1. Üç Boyutlu Kültür Basım Aşaması Bulguları

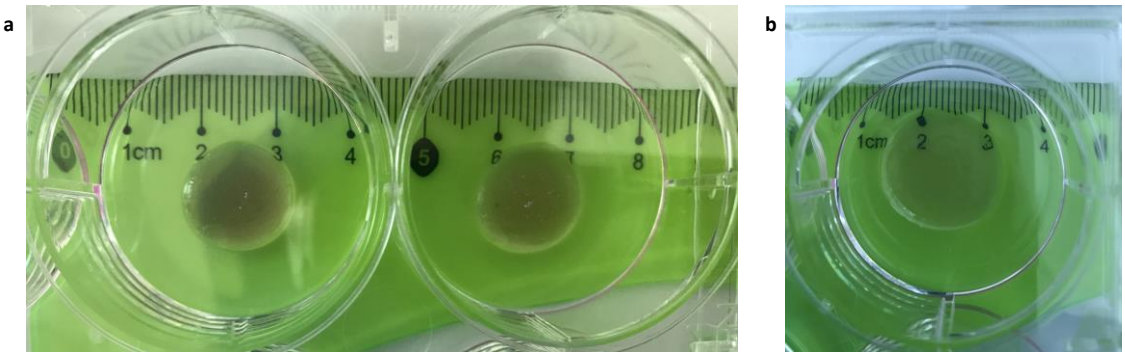
Basım aşamasında jel steril tüplere yüklendi. Aşamaların tamamen steril olmasına özen gösterilerek basım gerçekleştirildi. Ayarlanan sıcaklık ve basınç koşullarında 3 boyutlu hücre kültür basımı cihazımızda gerçekleştirildi.



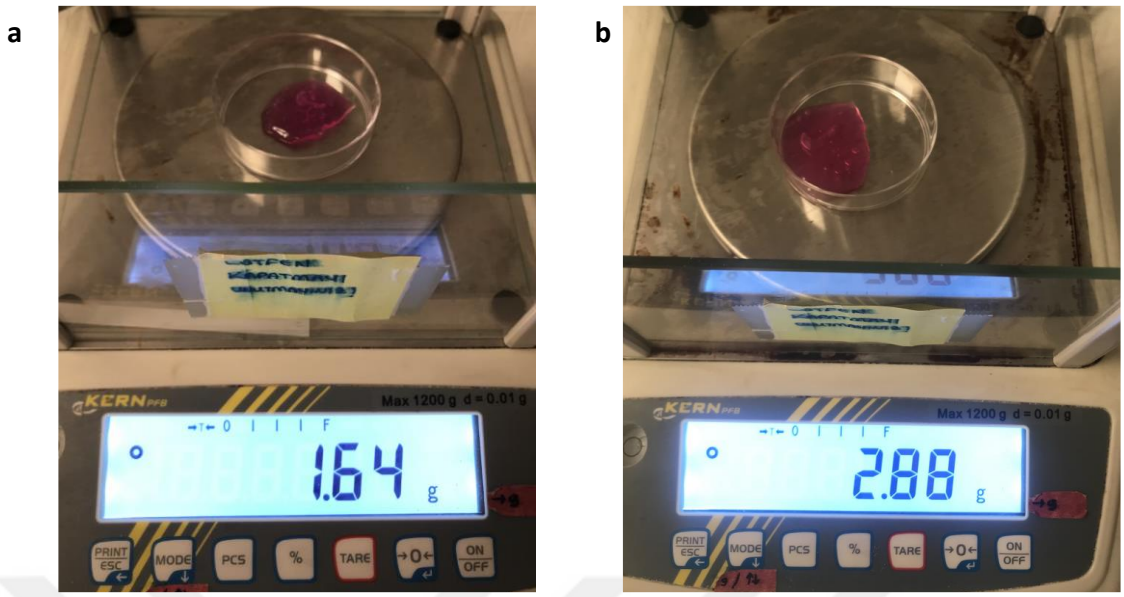
Şekil 3.4: 3B Biyobaskı Cihazı (3D Bioprinter)

3.3.2. Su tutma Tayini

Hazırlanan jellerin şişme (su tutma) testi için bir örnek jel bir hafta besi yeri içerisinde bekletildi. Sıfırıncı gün ve 7. günde cetvel ile ölçüm yapıldı. Bununla birlikte hassas terazide ölçümleri de yapıldı.



Şekil 3.5: Su tutma tayini cetvel ile ölçüm. a) 0. gün b) 7.gün

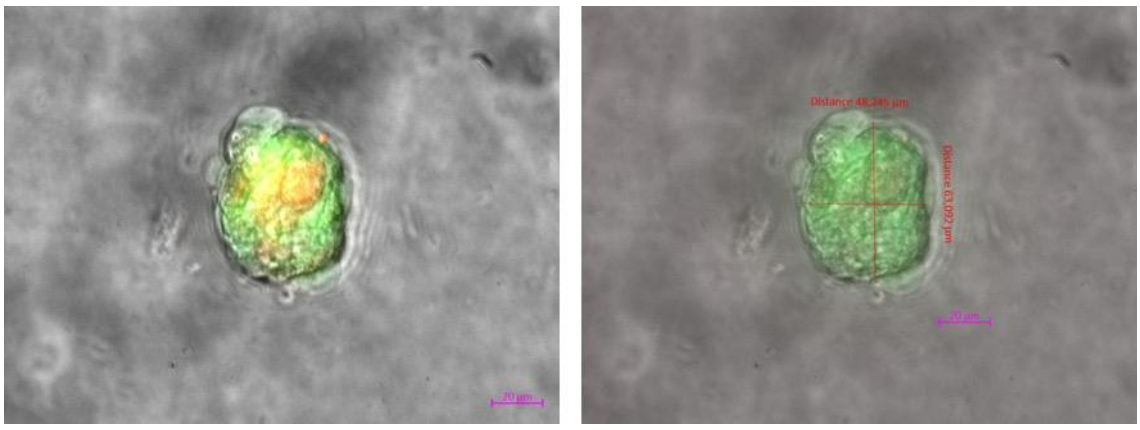


Şekil 3.6: Su tutma tayini hassas terazi ile ölçüm. a) 0. gün (1.64 g) b) 7. gün (2.88g)

Su tutma tayini sonuçları göstermektedir ki bir hafta içerisinde jel besi yeri sıvısını absorbe ederek şişmektedir.

3.3.3. Canlı/Ölü Hücre tayini

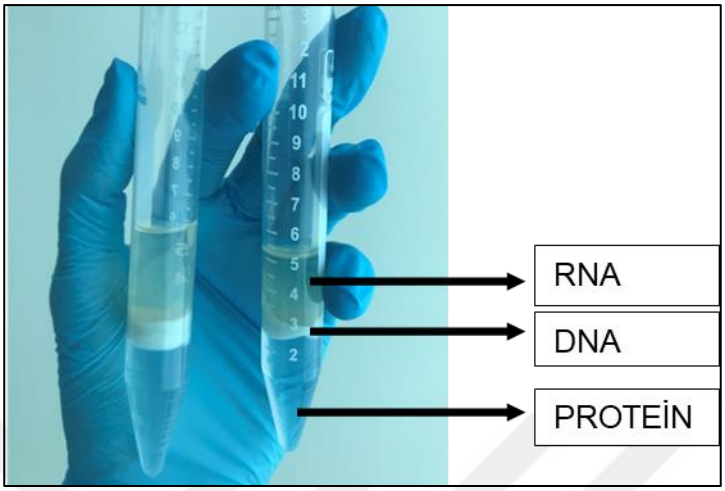
Sferoid yapılarındaki canlı ölü hücreleri ve hücre topluluğunun boyutunu tespit etmek için Live/Dead boyaması yapıldı.



Şekil 3.7: Sferoid yapı Live/Dead boyaması

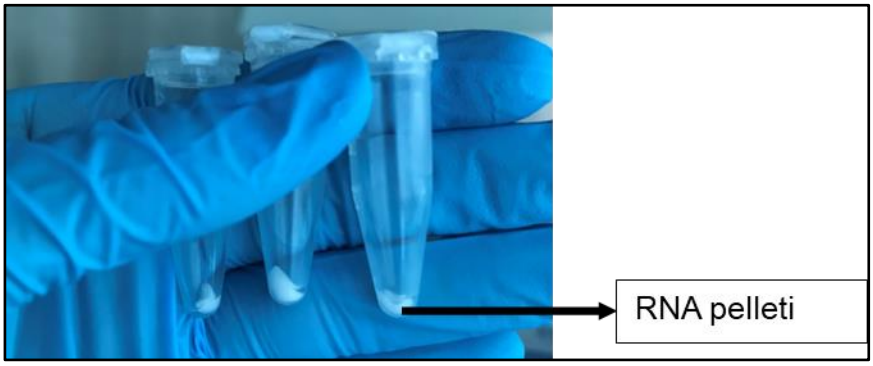
3.4. RNA İzolasyonu Bulguları

İki ve üç boyuttan yapılan izolasyon trizol ile gerçekleştirildi. İzolasyon aşamasında oluşan 3 fazda yukarıdan aşağı RNA, DNA ve protein elde edildi.



Şekil 3.8: İzolasyon sonrası; RNA, DNA ve protein fazları

Bu aşamada ihtiyacımız olan RNA'aydı. Bu yüzden sadece üst faz dikkatlice alınarak yeni santrifüj tüplerine alındı. En son aşamada pellet olarak çökeltilmesi gereken RNA çökeltildi ve nükleaz free suda çözüldü.



Şekil 3.9: İzole edilen RNA pelleti

3.5. Konsatrasyon Ölçümleri

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonları ölçüldü. 1., 7. ve 14. gün için bu işlemler tekrarlandı. Elde edilen sonuçlara göre konsantrasyonlar eşitlenerek cDNA çevrildi.

Tablo 3.1: 1. gün izolasyonundan elde edilen sonuçlar

Örnek	ng/ul	A260/A280	A260/A230
2B	844.1	1.60	0.20
2B	905.6	1.61	0.23
3B	826.3	1.58	0.20
3B	1092.1	1.65	0.27
3B	790.1	1.57	0.19

Tablo 3.2: 7. gün izolasyonundan elde edilen sonuçlar

Örnek	ng/ul	A260/A280	A260/A230	A260	A280
3B	413.2	1.91	0.97	10.33	5.40
3B	330.3	1.73	0.46	8.26	4.78
3B	586.1	1.56	0.14	14.65	9.38
3B	324.2	1.82	0.49	8.10	4.46
3B	650.6	1.55	0.16	16.27	10.52
3B	348.2	1.83	0.59	8.70	4.76
2B	460.4	2.02	0.82	11.51	5.70

Tablo 3.3: 14. gün izolasyonundan elde edilen sonuçlar

Örnek	ng/ul	A260/A280	A260/A230	A260	A280
3B	1019.3	1.59	0.40	25.48	16.04
3B	781.8	1,58	0.20	19.55	12.36
2B	536.9	1.61	0.16	13.42	8.32
2B	758.4	1.65	0.18	18.96	11.49

RNA izolasyonu için 2 ve 3 boyutlu kültürden birden fazla örnek alındı. Tüm örneklerin konsantrasyon ve saflık değerleri sonuçları farklı çıktı. Bu aşamada cDNA'ya çevrilmeden önce konstrasyonu ve saflık oranı en yüksek örnekler tercih edildi.

3.6. cDNA Sentez Sonuçları

RNA'lar cDNA'ya buzda ve belirtilen kit protokolüne uyularak sentezlendi. Sentez aşamasından sonra tekrar nanodrop cihazı ile ölçüm yapıldı.

1. gün deneyi cDNA ölçüm sonuçları:

Tablo 3.4: 1. gün deneyi cDNA ölçüm sonuçları

Örnek	ng/ul	A260/A280	A260/A230	A260	A280
3B	1141.7	1.75	0.84	22.83	13.03
3B	1086.3	1.67	0.69	21.73	13.01
2B	1121.6	1.72	0.73	22.49	13.08
2B	1079.2	1.72	0.79	21.58	12.55

7. gün cDNA ölçüm sonuçları:

Tablo 3.5: 7. gün cDNA ölçüm sonuçları

Örnek	ng/ul	A260/A280	A260/A230	A260	A280
3B	1294.7	1.61	0.39	25.89	16.06
3B	1237.1	1.69	0.54	24.74	14.67
3B	1188.4	1.69	0.47	23.77	14.03
2B	1238.3	1.71	0.66	24.77	14.45
2B	1188.7	1.68	0.47	25.77	15.38

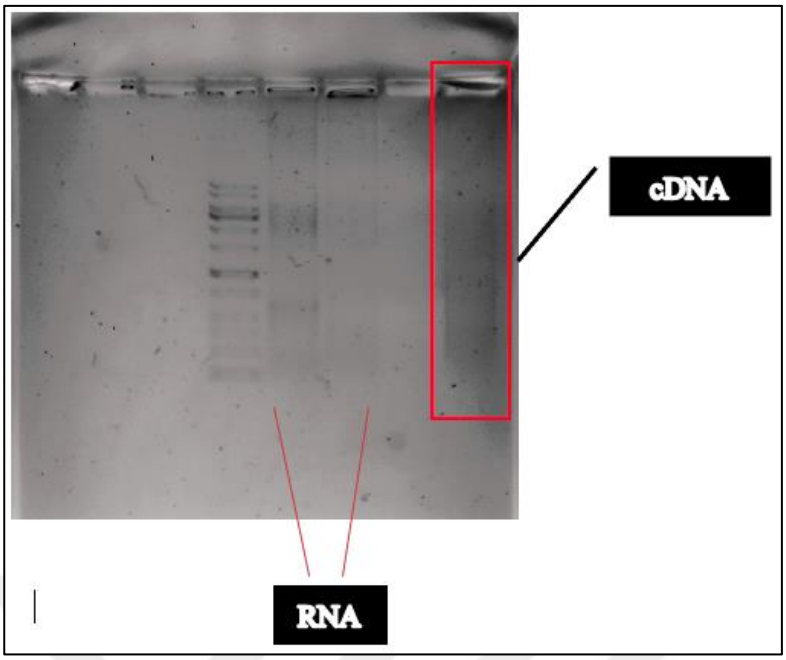
14. gün cDNA ölçüm sonuçları:

Tablo 3.6: 14. gün cDNA ölçüm sonuçları

Örnek	ng/ul	A260/A280	A260/A230	A260	A280
3B	881.4	1.58	0.48	17.63	11.14
3B	880.2	1.58	0.49	17.60	11.15
2B	1356.7	1.82	0.95	27.13	14.94

3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

cDNA sentezi ardından elde edilen cDNA'ı görüntülemek amacıyla agaroz jelde yürütüldü. Artı olarak deneme amaçlı ilk iki kuyucuğa RNA yüklendi. Son iki kuyucağa cDNA yüklendi.



