



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**EKSTRASELÜLER MATRİKSİN HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ TEMELLİ MODELLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dilara YAŞAROĞLU

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Müjgan CENGİZ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Kasım, 2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Dilara YAŞAROĞLU tarafından, **Prof. Dr. Müjgan CENGİZ** danışmanlığında hazırlanan "Ekstraselüler Matriksin Hücre Yaşlanması Üzerindeki Etkisinin Hücre Kültürü Temelli Modelle Değerlendirilmesi" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **28/11/2024** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Müjgan CENGİZ İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. İlhan ONARAN İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Burçak YAVUZ Altınbaş Üniversitesi Tıbbi Görüntüleme Programı Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret



Hayatım boyunca bana inanan, sevgisi ve fedakarlıklarıyla beni bugünlere getiren canım
aileme ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

EKSTRASELÜLER MATRİKSİN HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ TEMELLİ MODELLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon

Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 37532



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince rehberliği, bilgisi ve deneyimiyle bana ışık tutan; destek ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. .Müjgan CENGİZ’e,

Bu çalışmanın fikir aşamasından itibaren bana ilham veren, her adımda yanımda olarak yolumu aydınlatan bu süreci başarıyla tamamlamama katkı sunan değerli Prof.Dr.İlhan ONARAN’a

Çalışmamda karşılaştığım zorlukları sabırla dinleyerek bana yol gösteren destekleyici yaklaşımı ve samimi ilgisiyle çözüme ulaşmamda büyük katkı sağlayan kıymetli Doç.Dr.Nurten BAHTİYAR’a

Çalışmamın ilerlemesi için laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan, bu süreçte bana destek olan değerli Prof.Dr.Oğuzhan GÜNDÜZ’e

Çalışmamdan öte, bana laboratuvarda deneyim kazandıran ve sayesinde hücre kültürünün temellerini öğrendiğim, her problemime bir çözüm sunan Dr.Ögr.Üyesi Ayşe Ceren Çalıkoğlu KOYUNCU’ya

Çalışmamın daha verimli ilerlemesinde büyük katkıda bulunan, tüm sorularımı nazik yaklaşımıyla ve sabırla yanıtlayan değerli hocam Dr.Ögr.Üyesi Burçak YAVUZ’a

Bu zorlu tez sürecinde, her anımda yanımda olan, tüm sorunları birlikte çözdüğüm, yalnızca bu tezde değil, hayatımda en büyük motivasyon kaynağım olan, yalnızca bilimsel bir deneyim değil, gerçek dostluğun ne kadar değerli olduğunu öğreten canım arkadaşım Aisha SULEYMANOVA'ya

Hayatımda olduğu gibi yüksek lisans sürecimde de her an yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini arkamda hissettiğim, hayattaki en büyük şansım olan canım ABLAM, canım ANNEM ve canım BABAM’a

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

Kasım 2024

Dilara YAŞAROĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hücre Yaşlanması (Senesens)	4
2.1.1. Telomer Kısılması	5
2.1.2. Mitokondriyal Disfonksiyon	6
2.1.3. Morfolojik değişiklikler	6
2.1.4. Replikatif Yaşlanma	6
2.1.5. Senesens ile ilişkili β -Galaktosidaz Aktivitesi	8
2.1.6. Yaşlanan Hücrelerden Salınan Faktörler	8
2.2. Hücrelerin Mikroçevresi	10
2.2.1. Hücre Dışı Matriks (ECM)	11
2.2.2. Yaşlanma Sürecinde Ekstraselüler Matriks Değişiklikleri	15
2.3.4. Hücre Yaşlanması ve ECM ile ilişkili Genler	17
2.3.4.1. p53	17
2.3.4.2. NAD Bağımlı Deasetilaz Sirtuin-1 (SİRTUİN 1)	18
2.3.4.3. NÜKLEER FAKTÖR KAPPA-B (NF-kB)	19
2.4. Doku Mühendisliği	21
2.4.1. Doku mühendisliği stratejileri	22
2.4.2. 3 Boyutlu Biyoyazıcı	22

2.5. Üç Boyutlu Hücre Kültürü	23
2.5.1. İskele bazlı 3B hücre kültürü modelleri	24
2.5.2. Biyomürekkep olarak ECM'nin rolü.....	26
2.6. Hücresizleştirme.....	26
2.6.1. Hücresizleştirilmiş Ekstrasellüler Matriks Hidrojeli	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Hücresizleşmiş Dermal Hücre Dışı Matriksinin Eldesi	32
3.2. Hücresizleşmiş Dermal Hücre Dışı Matriksinin Karakterize Edilmesi	34
3.2.1. DNA içerik analizi.....	34
3.2.2. DNA Miktarının Ölçümü ve Saflık Tayini.....	34
3.3. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	35
3.4. Hücre Kültürü	36
3.4.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi.....	36
3.4.2. Hücrelerin Beslenmesi ve Pasajlanması.....	37
3.4.3. Hücre Sayımı	37
3.4.4. Hücrelerin Dondurulması	38
3.5. Deselülerize dermal hücre dışı matriksinin 3B biyobaskı teknoloji kullanılarak üretimi.....	38
3.5.1. Hidrojel hazırlanması	38
3.5.2. Hücre Yüklü Hidrojel Hazırlanması.....	39
3.5.3. Üç Boyutlu Biyoyazıcı Sistemi.....	41
3.5.4. Üç Boyutlu Biyobasım Süreci.....	41
3.5.5. Biyobasım İnkübasyon Süreci.....	42
3.5.6. Örneklerin Toplanması.....	42
3.5.7. RNA İzolasyonu.....	42
3.5.8. Konsantrasyon Ölçümü.....	44
3.5.9. cDNA Sentezi.....	44
3.5.10. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) İşlemi.....	44
4. BULGULAR.....	48
4.1. Hücresizleştirme Protokolünün İşlemi ve Doğrulanması	48
4.1.1. DNA Miktarının Ölçümü	49
4.1.2. FTIR Analizi.....	49
4.2. RNA İzolasyon Bulguları.....	51
4.2.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları (GZ-PZR)	51
4.2.2. Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi	51