Şekil 3.10: Agaroz jel elektroforezi görüntüsü

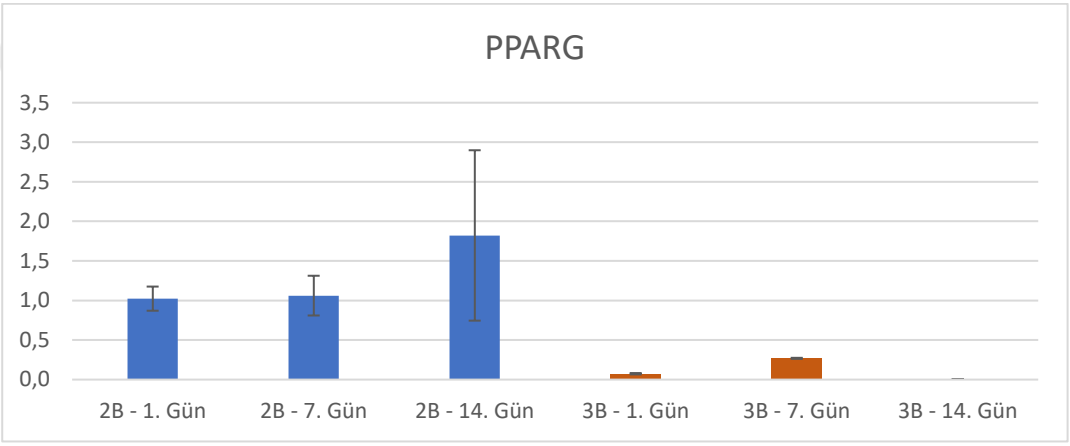
cDNA'da beklenilen görüntü smear oluşturmasıydı ve gözlemlenen görüntü beklenilen gibi gözlemlendi. RNA'da görüntü cDNA'dan farklı olarak bant oluşturmasıdır. Kontrol olarak kullanılan RNA örnekleride bant oluşturarak beklenilen görüntüyü vermiş oldu.

3.8. Real-time PCR Bulguları

3.8.1. ADİPOJENİK GENLER

PPAR-G

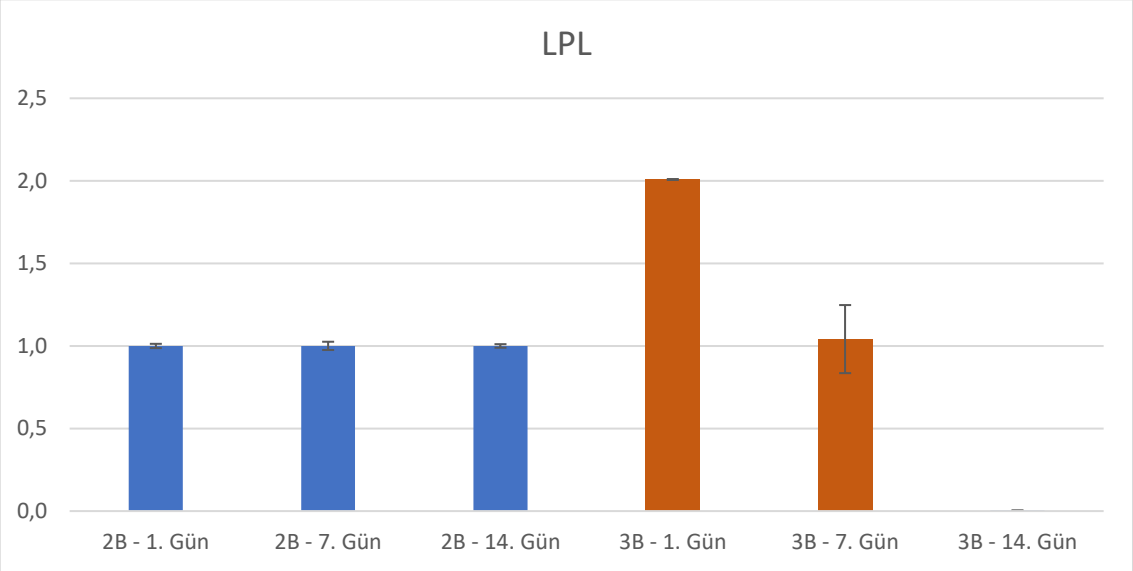
Çalışmamızda, adipojenik genlerden biri olan PPAR-G geni 2 boyutlu ortamda PCR sonuçlarına bakılacak olursa 1. günden 14. güne doğru artış gözlenmektedir. 3 boyutlu ortamda 7. günde artış gözlenmekte birlikte 14. günde sonuç gözlenmemektedir.



Şekil 3.11: PPAR-G PCR Bulgusu

LPL

LPL geni, 2B ortamda PCR bulgu sonuçlarında 1. gün, 7. gün ve 14. günde aynı seviyede sonuç verdi. 3B ortamda ise 2B ortama göre daha yüksek bir seviyede başlayıp 14. günde 0 seviyesine kadar düşmektedir.

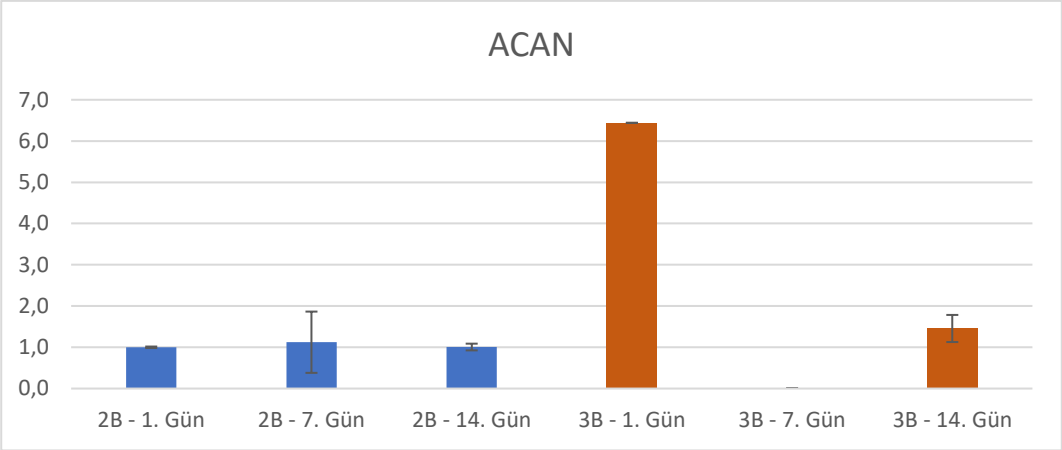


Şekil 3.12: LPL PCR Bulgusu

3.8.2. KONDROJENİK GENLER

ACAN

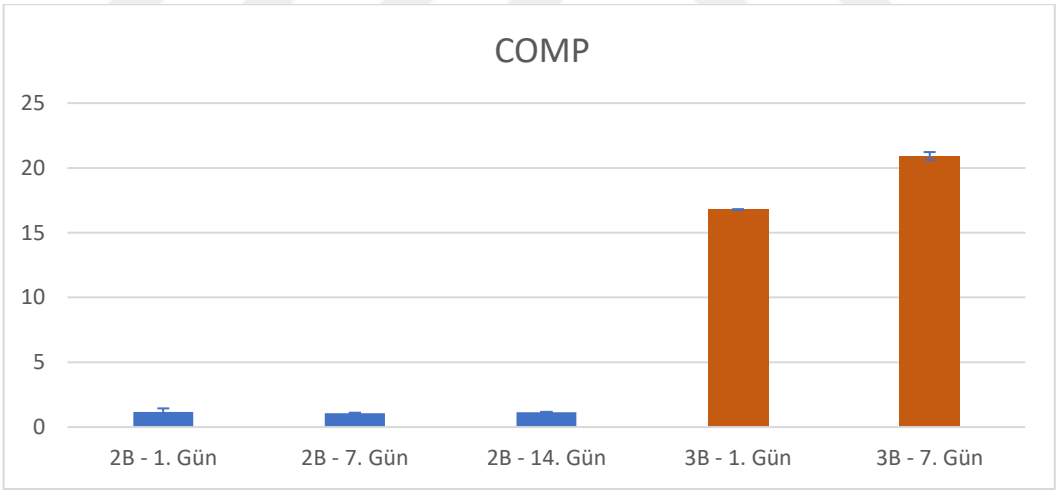
Kondrojenik genlerden biri olan ACAN gen ekspresyonu, 2B ortamda iki hafta boyunc ayni seviyede sonuç vermiştir. 3B ortamda ACAN gen ekpresyonu yüksek seviye sonuç verirken 7. günde sıfır seviyesine kadar düşmüştür, 14. günde artış gözlenmiştir.



Şekil 3.13: ACAN PCR Bulgusu

COMP

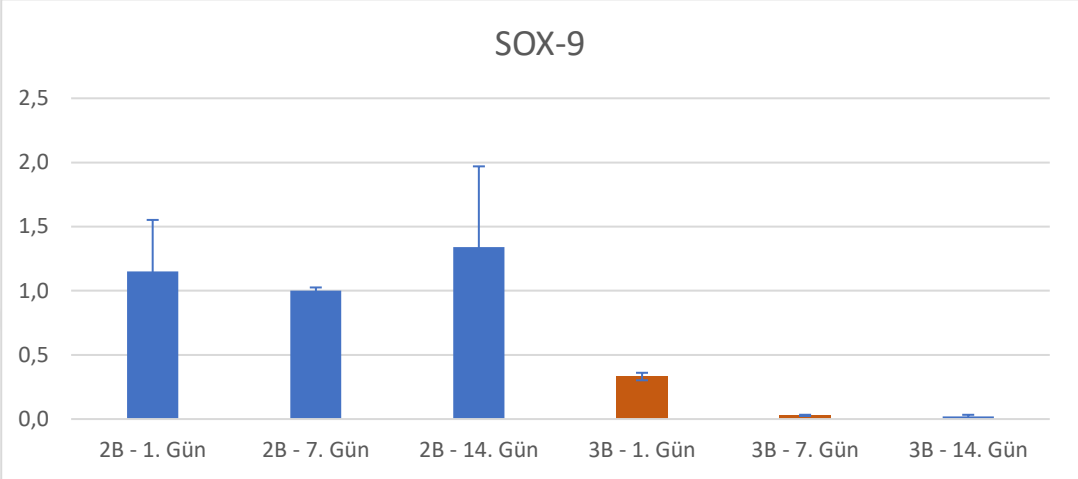
COMP gen ekspresyon seviyesi 2B ortamda iki hafta boyunca aynı seviyede ve sıfıra yakın sonuç vermiştir. 3B ortamda COMP gen ekspresyonu 2 boyutlu ortama göre yüksektir ve 7. günde artış gözlemlenmiştir.



Şekil 3.14: COMP PCR Bulgusu

SOX9

SOX9 gen ekspresyonu 2B ortamda 7. günde düşerken 14. günde artış göstermedir. 3B ortamda 2B ortama göre düşük seviye göstermekle birlikte 7. Ve 14. günde yaklaşık 0 seviyesine kadar düşüş göstermiştir.

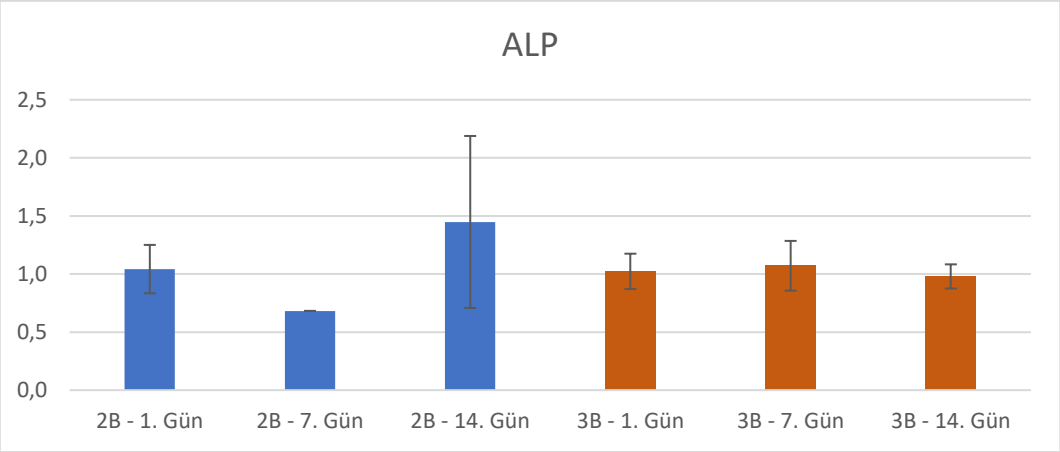


Şekil 3.15: SOX-9 PCR Bulgusu

3.8.3. OSTEOJENİK GENLER

ALP

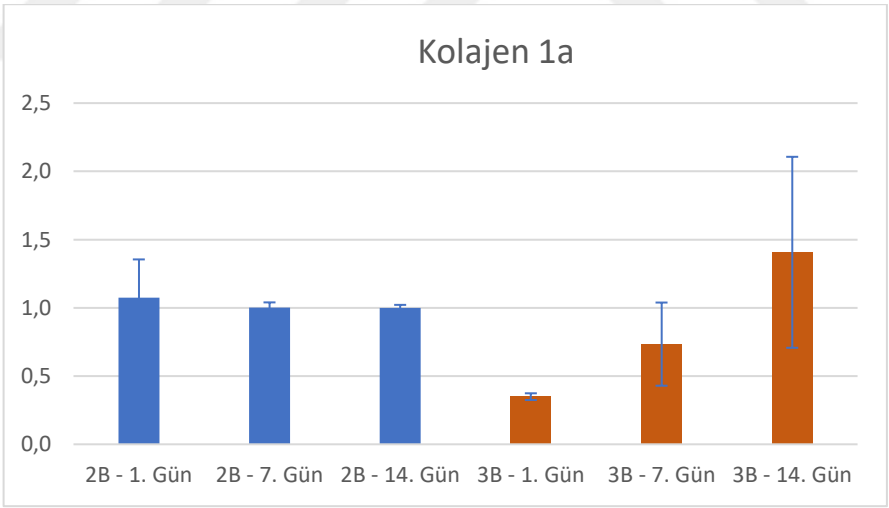
Osteojenik genlerinden biri olan ALP geninin ekspresyonu 2B ortamda 7. günde düşmektedir, 14. günde artış göstermektedir. 3B hücre kültürü ortamında ALP gen ekspresyonun 7. günde artış göstermekle birlikte significant bir değişim gözlenmemektedir.



Şekil 3.16: ALP PCR Bulgusu

COL1A1

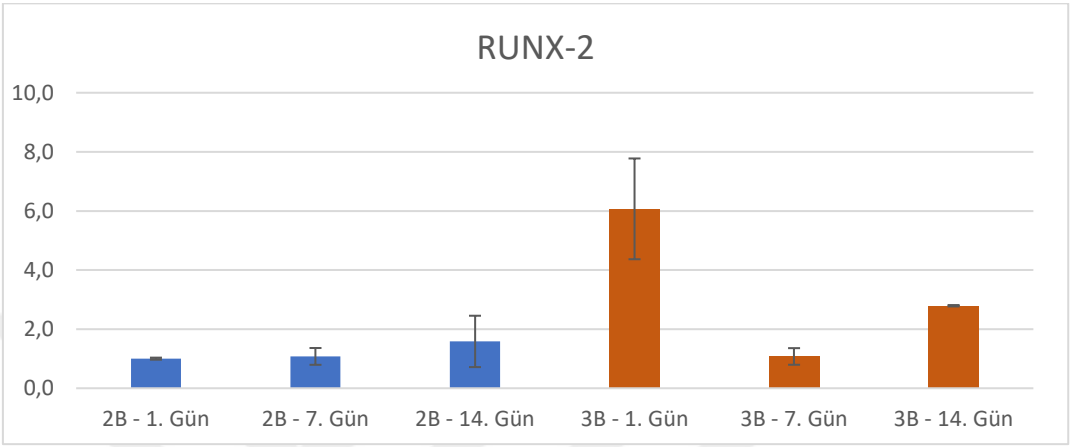
COL1A1 gen ekpresyonu PCR sonuçlarına göre 2B ortamda 1. günden sonra düşmekle birlikte 7. gün ve 14. günde aynı seviyede sonuç vermiştir. 3B ortamda COL1A1 gen ekspresyonu iki hafta boyunca artış göstermiştir.