5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	58
KAYNAKLAR.....	64



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Fibroblast Hücresinin ECM Bileşenlerini Salgılama Modeli.....	13
Şekil 2.2. Genç Ve Yaşlanmış Hücrelerde ECM Dengesi	16
Şekil 2.3. SIRT1'in Hücrel Yaşlanmayı Baskılama Mekanizması	18
Şekil 2.4. NF-kB Aktivasyonu	20
Şekil 3.1. Genç Sıçan (Solda) Ve Yaşlı Sıçan (Sağda)	33
Şekil 3.2. Hücresizleştirme Protokolünün Akış Şeması	34
Şekil 3.3. Çalışma Kapsamında Kullanılan FTIR Cihazı	35
Şekil 3.4. İnsan Dermal Fibroblastlarının Mikroskopik Görüntüsü (10X).....	36
Şekil 3.5. Liyofilize Doku	39
Şekil 3.6. HDM Dokusunun Sindirilme Süreci.	39
Şekil 3.7. Genç Ve Yaşlı ECM İle Fibroblast Kombinasyonlarını Gösteren DeneySEL Grup Şeması.....	40
Şekil 3.8. Üç Boyutlu Biyoyazıcı Sistemi Ve Tasarımı	41
Şekil 3.9. dECM Hidrojelin Şırınga İçerisindeki Görüntüsü.....	42
Şekil 4.1. Hücresizleştirme Protokolünün Süreci	48
Şekil 4.2. DNA Miktarının Ölçülmesi.....	49
Şekil 4.3. Genç Ve Yaşlı Doğal Doku Ve HDM FTIR Spektrumları	50
Şekil 4.4. Trizol İzolasyonu Sonrası; RNA, DNA, Ve Protein Fazlarına Ayrılmış Örnek.	51
Şekil 4.5. A, B, C Ve D Gruplarında Bulunan Fibroblast Hücrelerinde P53 Gen İfadesinin 0., 3., 7. Ve 10. Günlerdeki Değişiminin İncelenmesi.	52
Şekil 4.6. A,B,C Ve D Gruplarında Bulunan Fibroblast Hücrelerinin COL1A1 Gen İfadesinin 0., 3., 7. Ve 10. Günlerdeki Değişiminin İncelenmesi.	53
Şekil 4.7. A,B,C Ve D Gruplarında Bulunan Fibroblast Hücrelerinin MMP1 Gen İfadesinin 0., 3., 7. Ve 10. Günlerdeki Değişiminin İncelenmesi	54

Şekil 4.8. A,B,C Ve D Gruplarında Bulunan Fibroblast Hücrelerinin GLB1 Gen İfadesinin 0., 3., 7. Ve 10. Günlerdeki Değişiminin İncelenmesi 55

Şekil 4.9. A,B,C Ve D Gruplarında Bulunan Fibroblast Hücrelerinin SIRT1 Gen İfadesinin 0., 3., 7. Ve 10. Günlerdeki Değişiminin İncelenmesi 56

Şekil 4.10. A, B, C Ve D Gruplarında Bulunan Fibroblast Hücrelerinin NF-kB Gen İfadesinin 0., 3., 7. Ve 10. Günlerdeki Değişiminin İncelenmesi 57



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. İntegrinlerle Etkileşen Matriks Proteinleri.....	12
Tablo 3.1. cDNA Sentezi	44
Tablo 3.2.GZ-PZR Reaksiyon Karışımı İçeriği.....	45
Tablo 3.3. GZ-PZR Termal Döngü Koşulları.....	45
Tablo 3.4. GZ-PZR’da Kullanılan Primer Dizileri.....	46

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
µg	Mikrogram
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Millimetre
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar	Açıklama
2B	: İki Boyutlu
3B	: Üç Boyutlu
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
cDNA	: Komplementer Dioksiribonükleik Asit
CO ₂	: Karbondioksit
COL1A1	: Kollajen, Tip I, Alfa 1
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-F12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dnaz	: Deoksiribonükleaz
ECM	: Ekstraselüler Matriks
FBS	: Fetal Bovine Serum
GLB1	: Beta Galaktosidaz
HDF	: İnsan Dermal Fibroblast Hücreleri
MMP1	: Matris Metallopeptidaz 1
NF-κB	: Nükleer Faktör NF-kappa-B
P53	: Tümör Protein 53

PBS	: Fosfat Tampon Çözeltilisi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
Rnaz	: Ribonükleaz
RT-PZR	: Gerçek Zamanlı Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir
SIRT1	: Sirtuin 1



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKSTRASELÜLER MATRİKSİN HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ TEMELLİ MODELLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dilara YAŞAROĞLU

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman : Prof. Dr. Müjgan CENGİZ

İnsan diploid fibroblastları, büyümenin durması, morfolojideki değişiklikler ve değişmiş gen ifadesi ile karakterize edilen replikatif senesens durumuna girmeden önce sonlu sayıda hücre bölünmesini tamamlama kapasitesine sahip olup, bu süreçte ekstraselüler matris (ECM) ile etkileşim, hücrelerin yaşlanma ve senesens sürecine girmelerinde önemli bir rol oynamaktadır. Hücre yaşlanmasının altında yatan biyolojik süreçlerin anlaşılması, doku mühendisliği ve yaşlanmaya karşı geliştirilen tedavi yöntemleri için kritik bir öneme sahiptir. Ancak, yaşlanma sürecinde çevresel faktörlerin etkisi ve özellikle hücresel mikroçevrenin bu süreçteki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu bağlamda, yaşlı hücreleri görünüşte genç bir duruma geri döndürmek için genç dermal dokudan gelen ekstraselüler matris (ECM) ile etkileşimin senesens sürecini tersine çevirdiği öne sürülmüş ve ayrıca, yaşlı ECM'nin genç hücreler üzerindeki etkisi de ek olarak incelenmiştir. Bu çalışmada, üç boyutlu biyoyazıcı teknolojisi kullanılarak üretilmiş hücresizleştirilmiş ECM (dECM) modeli yardımıyla fibroblast hücrelerinin yaşlanma süreci incelenmiştir. Çalışmamızda, fibroblast hücrelerinin yaşlanma sürecini daha doğal bir hücresel mikroçevrede gözlemlemek amacıyla üç boyutlu kültür modeli kullanılmıştır. Bu model, hücrelerin *in vivo* benzeri bir ortamda yaşlanma mekanizmalarını daha gerçekçi bir şekilde incelemeye olanak tanımıştır. Genç ve yaşlı sıçan derisinden elde edilen dECM, yaşlı ve genç hücrelerle birlikte kullanılarak ECM'nin biyokimyasal özelliklerinin yaşlanma üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda, dECM'nin kimyasal yapısı Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) ve DNA miktarı ölçümü ile doğrulanmış, yaşlanmaya etki eden SIRT1, p53, GLB1, COL1A1, NF-κB ve MMP1 gibi genlerin ekspresyon seviyeleri, 0, 3, 7 ve 10. günlerdeki örneklerden alınan verilerle gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmanın sonuçları, dECM'nin yaşlı hücrelerin bazı genç fenotip özelliklerini geri kazanabilme kapasitesine sahip olduğunu ve ECM'nin genç özelliklerinin yaşlanmış hücrelere aktarılabilceğini göstermiştir. Bu bulgular, ECM'nin yaşlanmayı yavaşlatma veya kısmen

tersine çevirme potansiyeli üzerine yeni bir bakış açısı sunarak, hücre-mikroçevre etkileşimlerinin yaşlanma sürecine etkisini ortaya koymaktadır. Çalışmamız, ECM'nin hücre yaşlanması üzerindeki etkilerini açıklayarak, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında yaşlanma karşıtı stratejilere katkı sağlayacak veriler sunmaktadır.

Kasım 2024 , 96 sayfa.

Anahtar kelimeler: Ekstraselüler Matriks (ECM), Hücre Yaşlanması, 3B hücre kültürü, 3B Biyobaskı, Fibroblast



ABSTRACT

M.Sc. THESIS

EVALUATION OF THE EFFECTS OF EXTRACELLULAR MATRIX ON CELLULAR AGING USING A CELL CULTURE-BASED MODEL

Dilara YAŞAROĞLU

Istanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology

Supervisor : Prof. Dr. Müjgan CENGİZ

Human diploid fibroblasts have the capacity to complete a finite number of cell divisions before entering a replicative senescence state, characterized by growth arrest, morphological changes, and altered gene expression. During this process, the interaction with the extracellular matrix (ECM) plays a significant role in the onset of cellular aging and senescence. Understanding the biological processes underlying cellular aging is of critical importance for tissue engineering and therapeutic strategies aimed at combating aging. However, the impact of environmental factors and, particularly, the role of the cellular microenvironment in this process has yet to be fully elucidated. In this context, it has been suggested that the interaction with the ECM derived from young dermal tissue can reverse the senescence process and restore aged cells to a seemingly youthful state. Additionally, the effect of aged ECM on young cells has also been examined. In this study, the aging process of fibroblast cells was investigated using a decellularized ECM (dECM) model produced by three-dimensional bioprinting technology. To observe the aging process of fibroblasts in a more natural cellular microenvironment, a three-dimensional culture model was employed. This model enabled a more realistic investigation of aging mechanisms in an *in vivo*-like environment. dECM derived from both young and aged rat skin was used in conjunction with aged and young cells to investigate the impact of ECM's biochemical properties on aging. In this context, the chemical composition of dECM was verified by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and DNA quantification. The expression levels of genes involved in aging, such as SIRT1, p53, GLB1, COL1A1, NF- κ B, and MMP1, were analyzed using real-time polymerase chain reaction (qPCR) on samples taken on days 0, 3, 7, and 10. The results demonstrated that dECM has the capacity to restore some youthful phenotypic features in

aged cells and that the youthful properties of ECM can be transferred to aged cells. These findings provide a new perspective on the potential of ECM to slow down or partially reverse aging and highlight the impact of cell-microenvironment interactions on the aging process. Our study, by elucidating the effects of ECM on cellular aging, offers data that can contribute to anti-aging strategies in tissue engineering and regenerative medicine.

November 2024, 96 pages.

Keywords: Extracellular Matrix (ECM), Cellular Aging, 3D Cell Culture, 3D Bioprinting, Fibroblast



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hücre yaşlanması, biyolojik sistemlerde birçok etkenin etkileşimiyle tetiklenen ve organizmanın genel yaşlanma sürecine katkıda bulunan karmaşık bir olaydır. Bu süreç, hücresel bölünmenin durması, metabolik aktivitenin değişmesi ve fonksiyonel kayıplarla karakterizedir. Yaşlanmaya bağlı bu değişiklikler, DNA hasarı, telomer kısalması, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon gibi çeşitli biyokimyasal olaylarla ilişkilidir. Bu tetikleyici faktörler, hücrelerin genetik ve yapısal bütünlüklerini koruma kapasitesini sınırlandırarak, organ ve doku düzeyinde fonksiyon kayıplarına yol açar (López-Otín ve ark., 2013). Ekstraselüler matriks (ECM), hücrelerin çevresini oluşturan ve hücresel işlevlerin düzenlenmesinde kilit rol oynayan kompleks bir protein ve polisakkarit ağıdır. ECM, yalnızca hücrelere yapısal destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre-matriks etkileşimleri aracılığıyla hücresel davranışları yönlendirerek yaşlanma sürecine de müdahil olur (Hynes, 2009; Frantz ve ark., 2010).

ECM'nin yaşlanma üzerindeki etkisi özellikle dikkat çekicidir, çünkü hücrelerin bulundukları mikroçevreyi algılama ve çevresel sinyallere yanıt verme yetenekleri ECM tarafından belirlenir. ECM, hücre membranındaki reseptörler aracılığıyla hücresel sinyal yollarını etkileyerek, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptozis gibi temel biyolojik süreçlerde kritik bir rol oynar (Bonnans ve ark., 2014). ECM'nin yaşlanma sürecindeki etkilerini anlamak, hem yaşlanma mekanizmalarına dair daha derin bir kavrayış sağlar hem de yaşlanmaya bağlı hastalıkların tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak tanır. Choi ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, genç ECM'nin, iki boyutlu kültür ortamında yaşlanmış insan diploid fibroblastlarının proliferatif kapasitelerini yeniden kazanmalarına yardımcı olduğu bulunmuştur. Ayrıca, genç ECM'nin sağladığı mikroçevrede, yaşlanmış hücrelerde mitokondriyal fonksiyonun iyileştiği ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışma, ECM'nin yaşlanma üzerindeki etkisini yalnızca iki boyutlu bir modelde incelemiştir. Üç boyutlu (3B) hücre kültürü modelleri, hücrelerin doğal biyokimyasal ve biyofiziksel ortamlarına daha yakın davranmasını sağladığından, ECM'nin yaşlanma sürecine olan etkisini daha gerçekçi bir şekilde araştırmak için ideal bir sistem sunar.

Çalışmamızın amacı, biyoyazıcı teknolojisi ile elde edilen hücresizleştirilmiş ECM (dECM) jeli kullanarak oluşturulan 3B hücre kültürü modelinde ECM'nin hücre yaşlanması üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Hücresizleştirilmiş ECM, hücresel bileşenlerden arındırılmış doğal bir biyolojik iskele sağladığından, hücrelerin *in vivo* benzeri bir ortamda gelişimlerini sürdürmesine olanak tanır. ECM'nin bu modelde hücre yaşlanması üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla, yaşlanma süreciyle yakından ilişkili olduğu bilinen gen ekspresyon düzeyleri analiz edilecektir. Çalışmamızda ele alınacak genler; hücresel stres yanıtları ve yaşam süresinin düzenlenmesinde rol oynayan SIRT1, apoptozis ve yaşlanmada etkili p53, inflamatuvar yanıtları düzenleyen NF-kB, ECM'nin yeniden şekillenmesinde kritik bir rol oynayan MMP1, yaşlanmış hücrelerin belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılan GLB1 ve ECM'nin ana yapısal proteinlerinden biri olan COL1A1'dir (Baker & Petersen, 2018). SIRT1, p53'ü baskılayarak hücresel yaşlanmayı geciktirir ve hücrelerin yaşam süresini uzatır. p53, hücre döngüsü kontrolünde rol alarak yaşlanmayı hızlandırırken, NF-kB inflamatuvar yanıtları düzenleyerek MMP1'in aktivitesini artırır. MMP1, ECM proteinlerinin parçalanmasına yol açarak mikroçevreyi yeniden şekillendirir; bu esnada COL1A1, ECM'nin yapısal bütünlüğünü korur ve hücreye destek sağlar. GLB1 ise yaşlanmış hücrelerde beta-galaktosidaz aktivitesi ile ECM'deki yaşlanma belirtilerini işaret eden önemli bir biyobelirteçtir (Gialeli ve ark., 2011). Bu genlerin etkileşimi, ECM'nin hücre yaşlanması üzerindeki etkilerini daha kapsamlı bir şekilde anlamamıza olanak tanır.