Şekil 3.17: COL1A1 PCR Bulgusu

RUNX2

RUNX2 gen ekspresyonu, 2B ortamda 3B ortama kıyasla düşük seviyededir. 2B kültür ortamında 1 ve 7. günde aynı seviyededir, 14. günde artış gözlemlendi. 3B ortamda 7. günde ekspresyon seviyesi düşerken 14. günde artış göstermektedir.

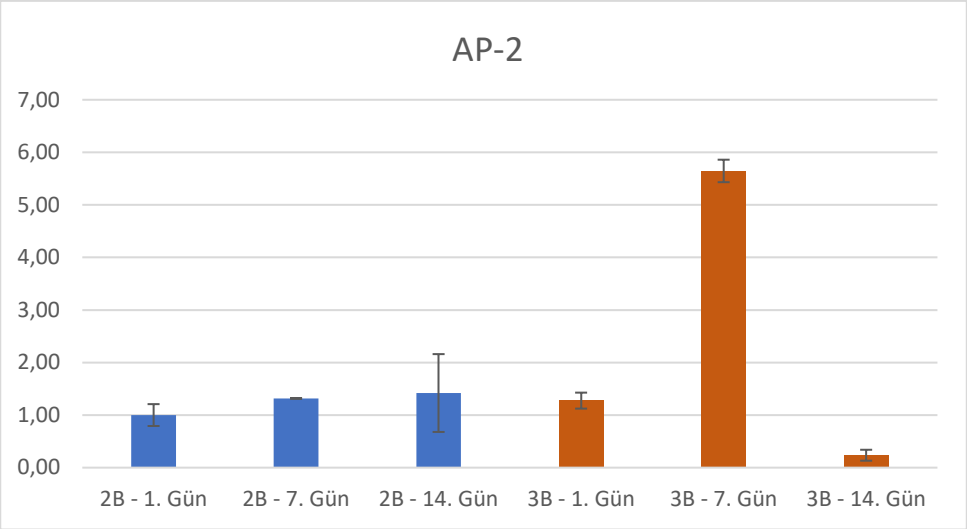


Şekil 3.18: RUNX2 PCR Bulgusu

3.8.4. NÖROJENİK GENLER

AP2

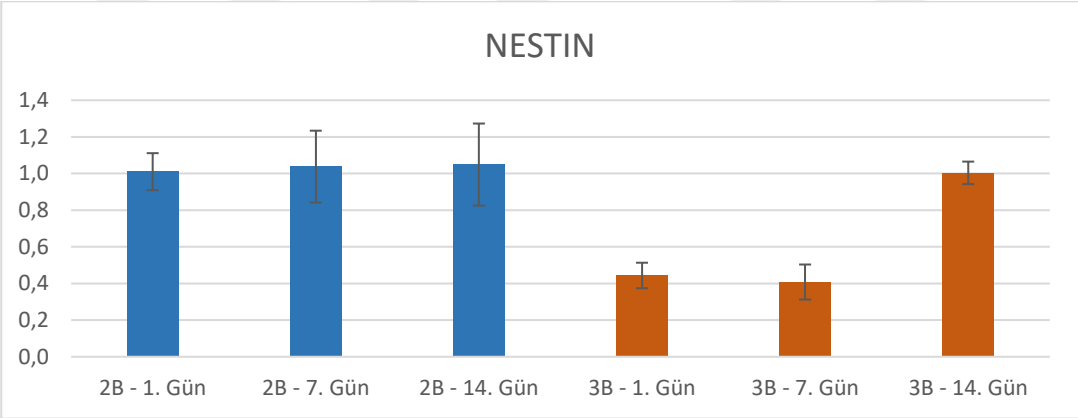
Nörojenik genlerden biri olan AP2 gen ekspresyon seviyesi 2B ortamda düşük seviyede 7. ve 14. günde artarken 3B ortamda 7. günde pik yapan bir artış gözlemlenmiştir. 14. günde tekrar bir düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 3.19: AP-2 PCR Bulgusu

NESTİN

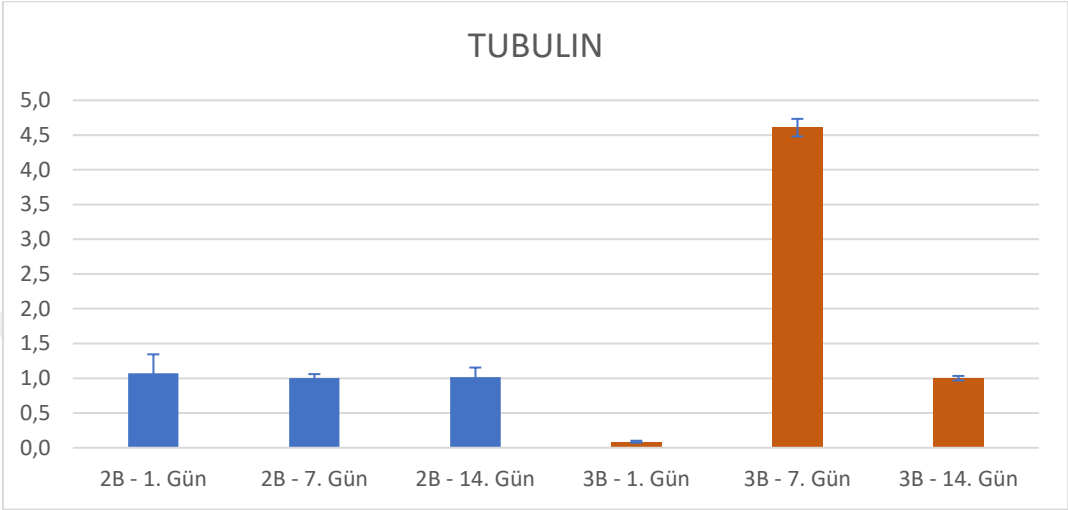
Nestin gen ekspresyon seviyesi 2B ortamda iki hafta boyunca incelendiğinde aynı sonucu vermektedir. 3B ortamda 14. günde ekspresyon seviyesi artmaktadır.



Şekil 3.20: NESTIN PCR Bulgusu

TUBB3

TUBB3 gen ekspresyonu 2B ortamda 1., 7. ve 14. günde aynı seviyededir. 3B ortamda 1. günde sıfıra yakın seviyedeyken 7. günde çok fazla yükseliş göstermiş ve 14. günde düşüş gözlenmiştir.

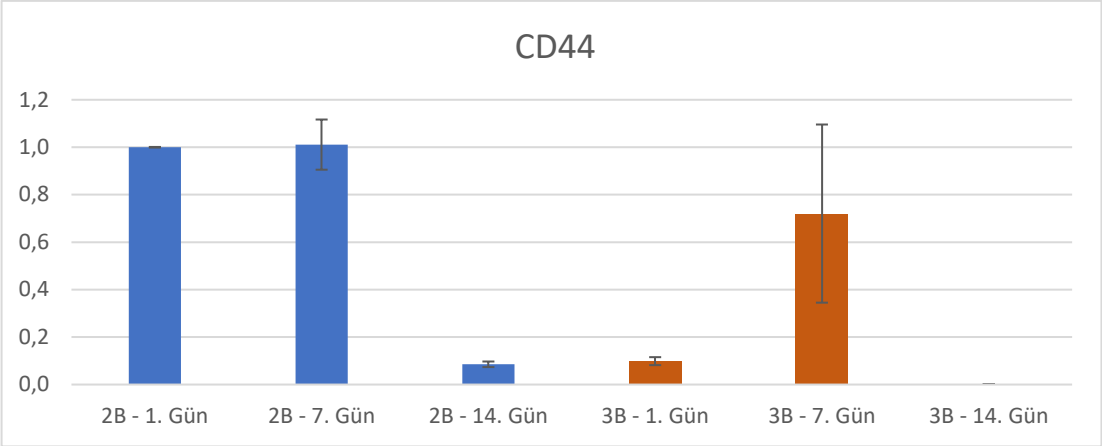


Şekil 3.21: TUBULIN PCR Bulgusu

3.8.5. MEZENKİMAL GENLER

CD44

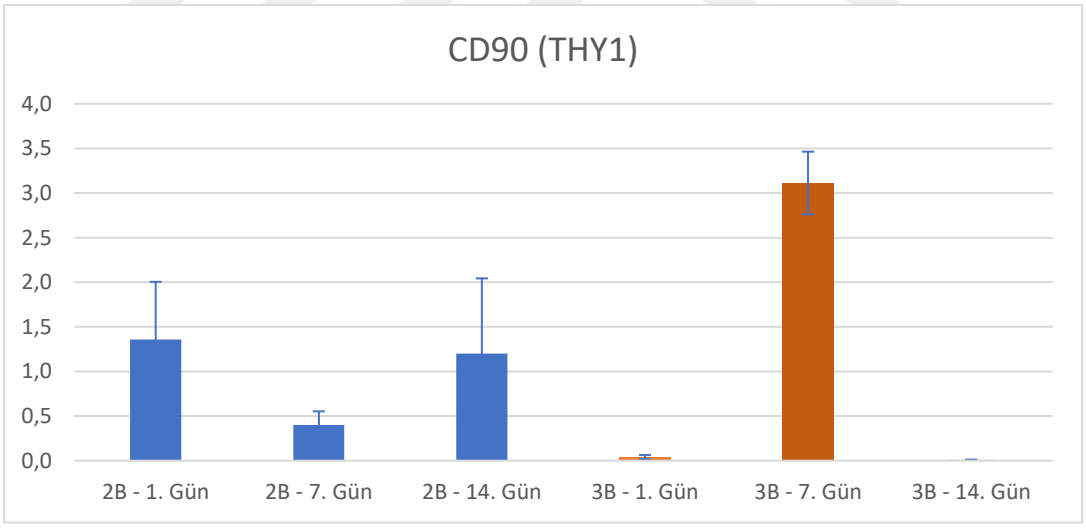
CD44 gen ekspresyon seviyesi 2B ortamda 1 ve 7. günde aynı iken14. günde düşüş gözlemlendi. 3B ortamda 7. günde yükselirken 14. günde düşmektedir.



Şekil 3.22: CD44 PCR Bulgusu

CD90/THY1

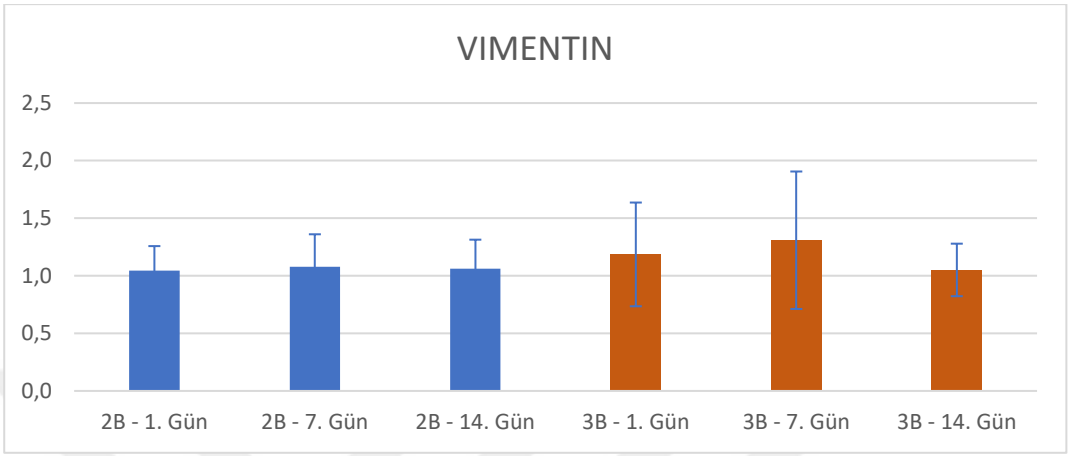
CD90 gen ekspresyon seviyesinde 2B otamda 7. günde düşerken 14. günde artış gözlemlendi. 3B ortamda ise 1 ve 14. günde sıfır seviyesine yakınken 7. günde yüksek bir seviyededir.



Şekil 3.23: THY-1 PCR Bulgusu

VIM

VIM gen ekspresyon seviyeleri 2B ortamda tüm günlerde aynı seviyededir. 3B ortamda 7. günde artarken14. günde düşüş göstermedir.

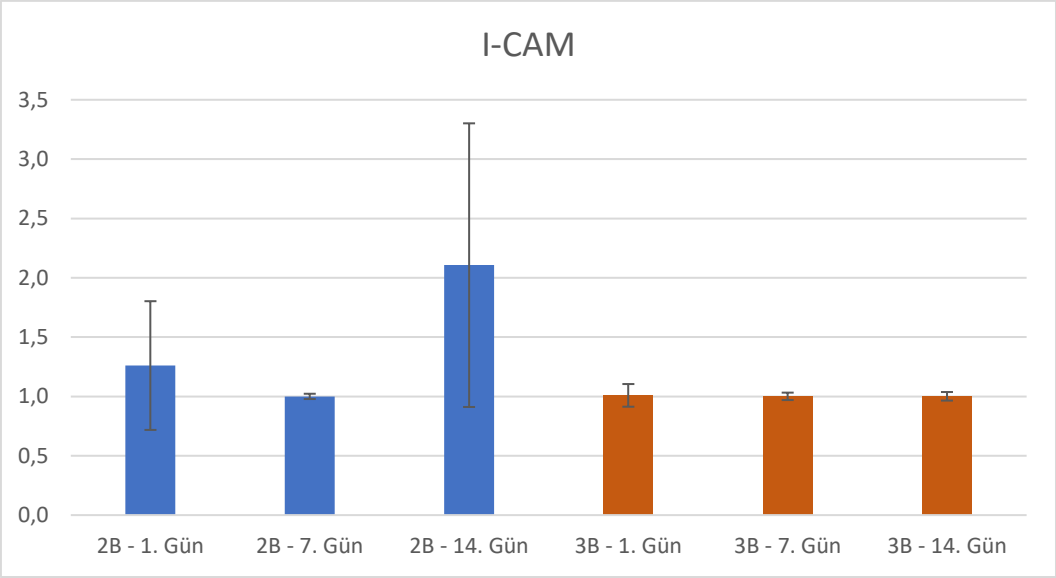


Şekil 3.24: VIMENTIN PCR Bulgusu

3.8.6. KÖKLÜLÜK GENLERİ

I-CAM

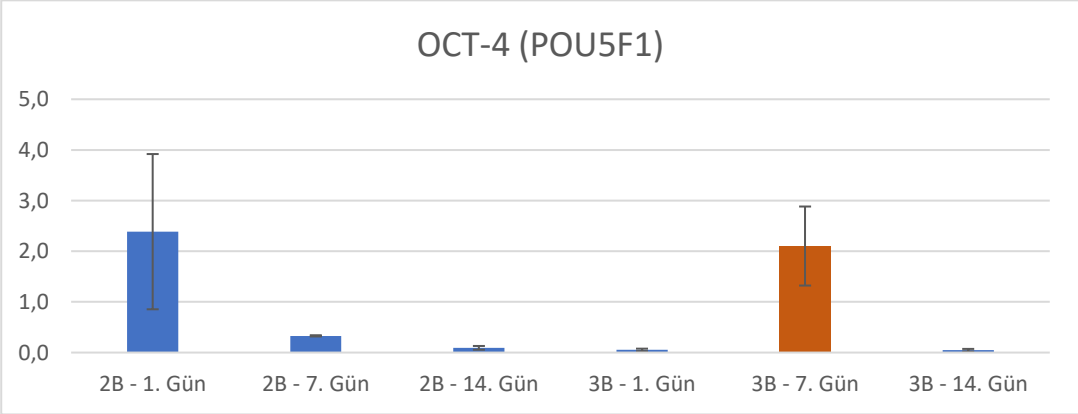
I-CAM gen ekspresyon seviyesinde 2B ortamda 7. günde düşerken 14. günde artış gözlemlendi. 3B ortamda ise iki hafta boyunca incelendiğinde gen ekspresyonu ayni seviyede olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.25: I-CAM PCR Bulgusu

OCT4/POU5F1

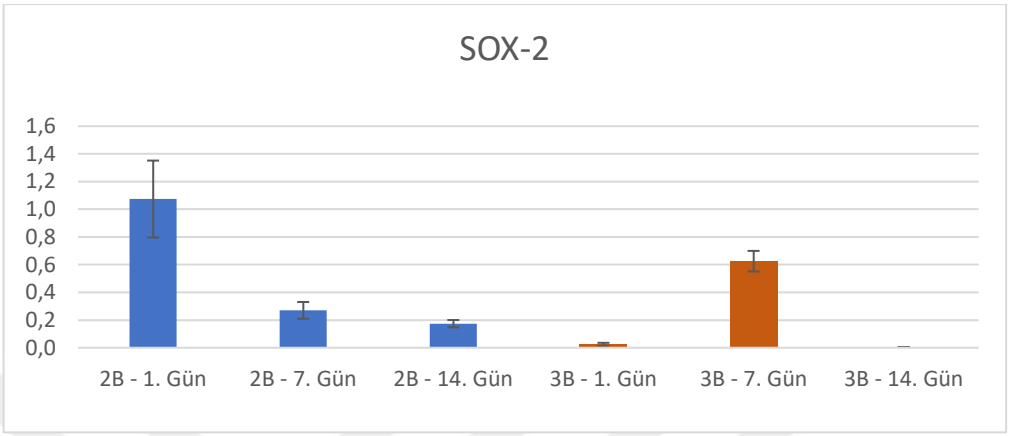
OCT4 gen ekspresyon seviyesi 2B ortamda 7. ve 14. günde düşmektedir. 3B ortamda ise 1 ve 14. günde sıfır seviyesine yakınken 7. günde yüksek bir seviyededir.



Şekil 3.26: POU5F1 PCR Bulgusu

SOX2

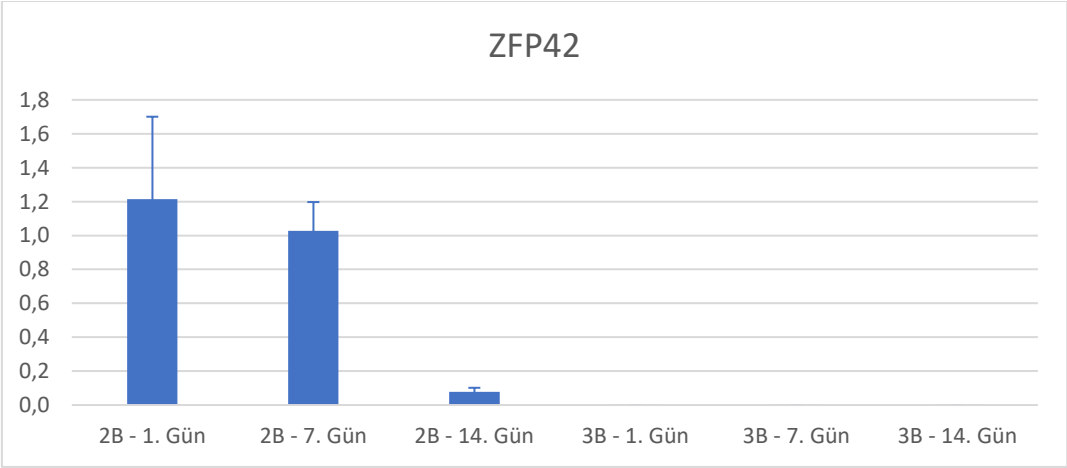
SOX2 gen ekspresyon seviyesi 2B ortamda 7. ve 14. günde düşmektedir. 3B ortamda ise 1. günde sıfır seviyesine yakınken 7. günde yüksek bir seviyededir.



Şekil 3.27: SOX-2 PCR Bulgusu

ZFP42

ZFP2 gen ekspresyon seviyesi 2B ortamda 7. ve 14. günde düşmektedir. 3B ortamda tüm günlerde gen seviyeleri sıfıra yakındır.

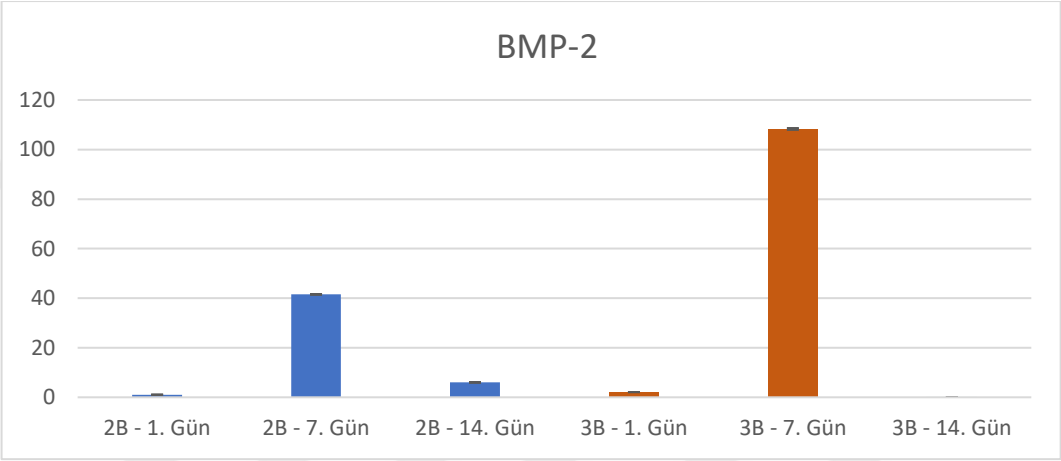


Şekil 3.28: ZFP42 PCR Bulgusu

3.8.7. FARKLILAŞMA GENLERİ

BMP2

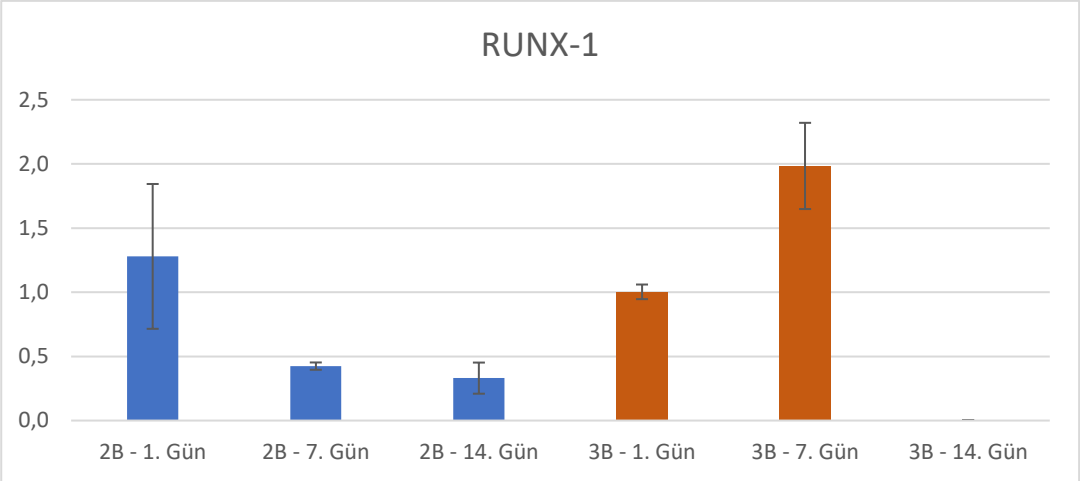
BMP2 gen ekpresyonu 2B ve 3B ortamda ise 1 ve 14. günde sıfır seviyesine yakınken 7. günde yüksek bir seviyededir.



Şekil 3.29: BMP-2 PCR Bulgusu

RUNX1

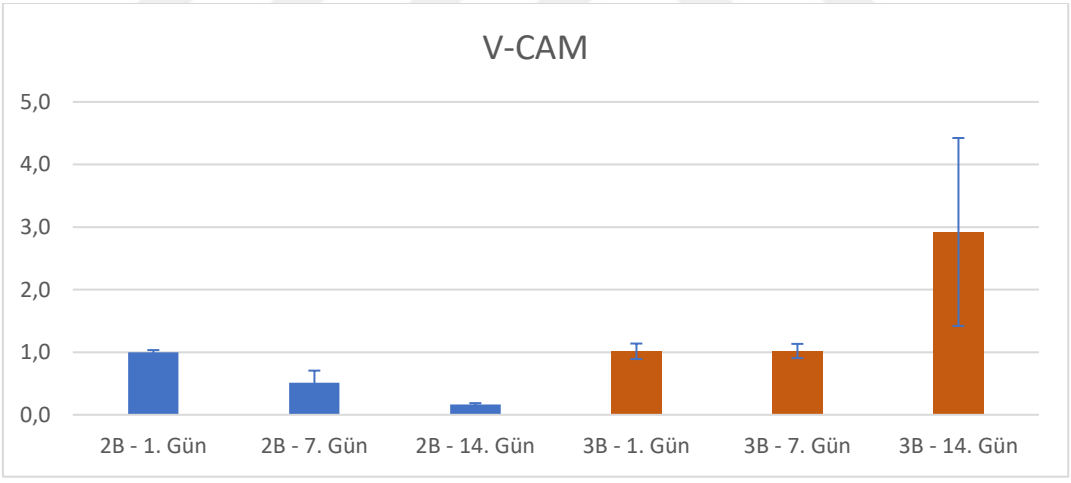
RUNX1 gen ekspresyon seviyesi 2B ortamda 7. ve 14. günde düşmektedir. 3B ortamda 7. günde yükselirken 14. günde düşmektedir.



Şekil 3.30: RUNX-1 PCR Bulgusu

V-CAM

V-Cam gen ekspresyon seviyesinde 2B ortamda 7 ve 14. günde düşüş gözlemlendi. 3B ortamda 1. ve 7. günde ayni seviyedeyken 14. günde artış gösterdi.



Şekil 3.31: V-CAM PCR Bulgusu

4. TARTIŞMA

4.1. 2B ve 3B Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücre biyolojisi, doku morfolojisi ve hastalık mekanizmaları, ilaç etkisi, protein üretimi ve doku mühendisliğini geliştirmek için yaygın olarak kullanılan bir *in vitro* araçtır. Kanser biyolojisi ile ilgili çoğu araştırma, *in vitro* 2B hücre kültürlerini kullanan deneylere dayanmaktadır. Bununla birlikte, 2B kültürlerin hücresel ve hücre dışı ortamlar arasındaki etkileşimlerin bozulması, hücre morfolojisindeki değişiklikler, polarite ve bölünme yöntemi gibi birçok sınırlaması vardır.

Adherent 2B kültürlerde, hücreler bir kültür şişesinde veya plastik bir yüzeye tutturulmuş düz bir petri kabında tek tabakalı (monolayer) olarak büyürler. 2B kültürlerin avantajları, hücre kültürünün basit ve düşük maliyetli bakımı ve fonksiyonel testlerin performansı ile ilişkilidir. Ne yazık ki, bağlı kültürlerin de birçok dezavantajı vardır. İlk olarak, 2B kültürlenmiş hücreler, dokuların veya tümörlerin doğal yapılarını taklit etmez. Bu kültür yönteminde, hücre-hücre ve hücre-hücre dışı ortam etkileşimleri, tümör kütlesinde olduğu gibi temsil edilmez. Bu etkileşimler hücre farklılaşmasından, çoğalmasından, canlılığından, genlerin ve proteinlerin ekspresyonundan, uyaranlara yanıt vermekten, ilaç metabolizmasından ve diğer hücresel fonksiyonlardan sorumludur. Dokudan izole edildikten ve 2B koşullarına aktarıldıktan sonra, hücrelerin morfolojisi, hücre bölünmesi modu gibi değiştirilir. Farklı fenotip kaybı da 2B kültürlemenin bir sonucudur. Hücrelerin değişen morfolojisi işlevlerini, hücre içindeki yapıların organizasyonunu, salgılanmasını ve hücre sinyalini etkileyebilir. Dış çevre ile etkileşimlerdeki rahatsızlıklar nedeniyle, yapışık büyüyen hücreler polaritelerini kaybeder, bu da bu hücrelerin apoptoz gibi çeşitli olaylara tepkisini değiştirir. 2B kültürünün bir diğer dezavantajı, tek tabakadaki hücrelerin oksijen, besinler, metabolitler ve sinyal molekülleri gibi ortamın bileşenlerine sınırsız erişime sahip olmasıdır. *In vivo* kanser hücreleri için, besinlerin, oksijenin ve benzerlerinin mevcudiyeti, tümör kütlesinin doğal mimarisi nedeniyle daha değişkendir. Ayrıca 2B sistemin hücrenin gen ekspresyonunu ve ekleme, topoloji ve biyokimyasını değiştirdiği gözlenmiştir. Ek olarak, yapışık kültürler genellikle mono-kültürlerdir ve sadece bir hücre tipinin

çalışmasına izin verir, bu da kanser başlatan hücreler tarafından *in vivo* olarak gerekli olan tümör mikroçevresinin veya nişlerin eksikliğine neden olur.

Bu dezavantajlar, *in vivo* koşulları daha yakından taklit edebilen üç boyutlu kültür modellerin oluşturulmasına yol açmıştır. Kültür koşullarının optimizasyonu, kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir, biyobelirteçlerin ve hedefleme tedavilerinin incelenmesini kolaylaştırabilir (Kapałczyńska ve ark., 2018b).

Bu çalışmada, 2B kültür ile 3B biyobaskı ile elde edilmiş kültürlerde *in vitro* ortamda gen düzeyinde zamanla gerçekleşen farklılıkları belirlemeyi amaçladık.

4.2. 3B Biyobaskı

Rejeneratif tıpta kök hücre teknolojisi, ilaç testi, tıbbi transplantasyon ve akademik araştırmalar için sınırsız hücre kaynağı sağlama potansiyeline sahiptir. İnsan dokusuna alternatif olarak kök hücreleri kullanarak gerçekçi bir doku modeli oluşturmak için yapay kök hücre mikroçevresi veya nişlerinin oluşturulması esastır. Üç boyutlu (3B) bioprinting, kök hücreleri katman katman nişlerine tam olarak yerleştirmek için yeni fırsatlar sunan umut verici bir doku mühendisliği alanıdır. Bu çalışma, biyobaskı teknolojilerini, 'biyo-mürekkeplerin' mevcut gelişimini ve biyobaskının kök hücre kültürüne nasıl uygulandığını ve bunların insan rejeneratif tıbbına yönelik uygulamalarını kapsamaktadır. Sertlik, kararlılık ve biyolojik bozunma, biyouyumluluk ve basılabilirlik gibi biyoink özelliklerine ilişkin temel hususlar vurgulanmıştır. Karaciğerden beyine kadar çeşitli yapay doku tipleri için hem yetişkin hem de pluriopotent kök hücrelerin biyobaskı gözden geçirilmiştir. İnsan rejeneratif tıbbı için kök hücre kaynaklı dokuların 3B biyobaskısı, yeni araştırmalar, endüstriler ve ürünler için fırsatların yanı sıra klinikte gelecekteki zorlukları temsil eden heyecan verici bir gelişmekte olan alandır. (Mandrycky ve ark., 2016b).