Üç boyutlu kültür ortamında elde edilen ECM, hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini daha iyi yansıtmakta ve hücrelerin *in vivo* özelliklerine daha yakın davranmalarına olanak tanımaktadır. Üç boyutlu hücre kültürü modelleri, hücrelerin ECM ile üç boyutlu etkileşimini sağlayarak, hücrelerin yaşam döngüsünde karşılaştığı biyokimyasal ve biyomekanik sinyalleri daha doğal bir şekilde algılamalarına olanak tanır. Hücresizleştirilmiş ECM'nin kimyasal yapısı ve biyolojik işlevlerinin FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) ile doğrulanarak yaşlanma süreçleri üzerindeki etkileri daha doğru bir şekilde anlaşılacaktır. ECM'nin yaşlanmış hücrelerin gençlik özelliklerini yeniden kazanmalarını sağlama potansiyeli, özellikle rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi alanlarda yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Örneğin, yaşlanmış fibroblast hücreleri genç ECM ile etkileşime girdiklerinde proliferatif kapasitelerini yeniden kazanabilir ve ROS seviyelerinde azalma gözlemlenebilir (Choi ve ark., 2011). Böylece, ECM'nin hücre yaşlanması üzerindeki etkisini anlamak, yaşlanma sürecinin geri döndürülmesi veya yavaşlatılması için

yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olabilir (Conboy ve ark., 2005; Bonnans ve ark., 2014). Bu çalışma ile ECM'nin biyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin hücre yaşlanması üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak hedeflenmektedir. ECM'nin yaşlanma sürecine olan etkilerini, üç boyutlu bir kültür ortamında dECM kullanarak incelemek, hücre yaşlanmasının daha gerçekçi bir modelle anlaşılmasına katkıda bulunabildiği düşünülmektedir. Bu bağlamda, ECM'nin hücre yaşlanması üzerindeki potansiyel etkilerinin daha iyi anlaşılması, yaşlanma karşıtı uygulamalar için yeni yaklaşımlar geliştirilmesi ve doku mühendisliği alanında yenilikçi çözümler sunulması açısından önem taşımaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Yaşlanması (Senesens)

Yaşlanma, moleküller, hücreler, organlar ve organizmalar üzerinde zamanla ortaya çıkan bozulma sürecidir ve bu süreç ölüme karşı duyarlılığın artmasına neden olur. Organizmanın yaşlanması, bir dizi faktörün etkileşimiyle oluşan fiziksel ve moleküler işlev bozuklukları ile karakterizedir. Yaşlanma, doku hasarı ve organ işlev kaybına yol açar. Yaşlanma terimi genellikle bir organizmayı tanımlamak için kullanılsa da, hücresel düzeyde de geçerlidir. Hücresel yaşlanma, hücrelerin çeşitli içsel (endojen) ve dışsal (eksojen) streslere karşı gösterdiği biyolojik yanıtların bir sonucudur. DNA hasarı, telomer kısalması ve diğer hücresel faktörler, bu stresler arasında yer alır ve hücrelerin işlevlerini ve bütünlüklerini zamanla azaltabilir (Di Micco ve ark., 2021).

Yaşlanmış hücreler, kalıcı proliferasyon durması ve belirli morfolojik değişikliklerle tanınır. Bu değişiklikler arasında hücre yüzeyinin düzleşmesi, vakuolizasyon, sitoplazmada granüller ve anormal organeller yer alabilir. Bu morfolojik özellikler, hücrelerin yaşlanma sürecinin karakteristik işaretleridir. Hücresel yaşlanma ilk kez 1961'de Hayflick ve Moorhead tarafından tanımlanmış, insan somatik hücrelerinin (diploid fibroblastların) ardışık kültürlerde proliferasyonunun durması üzerine yapılan çalışmalarda, bu sürecin biyolojik mekanizmaları anlaşılmaya başlanmıştır (Hayflick ve Moorhead, 1961). DNA replikasyonu sırasında telomerlerin kısalması, hücrelerin bölünmesinin durmasına neden olur ve bu durum "replikatif yaşlanma" olarak bilinir. Replikatif yaşlanma, yaşlanmanın tanımlanmış ilk şeklidir, ancak daha sonra yapılan çalışmalar, hücresel yaşlanmanın embriyonik gelişim sırasında da görüldüğünü ve çeşitli içsel streslerin (DNA hasarı, telomer kısalması, organel hasarı vb.) bu süreci tetiklediğini göstermiştir (Herranz ve Gil, 2016).

Hücresel yaşlanmayı tetikleyen çeşitli stres faktörleri vardır. Bunların başında nükleer DNA hasarı yer alır ve genellikle DNA çift sarmal kırıkları (DSB) şeklinde meydana gelir. DNA hasarı yanıtı (DDR) yoluyla bu hasar onarılmaya çalışılır ve hücre döngüsü durdurulur. Bu süreç, bozulmuş genetik bilgilerin yayılmasını engellemeyi amaçlar. DDR faktörleri, hasarlı DNA bölgelerinde birikerek, histon H2AX'in fosforilasyonu, MDC1 ve 53BP1

proteinlerinin etkileşimi gibi genişletilmiş kromatin modifikasyonları oluşturur (Jackson ve Bartek, 2009). Eğer DNA hasarı onarılamazsa, kalıcı DDR sinyali ile hücresel yaşlanma süreci başlar. Yaşlanmış hücrelerde bu kalıcı DDR odakları, tamir edilememiş DSB'leri içerebilir ve hücresel yaşlanma ile uzun süreli kontrol noktası aktivasyonu arasında benzerlikler olduğu gösterilmiştir (Galbiati ve ark., 2017). DDR sinyal yolunun inhibe edilmesi, yaşlanmış hücrelerin yeniden proliferasyon yapmasına olanak sağlar (Mallette ve Ferbeyre, 2007).