İlaç testi, organ nakilleri ve akademik araştırmalar genellikle elde etmesi zor olan insan dokusunda çalışmayı gerektirdiğinden, insan dokusuna alternatif bir çözüm geliştirilmesi istenmektedir. Çeşitli dokulardan elde edilip ölümsüzleştirilmiş hücre serileri, hem ilaç testlerinde hem de hastalık modellemesi gibi çeşitli

araştırmalarda kullanılmıştır. Sınırsız bir hücre kaynağını temsil eden bu hücre hatlarına rağmen, sahip oldukları içsel anormallikler ve mutasyonlar, göreceli doku kaynaklarının bir modeli olarak kullanımlarını sınırlar. Bu da araştırmacıları endojen kök hücreleri yenilenebilir insan dokusu üretimi için bir kaynak olarak kullanmaya itmiştir. Embriyonik, fetal ve erişkin kök hücreler, ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarından daha biyomimetik olan, çeşitli doku tiplerinden somatik hücreler üretmek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, dokudaki kök hücreler, kaybolduğunda kök hücrelerin kendiliğinden farklılaşmasına veya hücre ölümüne neden olabilecek bir niş içinde bulunmaktadır. Yapay kök hücre nişleri oluşturmak için araştırmacılar doku mühendisliği alanına ve son zamanlarda 3B biyobaskı alanına bakmışlardır (Skeldon ve ark., 2018).

Kök hücreler, çeşitli hücre tipleri haline gelebildikleri için rejeneratif tıpta muazzam bir umut vaat etmektedir. Ayrıca sürekli çoğalarak yenilenebilir bir hücre kaynağı sağlamaktadırlar. Son zamanlarda, kök hücreleri kullanan 3B baskı yapılarının, sağlıklı veya hastalıklı dokuları temsil eden modellerin yanı sıra hastalıklı ve hasarlı dokuların yerine geçebileceği de gösterilmiştir. Yağ dokusu, kan damarları, kemik, kalp dokusu, kıkırdak, kalp kapakçıkları, karaciğer, kas, sinir dokusu ve pankreas dahil olmak üzere çeşitli doku ve organlarda yapılan biyobaskı dokular gelecek için umut vaat etmektedir (Tasnim ve ark., 2018).

MKH'lar, karakteristik olarak osteoblastlara, adipositlere veya kondroblastlara *in vitro* olarak farklılaşma eğilimleriyle tanımlanırlar; bununla birlikte miyositler, tendositler, bağ hücreleri, düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kardiyomiyositler, hepatositler ve nöral hücreler gibi diğer mezenkimal ve mezenkimal olmayan hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine de sahiptirler (Tasnim ve ark., 2018)

Farklılaşmamış kök hücrelerin biyobaskılanması, MKH'ların immünosupresif özelliklerinin kullanılmasına veya diğer faktörler tarafından baskı sonrası farklılaşmaya potansiyel olarak olanak sağlayabilmektedir. Belirli bir soyu indüklemeye yönelik doğal bir önyargıya sahip olmayan bir biyobaskı yöntemi, uyarıcı olarak çözünür faktörlere güvenerek soy bağlılığında daha fazla varyasyonu destekleyebilir (Örneğin, daha yumuşak, düşük kesme tekniklerinin stimülasyonu tetikleme olasılığı daha düşüktür. Örneğin, bir lazer biyobaskı yönteminin, 2B

hücrelere kıyasla canlılık, proliferasyon, apoptoz veya kök hücre fenotipinde herhangi bir değişiklik olmadan MKH'ların yanıt verdigi gösterilmiştir (Blaeser ve ark., 2016). Hücrelerin ekstrüzyonunu veya mürekkep püskürtmeli baskısını takiben kök hücre multipotensini korumak için, farklılaşmayı teşvik edebilecek kök hücrelere “hedef doku” benzeri bir ortam sunmamak için sınırlı hücresel etkileşime sahip bir biyoink hidrojel faydalıdır. Örneğin aljinat, MKH'larin özelliklerini korurken biyobaskılanmasını sağlayan bir biyoinert hidrojeldir. Kesme gerilmesinin, mikrovalf kontrollü geri basınç destekli ekstrüzyon sistemi ile aljinat bazlı bir biyoinkte biyobaskılanan MKH'lar üzerindeki etkilerini incelendiği çalışma yapılmıştır. Baskı işlemi sırasında katlanan kayma gerilmesi kuvvetlerinin baskı sonrası canlılık ve proliferasyon hızı üzerinde büyük bir etkisi olduğunu, ancak MKH fenotipi üzerinde saptanabilir bir etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Aljinat baskılı hücrelerin özelliklerini korumayı başardığı, ancak hücre ölümününde yüksek veri verdiği gözlemlendi. Bunun yanı sıra ≥5 kpa'lık bir kesme gerilimi basıncında basıldığı zaman %94'lük bir baskılı hücre canlılığı sağlandığı gözlemlendi. Biyobaskı için 5 kpa'lık bir baskı basıncının düşük kabul edilmesine rağmen, dolaşım sistemi içinde fizyolojik olarak karşılaşılan 7 Pa'dan çok daha büyük olduğuna dikkat çekmektedir (Irvine & Venkatraman, 2016).

Biyobaskı, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında gelişen bir teknolojidir. İşlem, hücrelerin, biyomateryalin ve / veya büyüme faktörlerinin mikro ölçekli bir nozul vasıtasıyla basınçsız olarak eşzamanlı olarak biriktirilmesinden oluşur. Hücre canlılığı, basınç ve nozul çapı gibi parametrelerin değiştirilmesiyle kontrol edilebilir. Sürecin kendisi, bir *in vitro* hücre hasarı modelini değerlendirmek için çok yararlı bir araç olabilir. Hücre morfolojisini ve işlevini değiştirdikleri için işlem kaynaklı mekanik bozukluklara verilen hücre yanıtlarını anlamak esastır (Nair ve ark., 2009). 3B Daha önce 3B biyobaskının kök hücrelerde farklılaşmayı tetiklediği gösterilmiştir (Irvine & Venkatraman, 2016). Ancak bu alanda yapılan genetik analiz çalışmaları yok denecek kadar azdır. Çalışmamızda da bu eksikliği kapatmak amacıyla 3B Biyobaskı işleminin neden olduğu hücre gen ekspresyon değişimlerini analiz ettik.

4.3. Çalışmamızdaki Real-Time PCR Bulgularının Analizi

4.3.1. ADİPOJENİK GENLER

PPARG

PPARG geni, adiposit farklılaşmasını düzenlemektedir. Çalışmamızda PPAR-*G* gen ifadesi 2B grupta tüm günlerde 3B gruba göre fazla bulunmuştur.

LPL

Lipoprotein lipaz, lipid metabolizmasında rol oynamaktadır. Çalışmamızda LPL geni 3B gruplarda ilk günde 2B gruba göre yüksek olmasına karşın 1. ve 2 haftanın analizlerinde 2B grubundan daha düşük çıkmıştır.

Hücrelerin 2B kültürlerde özellikle hücre sayısı arttıkça hücrelerin spontan farklılaşması sık karşılaşılan bir durumdur. Spontan farklılaşma da genellikle de adipoz doku yönünde gerçekleşmektedir. Çalışmamızda adipojenik genlerde düşüş görülmesi, hücrelerin 3B ortamda yağ doku yerine kemik kıkırdak gibi dokulara farklılaşabileceğini işaret etmektedir.

4.3.2. OSTEOJENİK GENLER

ALP

Alkalin fosfataz, genellikle hücre yüzeyi ile sınırlı olan geniş bir dimerik enzim ailesi oluşturur. ALP kemik farklılaşmasında en sık incelenen genlerdendir. Çalışmamızda 14 gün süresinde ALP genlerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir.

BMP2

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında aynı zamanda kemik oluşumunun düzenlenmesinde kemik morfogenetik proteinleri (BMP) önemli rol oynar (Hong Huang ve ark., 2018). Çalışmamızda BMP-2 geninde her iki grupta da

7. günlerde öncesine ve sonrasına kıyasla daha yüksek ekspresyon düzeyleri gözlenmiştir. Bu artış 2B kültürde 40 kat kadarken 3B kültürde yaklaşık 100 kata kadar çıkmıştır.

COL1A1

Kolajenler, birçok doku ve organda önemli yapısal roller oynayan hücre dışı matris proteinleridir. Omurgalı bağ dokularında en bol bulunan protein olan Tip I kollajen, hiyalin kıkırdak dışındaki çoğu mezenkimal kökenli hücre tarafından üretilir. Tip1 kolajen aynı zamanda kemik dokunun temel kollajen tipidir.

Analizlerimizde tip I kollajen gen ekspresyonu 2B kültürlerde değişime uğramazken 3B kültürde 14 gün boyunca sabitken 3B kültürlerde sürekli bir artış göstermiştir.

RUNX2

Mezenkimal kök hücrelerin osteoblast ve kondrositlere farklılaşması için RUNX2 geninin regülasyonu kilit rol oynamaktadır. Çalışmamızda 2B grupta sabit olan gen ekspresyon düzeyinin 3B grupta çok daha yüksek başladığı ve haftalar arasında da farklılıklar olduğu görüldü.

14 günlük kültür sırasında artan tip I kollajen ve Runx2 sentezi hücrelerimizin kemik yönünde farklılaşmaya başlamış olabileceğini göstermektedir. Kemik farklılaştırma çalışmaları genellikle 21-28 gün sürdüğünden daha yüksek farklılaşma ve gen ekspresyon düzeyleri elde etmek için daha uzun süreli kültür gerektiği sonucuna varılmıştır.

4.3.3. KONDROJENİK GENLER

ACAN

ACAN geni tarafından kodlanan agrekan, büyüme plakası ve eklem kıkırdağındaki hücre dışı matrisin önemli bir proteoglikan bileşenidir. Kondrosit hücrelerinde artış gösterdiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Çalışmamızda

ACAN gen ifadesi 2B kültürlerde değişime uğramazken 3B kültürlerde Runx2 geni gibi ilk günde yüksek ancak sonraki günlerde değişken bir profil izlemiştir.

COMP

Kıkırdak oligomerik matris proteini (COMP), kıkırdak ve diğer dokulardaki çoklu hücre dışı matris proteinleri ile etkileşime giren büyük bir pentamerik glikoproteindir. Kıkırdak oluşumunda önemli rol oynayan COMP gen ifadesi 2B kültürlerde değişmezken 3B kültürlerde oldukça yüksek bulunmuştur.

SOX9

SOX9, kondrogenezdeki çoklu olayları düzenleyen bir ana transkripsiyon faktörüdür. Embriyo gelişimi sırasında kondrojenez taahhüdü de dahil olmak üzere hücre kaderi kararları için kritik olan SRY ile ilişkili yüksek hareketlilik grubu (HMG) box (SOX) transkripsiyon faktörleri ailesine aittir. Çalışmamızda Sox-9 gen ifadesi 2B kültürlerde değişmezken 3B kültürlerde beklenenin aksine düşüş göstermiştir.

Üç gen bir arada ele alındığında, özellikle COMP ve ACAN genlerindeki yüksek ekspresyon düzeyleri 3B kültürdeki hücrelerde yağ ve kemiğe kıyasla kıkırdak yönüne kayan bir farklılaşma olduğunu işaret etmektedir.

4.3.4. NÖROJENİK GENLER

AP2

Sinapslar membran homeostazını korumak için farklı mekanizmalar geliştirmiştir. APache, sinapsta normal sinaptik iletim için gerekli olan klatrin aracılı endositik mekanizmanın önemli bir aktörü olarak düşünülebilir. 2B grupta değişmeyen AP2 gen ekspresyonu özellikle 7. günde 3B grubunda oldukça yükselmiş, ancak sonraki hafta yapılan analizlerde düşüş görülmüştür.

NESTİN

Nestin, nöronal kök hücre belirteci olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda Nestin gen ifadesi 2B grupta değişmezken 3B grubunda düşüş göstermiş ancak ilerleyen haftalarda 2B kültürlerdeki seviyeye ulaşmıştır.

TUB

Merkezi ve periferik sinir sisteminin oluşumunda TUBB3 rol oynamaktadır. Tubulin gen ifadesi AP2 ile oldukça benzer şekilde 2B grupta değişmezken özellikle 7. günde 3B grubunda oldukça yükselmiş, ancak sonraki hafta yapılan analizlerde düşüş görülmüştür.

Nörojenik farklılaşma ile ilişkili genlerdeki değişim 3B kültürlerdeki hücrelerde nörona farklılaşmanın gerçekleşiyor olabileceğine işaret etmektedir. Ancak bu değişim ile ilgili gen ifadeleri özellikle 7 günde arttığı veya artmaya başladığından, nörojenik farklılaşmanın da 7. günden itibaren ortaya çıktığını söylemek mümkündür.

4.3.5. MEZENKİMAL GENLER

CD44

Bir transmembran protein olan CD44 hücrelerin birbirleri ve ECM ile adhezyonunda ve kanserleşmedeki Epitel-Mezenkimal dönüşümü (EMT) sürecinde rol alan bir proteindir. Çalışmamızda 2B kültürlerde değişim olmazken 3B kültürlerde başlangıçta görülen yüksek ekspresyon düzeyi hücrelerin adhezyon özelliklerini kaybettiklerinin /kazandıklarının işaretidir. Çalışmamızda CD44 gen düzeyleri 2B kültürlerde sabitken 3B kültürde önemli ölçüde düşmüştür. 14. günde her iki grupta da düşüş izlenmiştir.

CD90 / THY1

CD90 olarak da bilinen timus hücre antijeni 1 (THY-1), ilk olarak timoma hücrelerini tanıyan spesifik antikorların araştırılması sırasında tanımlandı. MKH'larda ifade edilen CD90 olarak da bilinen (THY-1), MKH'ların kader kararında kritik bir rol oynamaktadır. Son zamanlarda, THY-1'in MKH'ların osteojenik farklılaşmasını ve dolayısıyla kemik oluşumunu teşvik ettiği, adipogenik farklılaşmayı inhibe ettiği ve yağ dokusu birikimini kısıtladığı gösterilmiştir.

Önemli bir MKH belirteci olan CD90 gen ekspresyonunda 2B kültürde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. 3B kültürlerde ise ilk günde bir düşüş yaşanmış ancak 7 günde ekspresyon düzeyleri yüksek bulunmuştur. 14. Günde ise yeniden düşüş izlenmiştir. Bu durum CD90 pozitif hücrelerin sayısında geçici bir artış ve ardından hücrelerin farklılaşmasıyla gerçekleşen azalma şeklinde yorumlanmıştır.

VIM

Vimentin, bir tip III ara filament proteinini kodlar. Ara filamentler, mikrotübüller ve aktin mikrofilamentleri ile birlikte hücre iskeletini oluşturur. Kodlanmış protein, hücre şeklini ve sitoplazmanın bütünlüğünü korumaktan ve hücre iskeleti etkileşimlerini stabilize etmekten sorumludur. Çalışmamızda Vimentin gen ifadesinde gruplar ve günler arasında anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir.