DDR kaskadının bir parçası olarak, ATM ve ATR'nin hedefi olan tümör baskılayıcı p53 aktive edilir. Bu, yaşlanma ile ilişkili hücre döngüsü durmasını başlatan önemli bir faktördür ve p21'in ekspresyonunu uyarır. Ayrıca, p16 ve CDK4/6'nın inhibitörleri de yaşlanma süreçlerinde rol oynar; p21 erken aşamada aktive olurken, p16 daha sonra etkinleşir (Beausejour ve ark., 2003). Ayrıca, tümör baskılayıcı ARF, p53'ü stabilize ederek yaşlanma sürecini destekler. Onkogenik strese yanıt olarak p53'e bağlı yaşlanma oluşumu, özellikle DDR ve ARF yollarının etkileşimi ile bağlantılıdır (Kamijo ve ark., 1997).

Yaşlanmış hücrelerin fenotipi genellikle geri dönüşümsüz kabul edilse de bazı araştırmalar doku mikroçevresinin hücresel kaderi değiştirme ve yaşlanmış kök hücrelerin bazı özelliklerini yenileme potansiyeline sahip olduğunu öne sürmüştür (Conboy ve ark., 2005).

2.1.1. Telomer Kısaldması

Hücresel yaşlanmanın en iyi bilinen ve tanımlanmış tetikleyici mekanizmalarından biri telomer kısaldmasıdır. Kromozomal DNA uçlarının, standart DNA replikasyon mekanizmalarıyla tam olarak kopyalanamaması nedeniyle, telomer bakım mekanizmaları eksik olduğunda (örneğin, telomeraz ekspresyonu ya da telomerler arası rekombinasyon gibi mekanizmalar), her replikasyon döngüsünde telomerler kısalır. Telomerler, belirli bir uzunluğun altına düştüğünde, koruyucu yapıların kaybı ve telomer sınırlama faktörlerinin ortadan kalkması, kritik derecede kısa telomerlerin çift sarmallı kırıklara (DSB) benzemesine yol açar. Bu durum, DNA hasar yanıtı (DDR) mekanizmasını tetikler ve bu süreç, telomerik DSB'lerin tetiklediği DDR'ye benzer bir reaksiyon oluşturur (Fagagna ve ark., 2003). Telomerin bir veya birkaç DDR sinyali, replikatif hücresel yaşlanmayı başlatmak için yeterli olabilir ve telomerazın zorla ekspresyonu, hücresel yaşlanmayı engeller ve sınırsız hücre çoğalmasını destekler (Hemann ve ark., 2001; Bodnar ve ark., 1998).

Kalıcı DDR aktivasyonu, kritik derecede kısalmamış telomerlerde, eksojen genotoksik tedavilere maruz kalan bölünmeyen hücrelerde ve yaşlanan bölünmeyen hücrelerde de meydana gelir. Telomerlerin hasar gördüğünde, DSB onarımı çok daha verimsiz hale gelir ve bu durum hücresel yaşlanmanın sürdürücü bir faktörü olur (Fumagalli ve ark., 2012; Bae ve Baumann, 2007). Telomerik DSB'lerin devam etmesi, hücresel yaşlanmanın devam etmesine ve korunmasına yol açar. Dolayısıyla, telomerlerdeki kalıcı DDR aktivasyonu, telomer uzunluğundan bağımsız olarak hem çoğalan hücrelerdeki telomer kısalmasından hem de çoğalmayan hücrelerdeki telomerik DNA hasarından kaynaklanabilir (Rossiello ve ark., 2017).

2.1.2. Mitokondriyal Disfonksiyon

Yaşlanan hücrelerde, mitokondriyal işlev bozukluğu ile ilişkili olarak oksidatif stresin arttığı gözlemlenir. Bu hücrelerde, mitokondriyal kütle, membran potansiyeli ve mitokondriyal morfolojide belirgin değişiklikler meydana gelir (Chapman ve ark., 2019). İşlevini yitiren mitokondrilerin birikimi, mitokondriyal sirtuinlerin azalması ve mitokondriyal fonksiyonun selektif kimyasal inhibisyonu ile bağlantılıdır ve bu durum yaşlanmanın başlatılmasında önemli bir rol oynar (Wiley ve ark., 2016).

Nükleer DNA hasarı ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu arasında karşılıklı bir etkileşim olduğu yönünde bulgular mevcuttur (Correia-Melo ve ark., 2016). Özellikle, mitokondriyal disfonksiyonla ilişkili yaşlanma (MiDAS), yaşlı hayvanlarda gözlemlenen metabolik değişiklikler ve anormal adiposit farklılaşması gibi özelliklerle bağlantılı olup, benzersiz bir hücre-otonom olmayan program sergileyebilir (Wiley ve ark., 2016).

2.1.3. Morfolojik değişiklikler

Replikatif yaşlanma ile ilişkili olarak hücrelerde belirgin morfolojik değişiklikler gözlemlenir. Bu değişiklikler, hücrelerin büyümesi ve düzleşmesi, iğsi şeklin azalması, sitoplazmada granül oluşumu, vakuoller ve mikrofilyamentlerin artışı, çekirdek ile lizozomların büyümesi ve hücre zarında belirsizlik gibi özellikleri içerir. Bu morfolojik değişiklikler, hücrelerin yaşlanma sürecine dair belirgin işaretler olup, replikatif yaşlanmanın ilerlemesiyle daha da belirginleşebilir (Bruder ve ark., 1997; Kuilman ve ark., 2010).

2.1.4. Replikatif Yaşlanma

Yaşlanan hücrelerin birçok farklı dokuda yaşla birlikte arttığı ve birikmeye başladığı gözlemlenmiştir (Hudgins ve ark., 2018). Hayflick ve Moorhead'in erken dönem

çalışmalarında, diploid hücrelerin sınırlı replikatif kapasiteye sahip oldukları ve her bölünme döngüsünde senesense girdikleri ortaya konmuştur. Bu durum, fibroblastlar ve diğer embriyonik hücre serileriyle de doğrulanmıştır (Hayflick ve Moorhead, 1961). Sonraki araştırmalar, hücre senesensinin yaşlanmanın temel bir özelliği olduğunu göstermiştir (Lopez-Otin ve ark., 2013). Hücre senesensinin yaşlanmanın temel bir özelliği olduğunu göstermiştir (Lopez-Otin ve ark., 2013). Hücre senesensinin yaşlanmanın temel bir özelliği olduğunu göstermiştir (Lopez-Otin ve ark., 2013). Hücre senesensinin yaşlanmanın temel bir özelliği olduğunu göstermiştir (Lopez-Otin ve ark., 2013). Hücre senesensinin yaşlanmanın temel bir özelliği olduğunu göstermiştir (Lopez-Otin ve ark., 2013).

Yaşlanma, telomer kısalması, mitojenik sinyaller, genotoksik stres ve diğer faktörlere bağlı olarak çeşitli içsel ve dışsal uyarılara yanıt olarak gerçekleşebilir (Mikula-Pietrasik ve ark., 2020; Kuilman ve ark., 2008). Replikatif yaşlanma, hücrelerin bölünme yeteneklerinin kayb olduğu ve fonksiyonlarında değişiklikler olduğu bir süreçtir. Bu durum, telomerlerin giderek kısalmasıyla doğrudan ilişkilidir (Campisi ve ark., 1996). Replikatif yaşlanma sırasında hücreler, genellikle G1 fazında büyüme duraksaması gösterir, büyüme sinyallerine yanıt veremez ve S fazına geçemezler. Yaşlanmış hücreler metabolik olarak aktif kalsa da bazı genler büyüme sinyalleriyle uyarılabilir, ancak büyüme düzenleyicilerinin ifadesi değişir. Ayrıca, fonksiyonel değişiklikler geçirerek terminel diferansiye hücrelere benzer özellikler gösterirler ve apoptoza karşı direnç kazanarak daha stabil hale gelirler (Campisi ve ark., 1996).

2.1.4.1. Hücre Hatlarında Replikatif Yaşlanma

Replikatif yaşlanma süreci, hücre hatlarında pasaj sayısının artmasıyla birlikte belirgin değişikliklerin ortaya çıkmasına yol açar. Bu süreçte hücrelerin ilk pasajdaki fonksiyonel özelliklerinde bozulmalar meydana gelebilir ve hücrelerin genomik DNA'sı ile moleküler düzeyde mutasyonlar oluşabilir. Bu mutasyonlar, hücrelerin işlevselliğini etkileyebilir ve özellikle belirli genlerin ekspresyonu ya da protein yapılarını değiştirebilir. Bu değişiklikler, hücre hatlarının nasıl evrildiğini ve adaptasyon yeteneklerini geliştirdiğini anlamamıza yardımcı olabilir (Yu ve ark., 1997).

Hücreler pasajlandıkça, fizyolojik özelliklerinde, morfolojisinde, gen ekspresyon seviyelerinde ve metabolik aktivitelerinde de değişiklikler gözlemlenebilir. Bu değişiklikler, hücrelerin kültür ortamında geçirdikleri süre ile çoğalma sayısının bir sonucu olarak ortaya

çıkar. Hücrelerin büyüklüğü, şekli ve yapıları değişebilirken, gen ekspresyonu ve metabolik aktiviteleri de adaptasyon süreçlerine bağlı olarak farklılık gösterebilir. Bu süreçler, hücre hatlarının kültür ortamında nasıl evrildiğini ve yaşlanma sürecindeki dinamiklerini daha iyi anlamamıza olanak tanır (Briske-Anderson ve ark., 1997).

Kim ve arkadaşlarının yaptığı araştırmaya göre, insan deri fibroblast (HDF) hücrelerinde pasaj sayısının artmasıyla hücre döngüsünün süresi belirgin bir şekilde uzar. Araştırmalarında, P40'tan P90'a kadar olan dönemde hücre döngüsünün süresinin iki katına çıktığını ve bu eğilimin diğer pasajlarda da devam ettiğini gözlemlemişlerdir. Bu gözlemler, yaşlanan hücrelerde hücre döngüsünün süreklilik gösteren uzama eğilimini doğrulamaktadır (Kim ve ark., 2013). Bu bulgular, hücrelerin kültür ortamında nasıl evrildiğini ve adaptasyon süreçlerini anlamamıza yardımcı olabilir. Hücrelerin uzun süre kültür ortamında tutulması ve sürekli pasajlanması, genetik ve epigenetik düzeylerde farklı değişikliklere yol açabilir.

2.1.5. Senesens ile İlişkili β -Galaktosidaz Aktivitesi

Senesens ilişkili β -Galaktosidaz (SA- β -Gal), yaşlanmanın tespiti için yaygın bir biyomarker olarak kullanılmaktadır. Bu enzim, lizozomal bir hidrolaz olup, genellikle pH 4'te en yüksek aktivitesini gösterirken, yaşlanan hücrelerde pH 6 civarında optimum aktiviteye ulaşır (Dimri ve ark., 1995). SA- β -Gal aktivitesi, yalnızca senesens sürecine giren hücrelerde artış gösterir ve bu nedenle bu aktiviteye SA- β -Gal adı verilmiştir. Yaşlanan hücrelerde SA- β -Gal aktivitesindeki artışın, lizozomal içerik ve aktivitenin artışıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Lee ve ark., 2006).

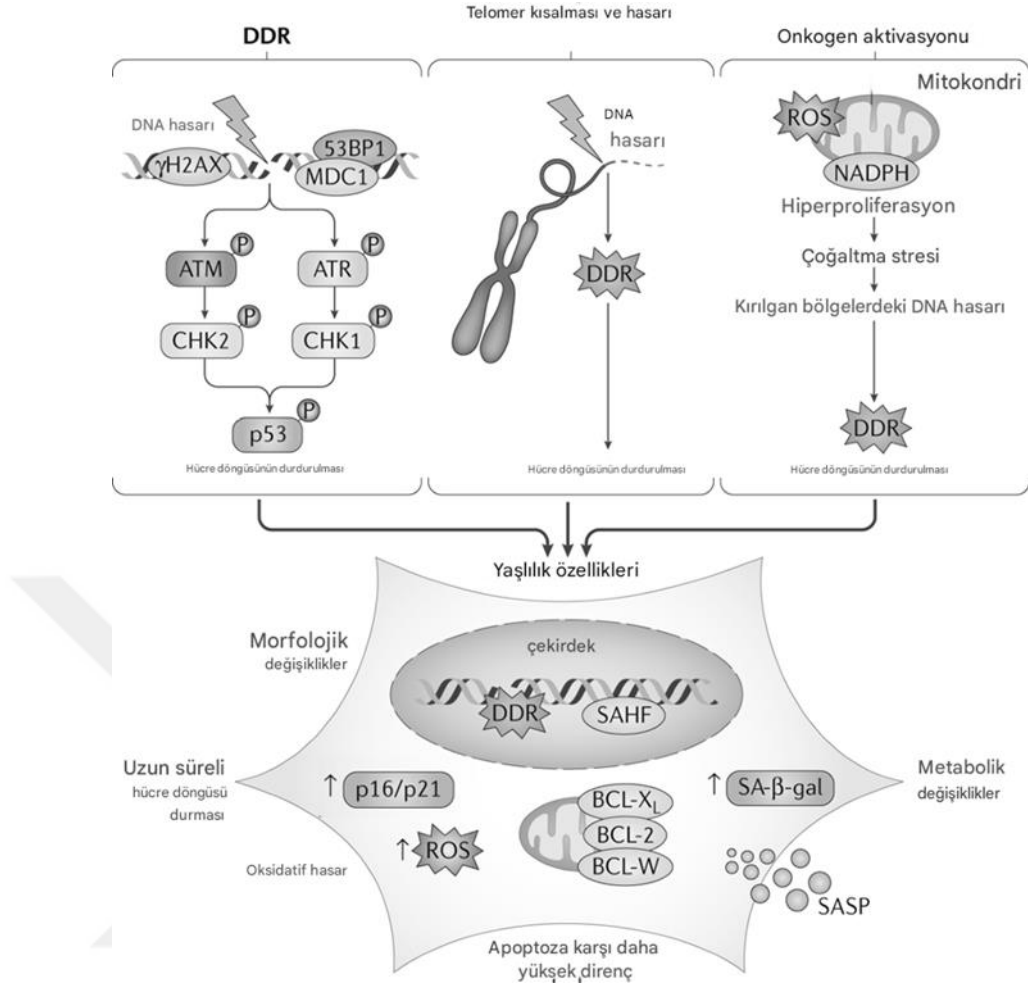
2.1.6. Yaşlanan Hücrelerden Salınan Faktörler