4.3.6. KÖKLÜLÜK GENLERİ

I-CAM

Diş etlerinin yüzeyindeki bir yapışma proteini olan hücresel yapışma molekülü (CAM), hücreler ve hücre dışı matriksleri arasındaki yapışmanın önemli bir bileşenidir. Analizlerimizde I-CAM gen ekspresyonunda günler ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

OCT4/POU5F1

Pluripotensitiyi düzenlemede anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Pou5f1'ın apoptozu baskılayan ve hücre çoğalmasını arttıran rolleri keşfedilmiştir. 2B kültürde başlangıçta bir miktar yüksek olan Oct4 gen

ekspresyonunun ilerleyen günlerde azaldığı görülmüştür. 7. günde 3B kültürde bir miktar arttığı görülen ekspresyon ise CD90 ile birlikte yorumlandığında geçici olarak prolifere olan kök hücreleri işaret ediyor olabilir.

SOX2

SOX2, POU5F1 gibi pluripotensinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Erken embriyonik süreçte iç hücre kitlesinde, epiblast ve germ hücrelerinde PO5F1 ile birlikte ko-eksprese edilir. POU5F1'den Sox2'nin farkı ektraembriyonik ekdoterm ve embriyo ile yetişkinlerdeki sinir sistemi öncül hücrelerinde de eksprese edilmektedir. 2B gruplarda kültür süresi ve kültür kabındaki hücre miktarı arttıkça azalan Sox2 ekspresyonu, 3B kültürlerde CD90 ve Oct4'e benzer şekilde artmıştır.

ZFP42/Rex1

Rex1 (ZFP42) geni şu anda embriyonik kök hücrelerin bir belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. İncelediğimiz multipotent kök hücre tipi olan MKH'larda 2B kültürde ZFP42 geninde zamana bağlı bir düşüş görülürken 3B kültürlerde ekspresyona hiç rastlanmamıştır.

4.3.7. DİĞER GENLER

RUNX1

Runt-İlişkili Transkripsiyon Faktörü 1 (RUNX1) mezenkimal kök hücre alt tipinde yüksek oranda ifade edilir (Zhao ve ark., 2019b). Mezenkimal kök hücrelerde proliferasyonu ve miyofibroblast farkılaşmasında önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörüdür (W. Kim ve ark., 2014). Analizlerimiz 2B kültürlerde Runx1 gen ifadesinde azalma olduğunu ancak bunun aksine 3B kültürlerde özellikle 7. günde bir miktar artış olduğunu ortaya koymuştur. Ancak 14. günde ekspresyon düzeyi sıfırlanmıştır. Bu durum ilk aşamada artan ancak sonrasında azalan fibrobroblastik aktiviteye işaret etmekle birlikte analiz için daha fazla ilişkili gene ve örneğe ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

V-CAM

Vasküler hücre adezyon molekülü-1 (V-CAM-1), reaktif oksijen türleri ve TNFa ve interlökin-1 gibi proinflamatuar sitokinler dahil olmak üzere birçok hücre dışı uyarandan herhangi biri tarafından aktivasyon üzerine endotel hücrelerinde indüklenebilir ve ağırlıklı olarak eksprese edilebilen 90 kda'lık bir glikoproteindir. Analizlerimizde 2B kültürlerde V-CAM gen ifadesinde düşüş görülürken 3B kültürlerde görece artış mevcuttur. Bu durumun 2B kültürde artan hücre sayısı ile birlikte kültür kabına tutunan hücrelerde azalan adezyon miktarına işaret ederken 3B kültürde de tam tersi artan adezyonu ifade etmektedir.

LDHA

LDHA esas olarak sitoplazmada bulunur, ancak LDHA mitokondri ve çekirdekte de bulunmuştur. Çekirdeğin dışında LDHA, glikolizde kritik bir rol oynarken, çekirdekte LDHA, DNA duplikasyonuna ve transkripsiyonuna katılan tek iplikli bir DNA bağlayıcı protein (SSB) olarak işlev görür.

Çalışmamıza housekeeping geni olarak dahil ettiğimiz LDHA geni aynı zamanda metabolizma ile ilgili bir belirteç olarak ele alındığında 2 boyutta kültüre edilen hücrelerin metabolik aktivitelerinin daha yüksek 3B kültür ortamındakilerin ise daha düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Hidrojel içerisinde sınırlı besin ve oksijene maruz kalan kök hücrelerde bu durum aslında beklenen bir süreçtir.

4.4. 3B Ortamda Kök Hücre Farklılaşması

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH’lar) benzersiz immünomodülatör özellikleri, onları kronik inflamasyon veya otoimmün bozuklukların neden olduğu doku / organ hasarının onarımı için onemli bir hücre tipi yapmaktadir. Greft versus host hastalığı (GVHD) ve alerjik bozukluklar gibi bağışıklık bozukluklarının tedavisinde büyük umut vaat etmelerine rağmen, yaygın klinik uygulamalarından önce üstesinden gelinmesi gereken birçok zorluk vardır. MKH'ların biyolojik

özelliklerinin anlaşılması, immünomodülasyon için MSC bazlı transplantasyon mekanizmalarını netleştirecektir (Gao ve ark., 2016).

3B Biyobaskı yöntemiyle 3B hücre kültürü ortamı oluşturmak için kullanılan hADMKH'ların düz kas farklılaşması üzerinde olumlu bir etkisi olduğu, geleneksel tek hücreli stratejilere göre daha yüksek hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunu elde etmenin uygulanabilir bir yolu olduğu gözlemlenmiştir (Yipeng ve ark., 2017).

Çalışmamıza benzer bir araştırmada 7, 14 ve 21 gün sonra kondrojenik markörlerin (COL2A1 ve agrekan) gen ekspresyonu, osteogenez markörü (COL1A1) ve hipertrofi markörü (COL10A1) gen ekspresyonu, RT-qPCR yoluyla kalitatif olarak değerlendirilmiştir. (Costantini ve ark., 2016).

Spesifik adipojenik belirteçlerin gen ekspresyon seviyeleri; LPL and PPAR-γ genleri ile kontrol edilir (Gruene ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada ADMKH'ların, adipojenik belirteçlerin ekspresyonu açısından kök hücre davranışlarını sürdürdüğü gösterilmiştir (Wang ve ark., 2018). Başka bir çalışmada 3B kültürde adipojenik marker genlerinden PPAR-y ve FABP4 ekspresyonu 2B kültürlenmiş hücrelere kıyasla 3B kültürde sırasıyla 2.0 ve 2.2 kat artmıştır (Henriksson ve ark., 2017).

Kemik iliği kaynaklı MKH'ların osteojenik farklılaşma üzerine oldukça çalışma vardır. Bu hücrelerin 3B biyoyazıcılar ile sferoid üretimi ALP (osteoblastların majör enzimatik aktivitesi), COL-1A1 (osteoblastlar tarafından eksprese edilen ana kollajen) ve OCN (osteoblastlar tarafından salgılanan matriks proteini ve olgun osteoblastların bir belirteci) gibi osteojenik genleri eksprese ettiğini göstermektedir (Aguilar ve ark., 2019).

Bir başka çalışmada, ilginç bir şekilde, 3D iskeledeki hBMSC'lerin, 2B doku kültür plastiğinde yetiştirilenlerden daha yüksek osteokalsin ve kemik spesifik protein (*BSPII)* ekspresyonuna sahip olduğu görülmüştür (H. Lin ve ark., 2019).

Mezenkimal kök hücre kapsülleme tekniğinin, hasarlı bir dokuyu yeniden oluşturmak için kök hücrelerin implantasyonunda önemli bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır. MKH kapsüllemesi, hücre canlılığını korumak ve MKH kaderini çoklu soylara düzenleyen kök hücre farklılaşmasını indüklemek için üç boyutlu (3B) *in vivo* bir ortamın taklit edilmesini sağlar. Dahası, MKH'ları çevreleyen 3B matris onları insan doğuştan gelen bağışıklık sisteminden korur ve oksijen, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi biyomoleküllerin difüzyonuna izin verir. Bu nedenle, çeşitli

malzemeler, şekiller ve boyutlara sahip MKH kapsülleme platformları oluşturmak için birçok teknoloji geliştirilmektedir. Platformun koşulları hedeflenen doku ve translasyon yöntemi ile belirlenir. Burada, mikro kalıplama, elektrostatik damlacık ekstrüzyonu, mikroakışkanlar ve biyobaskı gibi MKH kapsülleme teknolojilerinin ve bunların doku rejenerasyonu için uygulanmasının çeşitli ayrıntılarını sunmaktadır (H. Kim ve ark., 2019).

3B biyobasılan glioma hücre yüklü iskeleler, epitelyal-mezenkimal geçiş yoluyla glioma kök hücrelerini zenginleştirmektedir (X. Wang ve ark., 2019).3B biyobasılan hücrelerin yüksek hücre canlılığına sahip olduğu, kardiyojenik soya bağlılıklarını korudukları ve erken kardiyak transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Ong ve ark., 2017).

Hücre biyolojisi alanı sürekli olarak farklı boyuta doğru ilerlemektedir. 2B bulgularını daha fizyolojik bir ortamda doğrulamak, daha sağlam ilaç ekranları ve organotipik modeller geliştirmek ve doku mühendisliği veya rejeneratif amaçları akılda tutmak için çabalıyor. Tüm bu çalışmalarda, gözlemlenen tutarsızlıkları boyutsallığın spesifik olmayan etkilerine atfetmek yerine mikroçevrenin eleştirel bir incelemesi, istenen bir etkinin ardındaki spesifik ipuçlarını ve mekanizmaları ortaya çıkarmak için gerekli olacaktır. Koşullara bağlı olarak, hücre davranışının 2B ve 3B bağlamlar arasında farklılık göstermesinin çarpıcı biçimde farklı ve genellikle birden çok nedeni olabileceğini öğrenilmiştir (Baker & Chen, 2012).

5. SONUÇ

Hücre kültür sistemlerinde klasik yöntemlerden iki boyutlu (2B) kültür sistemleri kullanılmaktadır. Ancak bu sistemler, hücre ve dokuların vücut içindeki gibi 3 boyutlu (3B) karakterizasyonunu yansıtmamaktadır. Araştırmalar 3B kültür ile gerçekleştirilen deneylerin, standart 2B kültüre göre daha doğru sonuçlar verdiğini ve aslında kültür çalışmalarının 3 boyutta yapılması gerektiğini işaret etmektedir.

Üç boyutlu hücre kültürü modelleri ve daha gelişmiş mikro-çipler, mikro-akışkan teknolojisi, mikro akışkan hücre kültür sistemleri, hücre göçü çalışmaları, gen ekspresyon analizi, hücresel fonksiyon ve farklılaşma çalışmaları, ilaç metabolizması ve toksisite, hastalık teşhisi gibi birçok alanda 3B hücre kültür sistemlerinden yararlanılmaktadır. Bu sistemlerden en yenisi 3B biyoyazıcılar yapay organ üretimidir. Günümüzde 3B biyoyazıcılar kullanılarak kıkırdak, kemik, karaciğer gibi dokular küçük ölçeklerde basılabilmektedir. Bu alanda yeni çalışmalar çok bulunmamaktadır. Çalışmamızda iki boyutlu klasik sistem ile 3B biyoyazıcı kullanılarak oluşturulan üç boyutlu kültürlerde mezenkimal kök hücrelerin gen ekpresyon değişimlerini incelemesi sunulmaktadır.

Kök hücrelerin uzun süreli ve yüksek konfluenside kültürünün kök hücrelik özelliklerinde düşüşe neden olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda da bazı kök hücre genlerinde, 2B kültürde bile kültür süresine bağlı olarak düşüş yaşandığı belirlenmiştir. 3B kültürlerde ise bu düşüş daha hızlı gerçekleşmekte ve hücreler bioprinting sürecinin ardından içine gömüldükleri 3B ortamda doğrudan farklılaşmaya yönelmektedir. Ancak bulgularımız farklılaşan hücrelerin yanında farklılaşmadan kalan bir miktar kök hücrenin proliferasyona devam ediyor olabileceğini ve sayılarının farklılaşmaya girmiş olan hücrelere oranla ilk hafta süresince artabileceğine işaret etmektedir. Ancak ilerleyen dönemde, hücre matriks etkileşiminin de etkisiyle bu hücrelerde de gerçekleşen farklılaşmalar sonucunda tüm kök hücre genlerinde düşüş izlenmiştir.

Kök hücrelerde 3B ortamda gerçekleştirilen bu spontan farklılaşma deneyinde göz önünde bulundurulması gereken bir nokta da 3B kültür içerisinde değişik noktalarda bulunan hücre gruplarının değişik yönlerde farklılaşmaya gidebileceğidir.

Hidrojelin besin ve oksijene yakın olan kısmındaki hücreler canlılıklarını ve kök hücre özelliklerini koruyabilir ve daha çok çoğalabilirken besine ve oksijene uzak olan hücreler metabolik aktiviteleri ve oksijen ihtiyaçları daha az olan kondroblastik hücrelere dönüşebilir.

Çalışmamızda yaptığımız gen ekspresyon analizleri de bize olarak 3B biyobaskının kök hücreleri hızla farklılaşmaya yönlendirdiği, bu farklılaşma süreci içinde, özellikle bir yönlendirme yapılmadığı sürece, kondrojenik farklılaşmanın en olası alternatif olduğu, bunu osteojenik ve nörojenik farklılaşmanın takip ettiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak çalışmamız 3B biyobaskı yönteminin, kök hücrelerin kemik/kıkırdak farklılaşması için kullanılabileceğini bu da gelecekte geliştirilecek yöntemler ile kemik kırıkları gibi hastalıkların tedavisinde bir alternatif olabileceğini göstermiştir.