Replikatif ya da erken yaşlanan hücrelerde, "Senesens ile İlişkili Sekretuar Fenotip" (SASP) adı verilen sekretomda belirgin değişiklikler gözlemlenir. Bu, diğer bir deyişle "senesens mesajlaşma sekretomu" (SMS), hücreler arasındaki iletişimi yönlendiren karmaşık bir pro-inflamatuar yanıt sergiler. SASP, proinflamatuar sitokinler (IL- α , IL-1 β , IL-6, IL-8), büyüme faktörleri (VEGF, HGF, TGF β , GM-CSF), TNF- α , kemokinler (CXCL-1, -3, -10) ve matriks metalloproteinazlarını (MMP'ler) içerir. Bu sekretuar profil, yaşlanan hücrelerin çevresindeki dokuları etkileyerek, yaşlanma sürecinin çevresel etkilerini şekillendirir (Loaiza ve Demaria, 2016). SASP, temel olarak NF- κ B ve CCAAT/enhancer-binding protein- β (C/EBP β) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile düzenlenir. Bu faktörler, yaşlanan

hücrelerde inflamatuvar SASP faktörlerinin, örneğin IL-6 ve IL-8'in transkripsiyonunu doğrudan kontrol eder (Herranz ve Gil, 2018).

SASP yanıtı, p16INK4a ve p21WAF1/CIP1 tarafından tetiklenerek NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açar. Bu, pro-inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin hücreler tarafından salgılanmasına neden olur (Takahashi ve ark., 2006). Bu inflamatuvar yanıt, hücresel yaşlanma sürecine aracılık eder ve inflamasyonun yayılmasına katkıda bulunur (Barnes, 2015). SASP'nin işlevi, yaşlanan hücrelerin çevresindeki sağlıklı hücrelere riskli durumlarını ileterek, hasarlı veya tümörojenik hücrelerin temizlenmesini teşvik etmek olabilir. Bileşenler, otokrin yolla hücrelerin kendi yaşlanma süreçlerini hızlandırabilir veya parakrin şekilde çevresindeki hücrelerde benzer bir fenotipi tetikleyebilir (Şekil 2.1.) (Chandler ve Peters, 2013).

Yaşlanan hücrelerden kaynaklanan SASP salınımı, inflamasyon yoluyla normal doku yapısını ve işlevini bozarak, ileri yaşlarda kanserin yeniden ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu hücrelerin geçici varlığı, tümör baskılayıcı büyüme duraklamasına yardımcı olup, hasarlı dokuların onarımını düzenleyebilir. Ancak, uzun süreli varlıkları normal doku yapısını bozabilir ve lokal inflamasyon gibi zararlı etkiler yaratabilir (Campisi, 2013).



Şekil 2.1. Hücre Yaşlanmasının Moleküler Mekanizması (Di Micco ve ark., 2020)

2.2. Hücrelerin Mikroçevresi

Hücrelerin farklılaşma, göç, çoğalma ve apoptoz gibi birçok önemli özelliği, dışarıdan aldıkları sinyallere göre gen ifade profillerinde yapılan düzenlemeler sonucunda ortaya çıkar. Bu süreçte hücrelerin bulundukları mikroçevre ile etkileşimleri, hücrelerin kaderinin belirlenmesinde kritik bir rol oynar. Mikroçevre, hücre dışı matriks (ECM) yapısı, büyüme faktörleri ve diğer hücreler tarafından oluşturulur ve bu unsurlar, dokuya özgü mekanik özellikler kazandırmanın yanı sıra hücrelerin çevresiyle sürekli iletişim halinde olmasını sağlar.

Bu etkileşimler, dokuların türüne ve fonksiyonlarına göre farklılık gösterir. Bağ dokusunda hücre ve hücre dışı matriks ilişkisi daha belirgindir ve mekanik stres bu ilişkilerde önemli bir rol oynar. Epitelyal dokuda ise hücreler arası ilişkilerin daha baskın olduğu gözlenir. Hücreler arası etkileşimler, dokuların ve hücrelerin organizasyonunda önemli bir

yere sahiptir. Özellikle embriyonik dönemde, hücrelerin aynı dokuya ait diğer hücrelerle adezyonu, bu etkileşimlerin seçici olduğunu gösterir (Gilbert ve Miles, 2000).

Epitel hücreleri, aralarındaki sıkı bağlantı (tight junctions) bölgeleri sayesinde dokuların farklı bölümleri arasında bariyer oluşturur ve seçici geçirgenlik sağlar. Hücreler arasındaki oluklu bağlantılar (gap junctions) ise hücreler arasında küçük moleküllerin alışverişini sağlar. ECM, hücre membranında bulunan reseptörlerle doğrudan etkileşime girerek veya büyüme faktörleri aracılığıyla hücrelerin fonksiyonlarını ve metabolizmalarını düzenler.

2.2.1. Hücre Dışı Matriks (ECM)

Hücre dışı matriks (HDM), hücreler tarafından salgılanan çeşitli proteinler ve karbonhidratlardan oluşan karmaşık bir yapıdır (Şekil 2.2.). Dokulara sağladığı mekanik desteğin yanı sıra hücrelerin fonksiyonları üzerinde de önemli bir rol oynar. En temel özelliklerinden biri, hücrelerin tutunabileceği bir ortam sağlamaktır. Epitel hücrelerinde matriks ile bağlantıların kaybolması, anoikis olarak adlandırılan bir çeşit programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ile sonuçlanır. Benzer şekilde, pankreatik adacık hücreleri gibi birçok hücre tipinde tutunma ve hayatta kalma arasında doğrudan bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Hammar ve ark., 2004).