KAYNAKÇA

Aguilar, I. N., Olivos, D. J., Brinker, A., Alvarez, M. B., Smith, L. J., Chu, T. M. G., Kacena, M. A., & Wagner, D. R. (2019). Scaffold-free bioprinting of mesenchymal stem cells using the Regenova printer: Spheroid characterization and osteogenic differentiation. *Bioprinting (Amsterdam, Netherlands)*, *15*. https://doi.org/10.1016/J.BPRINT.2019.E00050

Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, *92*(1–2), 41–51. https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2016.02.005

Alonzo, M., AnilKumar, S., Roman, B., Tasnim, N., & Joddar, B. (2019). 3D Bioprinting of cardiac tissue and cardiac stem cell therapy. In *Translational Research* (Vol. 211, pp. 64–83). Mosby Inc. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.04.004

Axpe, E., & Oyen, M. L. (2016). Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. *International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 1976*, *17*(12), 1976. https://doi.org/10.3390/IJMS17121976

Baker, B. M., & Chen, C. S. (2012). Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, *125*(13), 3015–3024. https://doi.org/10.1242/JCS.079509/258092/AM/DECONSTRUCTING-THE-THIRD-DIMENSION-HOW-3D-CULTURE

Birgersdotter, A., Sandberg, R., & Ernberg, I. (2005). Gene expression perturbation in vitro - A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 15, Issue 5 SPEC. ISS., pp. 405–412). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.06.009

Blaeser, A., Duarte Campos, D. F., Puster, U., Richtering, W., Stevens, M. M., & Fischer, H. (2016). Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Advanced Healthcare Materials*, *5*(3), 326–333. https://doi.org/10.1002/ADHM.201500677

Breathwaite, E., Weaver, J., Odanga, J., Pena-Ponce, M. dela, & Lee, J. B. (2020). 3D Bioprinted Osteogenic Tissue Models for In Vitro Drug Screening. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(15). https://doi.org/10.3390/MOLECULES25153442

Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. In *Drug Discovery Today* (Vol. 18, Issues 5–6, pp. 240–249). Elsevier Current Trends. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003

Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2016). The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*, *7*(29), 45745–45756. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9935

Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, *9*(5), 641–650. https://doi.org/10.1002/jor.1100090504

Cesarz, Z., & Tamama, K. (2016). Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. In *Stem Cells International* (Vol. 2016). Hindawi Publishing Corporation. https://doi.org/10.1155/2016/9176357

Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., & Noisa, P. (2019). Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World Journal of Stem Cells*, *11*(12), 1065. https://doi.org/10.4252/WJSC.V11.I12.1065

Chang, N., Xiu, L., & Li, L. (2014). Sphingosine 1-Phosphate Receptors Negatively Regulate Collagen Type I/III Expression in Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell. *Journal of Cellular Biochemistry*, *115*(2), 359–367. https://doi.org/10.1002/JCB.24670

Chen, K. L., Li, D., Lu, T. X., & Chang, S. W. (2020). Structural characterization of the CD44 stem region for standard and cancer-associated isoforms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1). https://doi.org/10.3390/ijms21010336

Chen, L., & Daley, G. Q. (2008). Molecular basis of pluripotency. *Human Molecular Genetics*, *17*(R1), R23–R27. https://doi.org/10.1093/HMG/DDN050

Chitcholtan, K., Sykes, P. H., & Evans, J. J. (2012). The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *Journal of Translational Medicine*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-38

Choudhury, D., Tun, H. W., Wang, T., & Naing, M. W. (2018). Organ-Derived Decellularized Extracellular Matrix: A Game Changer for Bioink Manufacturing? In *Trends in Biotechnology* (Vol. 36, Issue 8, pp. 787–805). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.03.003

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V., & Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, *107*(1), 367–372. https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657

Costa, E. C., de Melo-Diogo, D., Moreira, A. F., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2018). Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnology Journal*, *13*(1). https://doi.org/10.1002/BIOT.201700417

Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. In *Biotechnology Advances* (Vol. 34, Issue 8, pp. 1427–1441). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002

Costantini, M., Idaszek, J., Szöke, K., Jaroszewicz, J., Dentini, M., Barbetta, A., Brinchmann, J. E., & Święszkowski, W. (2016). 3D bioprinting of BM-MSCs-loaded ECM biomimetic hydrogels for in vitro neocartilage formation. *Biofabrication*, *8*(3), 035002. https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/035002

Cui, N., Qian, J., Liu, T., Zhao, N., & Wang, H. (2015). Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, *126*, 192–198. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.013

Deeb, S. S., & Peng, R. (2002). Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry*, *28*(10), 4131–4135. https://doi.org/10.1021/BI00436A001

Derakhshanfar, S., Mbeleck, R., Xu, K., Zhang, X., Zhong, W., & Xing, M. (2018). 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. In *Bioactive Materials* (Vol. 3, Issue 2, pp. 144–156). KeAi Communications Co. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. https://doi.org/10.1080/14653240600855905

Dong, C., & Lv, Y. (2016). Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. In *Polymers* (Vol. 8, Issue 2). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/polym8020042

Dzwonek, J., & Wilczyński, G. M. (2015). CD44: Molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(MAY). https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00175

Echave, M. C., Pimenta-Lopes, C., Pedraz, J. L., Mehrali, M., Dolatshahi-Pirouz, A., Ventura, F., & Orive, G. (2019). Enzymatic crosslinked gelatin 3D scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Pharmaceutics*, *562*, 151–161. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.043

Fahy, N., de Vries-van Melle, M. L., Lehmann, J., Wei, W., Grotenhuis, N., Farrell, E., van der Kraan, P. M., Murphy, J. M., Bastiaansen-Jenniskens, Y. M., & van Osch, G. J. V. M. (2014). Human osteoarthritic synovium impacts chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via macrophage polarisation state. *Osteoarthritis and Cartilage*, *22*(8), 1167–1175. https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2014.05.021

Falanga, V. (2012). Stem cells in tissue repair and regeneration. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 132, Issue 6, pp. 1538–1541). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/jid.2012.77

Feng, Y., Liu, X., & Pauklin, S. (2021). 3D chromatin architecture and epigenetic regulation in cancer stem cells. *Protein & Cell*, *12*(6), 440. https://doi.org/10.1007/S13238-020-00819-2

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Proliferation*, *3*(4), 393–403. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x

Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., Tse, H. F., Fu, Q. L., & Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death & Disease 2016 7:1*, *7*(1), e2062–e2062. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327

Giannitelli, S. M., Basoli, F., Mozetic, P., Piva, P., Bartuli, F. N., Luciani, F., Arcuri, C., Trombetta, M., Rainer, A., & Licoccia, S. (2015). Graded porous polyurethane foam: A potential scaffold for oro-maxillary bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *51*, 329–335. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.002

Griffith, L. G., & Swartz, M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2006 7:3*, *7*(3), 211–224. https://doi.org/10.1038/nrm1858

Gruene, M., Pflaum, M., Deiwick, A., Koch, L., Schlie, S., Unger, C., Wilhelmi, M., Haverich, A., & Chichkov, B. N. (2011). Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells. *Biofabrication*, *3*(1), 015005. https://doi.org/10.1088/1758-5082/3/1/015005

Gurski, L. A., Jha, A. K., Zhang, C., Jia, X., & Farach-Carson, M. C. (2009). Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials*, *30*(30), 6076–6085. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.054

Haleem-Smith, H., Calderon, R., Song, Y., Tuan, R. S., & Chen, F. H. (2012). Cartilage oligomeric matrix protein enhances matrix assembly during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*(4), 1245–1252. https://doi.org/10.1002/JCB.23455

He, S., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 25, pp. 377–406). Annual Reviews Inc. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248

Heinrich, M. A., Liu, W., Jimenez, A., Yang, J., Akpek, A., Liu, X., Pi, Q., Mu, X., Hu, N., Schiffelers, R. M., Prakash, J., Xie, J., & Zhang, Y. S. (2019). 3D Bioprinting: from Benches to Translational Applications. In *Small* (Vol. 15, Issue 23). Wiley-VCH Verlag. https://doi.org/10.1002/smll.201805510

Henriksson, I., Gatenholm, P., & Hägg, D. A. (2017). Increased lipid accumulation and adipogenic gene expression of adipocytes in 3D bioprinted nanocellulose scaffolds. *Biofabrication*, *9*(1), 015022. https://doi.org/10.1088/1758-5090/AA5C1C

Hongisto, V., Jernström, S., Fey, V., Mpindi, J. P., Kleivi Sahlberg, K., Kallioniemi, O., & Perälä, M. (2013a). High-Throughput 3D Screening Reveals Differences in Drug Sensitivities between Culture Models of JIMT1 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, *8*(10), 77232. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077232

Hongisto, V., Jernström, S., Fey, V., Mpindi, J. P., Kleivi Sahlberg, K., Kallioniemi, O., & Perälä, M. (2013b). High-Throughput 3D Screening Reveals Differences in Drug Sensitivities between Culture Models of JIMT1 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, *8*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077232

Hu, X., Tang, J., Hu, X., Bao, P., Pan, J., Chen, Z., & Xian, J. (2018). MiR-27b Impairs Adipocyte Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells by Targeting LPL. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *47*(2), 545–555. https://doi.org/10.1159/000489988

Huang, Hong, Dou, L., Song, J., & Luo, J. (2018). CBFA2T2 is required for BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *496*(4), 1095–1101. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.144

Huang, Hongzhou, Ding, Y., Sun, X. S., & Nguyen, T. A. (2013). Peptide Hydrogelation and Cell Encapsulation for 3D Culture of MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, *8*(3), 59482. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059482

Huch, M., & Koo, B. K. (2015). Modeling mouse and human development using organoid cultures. In *Development (Cambridge)* (Vol. 142, Issue 18, pp. 3113–3125). Company of Biologists Ltd. https://doi.org/10.1242/dev.118570

Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 21, Issue 12, pp. 745–754). Trends Cell Biol. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005

Irvine, S. A., & Venkatraman, S. S. (2016). Bioprinting and Differentiation of Stem Cells. *Molecules 2016, Vol. 21, Page 1188*, *21*(9), 1188. https://doi.org/10.3390/MOLECULES21091188

Jian, D., Wang, Y., Jian, L., Tang, H., Rao, L., Chen, K., Jia, Z., Zhang, W., Liu, Y., Chen, X., Shen, X., Gao, C., Wang, S., & Li, M. (2020). METTL14 aggravates endothelial inflammation and atherosclerosis by increasing FOXO1 N6-methyladeosine modifications. *Theranostics*, *10*(20), 8939. https://doi.org/10.7150/THNO.45178

Jimeno, A., Feldmann, G., Suárez-Gauthier, A., Rasheed, Z., Solomon, A., Zou, G. M., Rubio-Viqueira, B., García-García, E., López-Ríos, F., Matsui, W., Maitra, A., & Hidalgo, M. (2009). A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Molecular Cancer Therapeutics*, *8*(2), 310–314. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0924/354305/P/A-DIRECT-PANCREATIC-CANCER-XENOGRAFT-MODEL-AS-A

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018a). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, *14*(4), 910–919. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018b). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science : AMS*, *14*(4), 910. https://doi.org/10.5114/AOMS.2016.63743

Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sarıboyacı, A. E., Kaymaz, F., & Kasap, M. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural

properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and Cell Biology*, *132*(5), 533–546. https://doi.org/10.1007/S00418-009-0629-6

Karaöz, E., Doğan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., Genç, Z. S., Yürüker, S., Duruksu, G., Demircan, P. Ç., & SarIboyacI, A. E. (2010). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology*, *133*(1), 95–112. https://doi.org/10.1007/S00418-009-0646-5

Kenny, P. A., Lee, G. Y., Myers, C. A., Neve, R. M., Semeiks, J. R., Spellman, P. T., Lorenz, K., Lee, E. H., Barcellos-Hoff, M. H., Petersen, O. W., Gray, J. W., & Bissell, M. J. (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology*, *1*(1), 84–96. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004

Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., & Vacanti, J. P. (2006). Microscale technologies for tissue engineering and biology. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 103, Issue 8, pp. 2480–2487). Proc Natl Acad Sci U S A. https://doi.org/10.1073/pnas.0507681102

Kim, D. H., Provenzano, P. P., Smith, C. L., & Levchenko, A. (2012). Matrix nanotopography as a regulator of cell function. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 197, Issue 3, pp. 351–360). J Cell Biol. https://doi.org/10.1083/jcb.201108062

Kim, H., Bae, C., Kook, Y. M., Koh, W. G., Lee, K., & Park, M. H. (2019). Mesenchymal stem cell 3D encapsulation technologies for biomimetic microenvironment in tissue regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*, *10*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/S13287-018-1130-8/FIGURES/6

Kim, K. J., Choi, M. S., Shim, J. H., & Rhie, J.-W. (2019). Bone Morphogenetic Protein 2-Conjugated Silica Particles Enhanced Early Osteogenic Differentiation of Adipose Stem Cells on the Polycaprolactone Scaffold. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *16*(4), 395–403. https://doi.org/10.1007/s13770-019-00195-x

Kim, T. K., Park, C. S., Na, H. J., Lee, K., Yoon, A., Chung, J., & Lee, S. (2017). Ig-like domain 6 of VCAM-1 is a potential therapeutic target in TNFα-induced angiogenesis. *Experimental & Molecular Medicine 2017 49:2*, *49*(2), e294–e294. https://doi.org/10.1038/emm.2016.147

Kim, W., Barron, D. A., Martin, R. S., Chan, K. S., Tran, L. L., Yang, F., Ressler, S. J., & Rowley, D. R. (2014). RUNX1 is essential for mesenchymal stem cell proliferation and myofibroblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(46), 13389–16394. https://doi.org/10.1073/pnas.1407097111

Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, *85*(1), 3–10. https://doi.org/10.1159/000345615

Komori, T. (2019). Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of

Osteoblasts by Runx2. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 1694*, *20*(7), 1694. https://doi.org/10.3390/IJMS20071694

Kraehenbuehl, T. P., Langer, R., & Ferreira, L. S. (2011). Three-dimensional biomaterials for the study of human pluripotent stem cells. *Nature Methods 2011 8:9*, *8*(9), 731–736. https://doi.org/10.1038/nmeth.1671

Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research*, *752*(1), 10–24. https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2012.08.001

LaBarge, M. A., Petersen, O. W., & Bissell, M. J. (2007). Of microenvironments and mammary stem cells. *Stem Cell Reviews*, *3*(2), 137–146. https://doi.org/10.1007/S12015-007-0024-4

Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesisin a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. In *Science* (Vol. 345, Issue 6194). American Association for the Advancement of Science. https://doi.org/10.1126/science.1247125

Langhans, S. A. (2018a). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue JAN, p. 6). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006

Langhans, S. A. (2018b). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(JAN). https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00006

Lasprilla, A. J. R., Martinez, G. A. R., Lunelli, B. H., Jardini, A. L., & Filho, R. M. (2012). Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 30, Issue 1, pp. 321–328). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.019

Latremoliere, A., Cheng, L., DeLisle, M., Wu, C., Chew, S., Hutchinson, E. B., Sheridan, A., Alexandre, C., Latremoliere, F., Sheu, S. H., Golidy, S., Omura, T., Huebner, E. A., Fan, Y., Whitman, M. C., Nguyen, E., Hermawan, C., Pierpaoli, C., Tischfield, M. A., … Engle, E. C. (2018). Neuronal-Specific TUBB3 Is Not Required for Normal Neuronal Functionbut Is Essential for Timely Axon Regeneration. *Cell Reports*, *24*(7), 1865. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.07.029

Leberfinger, A. N., Dinda, S., Wu, Y., Koduru, S. V., Ozbolat, V., Ravnic, D. J., & Ozbolat, I. T. (2019). Bioprinting functional tissues. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 95, pp. 32–49). Acta Materialia Inc. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.009

Lee, J., Kim, H. K., Rho, J. Y., Han, Y. M., & Kim, J. (2006). The Human OCT-4 Isoforms Differ in Their Ability to Confer Self-renewal *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(44), 33554–33565. https://doi.org/10.1074/JBC.M603937200

Lee, M. Y., Lu, A., & Gudas, L. J. (2010). Transcriptional regulation of Rex1 (zfp42) in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, *224*(1), 17–27. https://doi.org/10.1002/JCP.22071

Lei, K. F., Wu, M. H., Hsu, C. W., & Chen, Y. D. (2014). Real-time and non-invasive impedimetric monitoring of cell proliferation and chemosensitivity in a perfusion 3D cell culture microfluidic chip. *Biosensors & Bioelectronics*, *51*, 16–21. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2013.07.031

Lendahl, U., Zimmerman, L. B., & McKay, R. D. G. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, *60*(4), 585–595. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90662-X

Lin, H., Tang, Y., Lozito, T. P., Oyster, N., Wang, B., & Tuan, R. S. (2019). Efficient in vivo bone formation by BMP-2 engineered human mesenchymal stem cells encapsulated in a projection stereolithographically fabricated hydrogel scaffold. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/S13287-019-1350-6

Lin, J., & Redies, C. (2012). Histological evidence: Housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Development Genes and Evolution*, *222*(6), 369–376. https://doi.org/10.1007/S00427-012-0420-X/FIGURES/4

Luo, Y., Lin, X., & Huang, P. (2018). 3D Bioprinting of Artificial Tissues: Construction of Biomimetic Microstructures. *Macromolecular Bioscience*, *18*(6), 1800034. https://doi.org/10.1002/mabi.201800034

Lyck, R., & Enzmann, G. (2015). The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. *Current Opinion in Hematology*, *22*(1), 53–59. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000103

Ma, X., Liu, J., Zhu, W., Tang, M., Lawrence, N., Yu, C., Gou, M., & Chen, S. (2018). 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *132*, 235–251. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.011

Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. H. (2016a). 3D bioprinting for engineering complex tissues. In *Biotechnology Advances* (Vol. 34, Issue 4, pp. 422–434). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011

Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. H. (2016b). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, *34*(4), 422–434. https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.12.011

Márquez-González, R. M., Saucedo-Sariñana, A. M., Barros-Núñez, P., Gallegos-Arreola, M. P., Pineda-Razo, T. D., Marin-Contreras, M. E., Flores-Martínez, S. E., Sánchez-Corona, J., & Rosales-Reynoso, M. A. (2020). CD44 genotypes are associated with susceptibility and tumor characteristics in colorectal cancer patients. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, *250*(2), 109–119. https://doi.org/10.1620/tjem.250.109

Midha, S., Dalela, M., Sybil, D., Patra, P., & Mohanty, S. (2019). Advances in three-dimensional bioprinting of bone: Progress and challenges. In *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Vol. 13, Issue 6, pp. 925–945). John Wiley and Sons Ltd. https://doi.org/10.1002/term.2847

Mueller-Klieser, W. (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *The American Journal of Physiology*, *273*(4). https://doi.org/10.1152/AJPCELL.1997.273.4.C1109

Nair, K., Gandhi, M., Khalil, S., Yan, K. C., Marcolongo, M., Barbee, K., & Sun, W. (2009). Characterization of cell viability during bioprinting processes. *Biotechnology Journal*, *4*(8), 1168–1177. https://doi.org/10.1002/BIOT.200900004

Neumüller, R. A., & Knoblich, J. A. (2009). Dividing cellular asymmetry: Asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. In *Genes and Development* (Vol. 23, Issue 23, pp. 2675–2699). Genes Dev. https://doi.org/10.1101/gad.1850809

Ong, C. S., Yesantharao, P., Huang, C. Y., Mattson, G., Boktor, J., Fukunishi, T., Zhang, H., & Hibino, N. (2017). 3D bioprinting using stem cells. *Pediatric Research 2018 83:1*, *83*(1), 223–231. https://doi.org/10.1038/pr.2017.252

Pattabiraman, S., Azad, G. K., Amen, T., Brielle, S., Park, J. E., Sze, S. K., Meshorer, E., & Kaganovich, D. (2020). Vimentin protects differentiating stem cells from stress. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-020-76076-4

Piccini, A., Castroflorio, E., Valente, P., Guarnieri, F. C., Aprile, D., Michetti, C., Bramini, M., Giansante, G., Pinto, B., Savardi, A., Cesca, F., Bachi, A., Cattaneo, A., Wren, J. D., Fassio, A., Valtorta, F., Benfenati, F., & Giovedì, S. (2017). APache Is an AP2-Interacting Protein Involved in Synaptic Vesicle Trafficking and Neuronal Development. *Cell Reports*, *21*(12), 3596–3611. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.11.073

Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P. A. (2003). CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 4, Issue 1, pp. 33–45). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrm1004

Posey, K. L., Coustry, F., & Hecht, J. T. (2018). Cartilage oligomeric matrix protein: COMPopathies and beyond. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, *71–72*, 161–173. https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2018.02.023

Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., & Chiellini, E. (n.d.). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, *35*(4), 403–440. Retrieved November 24, 2020, from https://www.academia.edu/25674627/Polymeric_materials_for_bone_and_cartilage_repair

Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Poniewierska, A., Suszynska, M., & Ratajczak, J. (2012). Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. In *Advances in Medical Sciences* (Vol. 57, Issue 1, pp. 1–17). Adv Med Sci. https://doi.org/10.2478/v10039-012-0020-z

Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Paul Solomon, F. D. (2015). 3D cell culture systems: Advantages and applications. *Journal of Cellular Physiology*, *230*(1), 16–26. https://doi.org/10.1002/jcp.24683

Redmond, J., McCarthy, H., Buchanan, P., Levingstone, T. J., & Dunne, N. J. (2021). Advances in biofabrication techniques for collagen-based 3D in vitro culture models for breast cancer research. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, *122*. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2021.111944

Rossant, J. (2001). Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. *Stem Cells*, *19*(6), 477–482. https://doi.org/10.1634/stemcells.19-6-477

Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M., & Barbarisi, A. (2004). From cell-ECM interactions to tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, *199*(2), 174–180. https://doi.org/10.1002/JCP.10471

Saalbach, A., & Anderegg, U. (2019). Thy-1: more than a marker for mesenchymal stromal cells. *The FASEB Journal*, *33*(6), 6689–6696. https://doi.org/10.1096/FJ.201802224R

Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, *44*(21), 5713–5724. https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7

Sarkar, U., Rivera-Burgos, D., Large, E. M., Hughes, D. J., Ravindra, K. C., Dyer, R. L., Ebrahimkhani, M. R., Wishnok, J. S., Griffith, L. G., & Tannenbaum, S. R. (2015). Metabolite profiling and pharmacokinetic evaluation of hydrocortisone in a perfused three-dimensional human liver bioreactor. *Drug Metabolism and Disposition*, *43*(7), 1091–1099. https://doi.org/10.1124/dmd.115.063495

Sarker, M. D., Naghieh, S., Sharma, N. K., & Chen, X. (2018). 3D biofabrication of vascular networks for tissue regeneration: A report on recent advances. In *Journal of Pharmaceutical Analysis* (Vol. 8, Issue 5, pp. 277–296). Xi'an Jiaotong University. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2018.08.005

Schmuth, M., Haqq, C. M., Cairns, W. J., Holder, J. C., Dorsam, S., Chang, S., Lau, P., Fowler, A. J., Chuang, G., Moser, A. H., Brown, B. E., Mao-Qiang, M., Uchida, Y., Schoonjans, K., Auwerx, J., Chambon, P., Willson, T. M., Elias, P. M., & Feingold, K. R. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, *122*(4), 971–983. https://doi.org/10.1111/J.0022-202X.2004.22412.X

Scotland, K. B., Chen, S., Sylvester, R., & Gudas, L. J. (2009). Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. *Developmental Dynamics*, *238*(8), 1863–1877. https://doi.org/10.1002/DVDY.22037

Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., & Deschaseaux, F. (2008). Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4 + CD25 high FOXP3 + Regulatory T Cells . *Stem Cells*, *26*(1), 212–222. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0554

Sengupta, P., Xu, Y., Wang, L., Widom, R., & Smith, B. D. (2005). Collagen alpha1(I) gene (COL1A1) is repressed by RFX family. *The Journal of Biological Chemistry*,

280(22), 21004–21014. https://doi.org/10.1074/JBC.M413191200

Shamir, E. R., & Ewald, A. J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: Experimental models of mammalian biology and disease. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 10, pp. 647–664). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrm3873

Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, *29*(3), 269–278. https://doi.org/10.1007/S12291-013-0408-Y

Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H., & Glogauer, M. (2015). Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. In *Materials* (Vol. 8, Issue 9, pp. 5744–5794). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ma8095273

Sherley, J. L. (2002). Asymmetric Cell Kinetics Genes: The Key to Expansion of Adult Stem Cells in Culture. *Stem Cells*, *20*(6), 561–572. https://doi.org/10.1634/stemcells.20-6-561

Skeldon, G., Lucendo-Villarin, B., & Shu, W. (2018). Three-dimensional bioprinting of stem-cell derived tissues for human regenerative medicine. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *373*(1750). https://doi.org/10.1098/RSTB.2017.0224

Song, H., & Park, K. H. (2020). Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration. *Seminars in Cancer Biology*, *67*, 12–23. https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2020.04.008

Souza, A. G., Silva, I. B. B., Campos-Fernandez, E., Barcelos, L. S., Souza, J. B., Marangoni, K., Goulart, L. R., & Alonso-Goulart, V. (2018). Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Current Pharmaceutical Design*, *24*(15), 1689–1694. https://doi.org/10.2174/1381612824666180404152304

Stratton, S., Shelke, N. B., Hoshino, K., Rudraiah, S., & Kumbar, S. G. (2016). Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. In *Bioactive Materials* (Vol. 1, Issue 2, pp. 93–108). KeAi Communications Co. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.11.001

Sun, J., & Tan, H. (2013). Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. In *Materials* (Vol. 6, Issue 4, pp. 1285–1309). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ma6041285

Sutherland, R. M., Inch, W. R., Mccredie, J. A., & Kruuv, J. (1970). A Multi-component Radiation Survival Curve Using an inï¿¿Vitro Tumour Model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics*, *18*(5), 491–495. https://doi.org/10.1080/09553007014551401

Szot, C. S., Buchanan, C. F., Freeman, J. W., & Rylander, M. N. (2011). 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials*, *32*(31), 7905–7912. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.001

Tamama, K., Kawasaki, H., Kerpedjieva, S. S., Guan, J., Ganju, R. K., & Sen, C. K. (2011). Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(3), 804–817. https://doi.org/10.1002/JCB.22961

Tasnim, N., De la Vega, L., Anil Kumar, S., Abelseth, L., Alonzo, M., Amereh, M., Joddar, B., & Willerth, S. M. (2018). 3D Bioprinting Stem Cell Derived Tissues. *Cellular and Molecular Bioengineering*, *11*(4), 219–240. https://doi.org/10.1007/S12195-018-0530-2/FIGURES/6

Tavakoli, S., Ghaderi Jafarbeigloo, H. R., Shariati, A., Jahangiryan, A., Jadidi, F., Jadidi Kouhbanani, M. A., Hassanzadeh, A., Zamani, M., Javidi, K., & Naimi, A. (2020). Mesenchymal stromal cells; a new horizon in regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, *235*(12), 9185–9210. https://doi.org/10.1002/JCP.29803

Tibbitt, M. W., & Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. In *Biotechnology and Bioengineering* (Vol. 103, Issue 4, pp. 655–663). Biotechnol Bioeng. https://doi.org/10.1002/bit.22361

Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. In *European Journal of Immunology* (Vol. 36, Issue 10, pp. 2566–2573). Eur J Immunol. https://doi.org/10.1002/eji.200636416

Ugurlu, B., & Karaoz, E. (2020). Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Acta Histochemica*, *122*(8). https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2020.151634

Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M., & Stojkovic, M. (2018). Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *International Journal of Medical Sciences*, *15*(1), 36–45. https://doi.org/10.7150/IJMS.21666

Wagegg, M., Gaber, T., Lohanatha, F. L., Hahne, M., Strehl, C., Fangradt, M., Tran, C. L., Schönbeck, K., Hoff, P., Ode, A., Perka, C., Duda, G. N., & Buttgereit, F. (2012). Hypoxia Promotes Osteogenesis but Suppresses Adipogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in a Hypoxia-Inducible Factor-1 Dependent Manner. *PLOS ONE*, *7*(9), e46483. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0046483

Wang, C. Q., Mok, M. M. H., Yokomizo, T., Tergaonkar, V., & Osato, M. (2017). Runx family genes in tissue stem cell dynamics. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 962, pp. 117–138). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2_9

Wang, H. Y., Zhang, Y., Zhou, Y., Lu, Y. Y., Wang, W. F., Xin, M., & Guo, X. L. (2016). Rosiglitazone elevates sensitization of drug-resistant oral epidermoid carcinoma cells to vincristine by G2/M-phase arrest, independent of PPAR-γ pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *83*, 349–361. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.06.047

Wang, L., Li, X. H., & Ning, W. C. (2016). Evaluation of ICAM-1 and VCAM-1 Gene Polymorphisms in Patients with Periodontal Disease. *Medical Science Monitor*, *22*, 2386–2391. https://doi.org/10.12659/MSM.896979

Wang, X., Dai, X., Zhang, X., Ma, C., Li, X., Xu, T., & Lan, Q. (2019). 3D bioprinted glioma cell-laden scaffolds enriching glioma stem cells via epithelial–mesenchymal transition. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *107*(2), 383–391. https://doi.org/10.1002/JBM.A.36549

Watt, F. M., & Hogan, B. L. M. (2000). Out of eden: Stem cells and their niches. In *Science* (Vol. 287, Issue 5457, pp. 1427–1430). Science. https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1427

Yang, T. L. (2011). Chitin-based materials in tissue engineering: Applications in soft tissue and epithelial organ. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 12, Issue 3, pp. 1936–1963). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ijms12031936

Yipeng, J., Yongde, X., Yuanyi, W., Jilei, S., Jiaxiang, G., Jiangping, G., & Yong, Y. (2017). Microtissues enhance smooth muscle differentiation and cell viability of hADSCs for three dimensional bioprinting. *Frontiers in Physiology*, *8*(JUL), 534. https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00534/FULL

Zhang, S., & Wang, H. (2019). Current Progress in 3D Bioprinting of Tissue Analogs. In *SLAS Technology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 70–78). SAGE Publications Inc. https://doi.org/10.1177/2472630318799971

Zhao, K., Cui, X., Wang, Q., Fang, C., Tan, Y., Wang, Y., Yi, K., Yang, C., You, H., Shang, R., Wang, J., & Kang, C. (2019a). RUNX1 contributes to the mesenchymal subtype of glioblastoma in a TGFβ pathway-dependent manner. *Cell Death and Disease*, *10*(12), 877. https://doi.org/10.1038/s41419-019-2108-x

Zhao, K., Cui, X., Wang, Q., Fang, C., Tan, Y., Wang, Y., Yi, K., Yang, C., You, H., Shang, R., Wang, J., & Kang, C. (2019b). RUNX1 contributes to the mesenchymal subtype of glioblastoma in a TGFβ pathway-dependent manner. *Cell Death & Disease*, *10*(12), 877. https://doi.org/10.1038/s41419-019-2108-x

İNTİHAL RAPORU

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 20-Oca-2022 23:47 +03
NUMARA: 1744985456
Kelime Sayısı: 19828
Gönderildi: 1

Meral Tez 1 Büşra Başer tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%9	Internet Sources: %9 Yayınlar: %1 Öğrenci Ödevleri: N/A

4% match (07-Ara-2021 tarihli internet)
https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/2243/4.pdf?isAllowed=y&sequence=1

1% match (10-Haz-2021 tarihli internet)
https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/1462/ZeynepPurenAkguner.pdf?isAllowed=y&sequence=2

1% match (30-Nis-2019 tarihli internet)
http://icomuscongress.org/FileUpload/as941698/File/icomus_tam_metinler-vol.3.pdf

1% match (11-Oca-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/364282/yokAcikBilim_10308953.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (07-Ara-2021 tarihli internet)
https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/2133/ZEHRAGUL-ERGUL-YUKSEL.pdf?isAllowed=y&sequence=1

< 1% match (07-Ara-2021 tarihli internet)
https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/2241/690882.pdf?isAllowed=y&sequence=1

< 1% match (07-Ara-2021 tarihli internet)
https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/1219/Remzi%20Okan%20Akar.pdf?isAllowed=y&sequence=5

< 1% match (10-Oca-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/144584/yokAcikBilim_10198052.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (03-Eyl-2021 tarihli internet)
https://docplayer.biz.tr/113559093-Istinye-universitesi-saglik-bilimleri-enstitusu.html

< 1% match (21-Ağu-2021 tarihli internet)
https://docplayer.biz.tr/168920159-Istinye-universitesi-saglik-bilimleri-enstitusu.html

< 1% match (12-May-2021 tarihli internet)
https://docplayer.biz.tr/156372698-Adipoz-kokenli-mezenkimal-kok-hucrelerin-polietilenglikol-dimetakrilat-hidrojellerde-kahverengi-ve-beyaz-adipoz-dokuya-farklilasmalarinin-incelenmesi.html