HDM, enzimatik ve enzimatik olmayan süreçlerle sürekli olarak yenilenir. İçeriğindeki proteinlerin çeşitliliği ve oranları, dokuların özelliklerine ve fonksiyonlarına göre farklılık gösterir. Örneğin, matriks bileşenleri dış ve kemiklerde sert bir yapı oluştururken korneada şeffaf ve ince bir yapı meydana getirir (Alberts ve ark., 2007). HDM'nin bu bileşimsel farklılıkları, dokulara özgü fiziksel, biyokimyasal ve biyomekanik özelliklerin ortaya çıkmasını sağlar. Sert ve gözenekli bir HDM yapısı, hücrelerin yapışması, hücre bölünmesi, doku polaritesi ve hücre göçü gibi süreçleri etkiler (Gattazzo ve ark., 2014).

HDM, temel olarak proteoglikanlar ve fibröz proteinlerden oluşur. Dokular arasındaki boşluğun büyük kısmı proteoglikanlar tarafından doldurulur. Proteoglikanlar, yapısal destek sağlama, hidrasyon, proteinler arasında köprü benzeri yapılar oluşturma ve mekanik dirençlilik gibi fonksiyonlar üstlenir. Fibröz proteinler ise genellikle kollajen, fibronektin ve lamininden oluşur (Frantz ve ark., 2010).

HDM, hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak veya çeşitli büyüme faktörleri aracılığıyla hücre davranışını etkiler. Hücre-HDM etkileşimleri, kadherinler ve

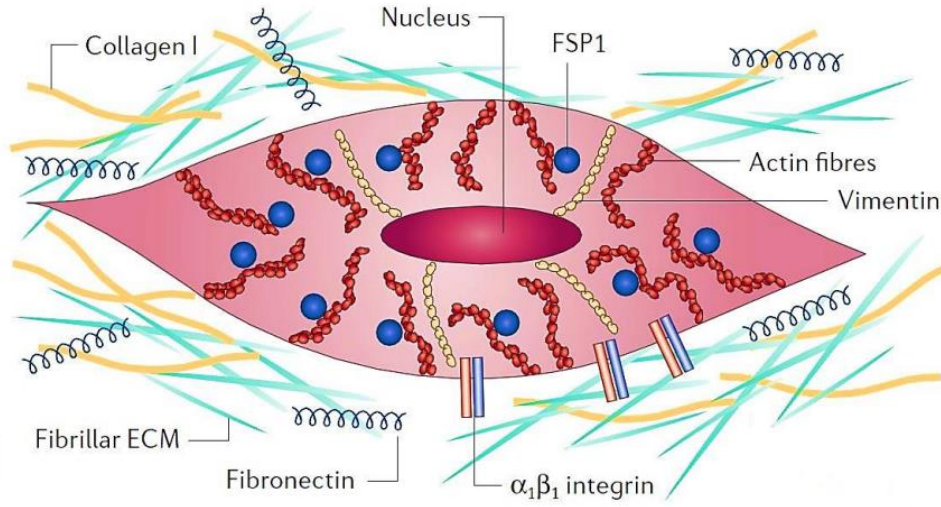
integrinler aracılığıyla gerçekleşir. İntegrinler, hücre iskeleti ile HDM arasında köprü görevi gören transmembran proteinlerdir. Heterodimer yapıda olan integrinler, α ve β alt ünitelerinden oluşur ve 18 farklı α ile 8 farklı β alt ünitesinin kombinasyonu ile 20'den fazla integrin çeşidi tanımlanmıştır (Hynes, 2002). Bazı integrinler yalnızca tek bir protein ile etkileşimde bulunurken çoğu birden fazla HDM proteinini tanıır. İntegrinler genellikle kısa peptit motifleri aracılığıyla bağlanır ve bu süreçte her iki alt birim de görev alır. Arjinin-glisin-aspartat (RGD) dizisi, birçok integrin tarafından tanınır ve bağlanmada kritik bir motif sağlar (Tablo 2.1.) (Jokinen ve ark., 2004).

Tablo 2.1. İntegrinlerle Etkileşen Matriks Proteinleri

Kollajen tip-1	$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$
Kollajen tip-4	$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$
Fibronektin	$\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha IIb\beta 3$
Laminin	$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$

Dokularda bulunan hücre dışı matriks (HDM) yapısı, iki ana türden oluşur: bazal lamina ve interstisyel matriks. Bazal lamina, epitel ve endotel hücreleri arasında bir bariyer işlevi görerek dokuların bütünlüğünü sağlar ve örneğin böbrek glomerülünde seçici bir filtrasyon yapar. Bu yapıda kollajen tip-4, laminin, entaktin ve heparan sülfat gibi proteoglikanlar yer alır.

İnterstisyel matriks ise bağ dokusunun hücreler arası boşluklarını doldurarak dokunun mekanik desteğini sağlar. Kollajen tip-1, tip-3, fibronektin, tenaskin ve çeşitli proteoglikanlar gibi bileşenler içerir (Karsdal ve ark., 2015). Ayrıca bu yapı, dokunun hidrasyonunu ve hücreler arasındaki etkileşimi düzenleyen sitokinler ve büyüme faktörleri ile bağlantılıdır. Matriks içindeki proteinler arasında çapraz bağlar oluşturarak dokunun bütünlüğünü ve işlevselliğini korur.



Şekil 2.2. Fibroblast hücresinin ECM bileşenlerini salgılama modeli (Kalluri ve ark., 2006).

2.2.1.1. Kolajen

Kolajen, vücutta en bol bulunan proteinlerden biri olup, bağ dokularında, özellikle tendonlar ve deri gibi yapılar içinde yoğun şekilde bulunur (Tanzer, 2006; Kim ve ark., 2011). Bu yapısal protein, sadece dokulara gerilme mukavemeti sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre yapışması, göçü gibi birçok hücresel süreçte de önemli rol oynar (Rozario ve DeSimone, 2010). Yaklaşık 30 farklı kolajen türü tanımlanmış olup, bazıları hücre dışı matrikste izole edilebilir (Heino, 2007).

Kolajen, dokuların gerekli yapısal bütünlüğünü sağlamak amacıyla fibril yapısında düzenlenir. Özellikle tip I, II, III, V ve XI kolajen türleri, fibril oluşumunda kritik bir rol oynar. Bu fibril düzenlemesi, bağ dokularının mekanik streslere karşı dayanıklı olmasını sağlayarak, gerilme, kayma ve basınç gibi faktörlere karşı mukavemet kazandırır (Badylak ve ark., 2009). Kolajen fibril oluşumunu düzenleyen ekstraselüler matriks molekülleri arasında dekorin ve fibromodulin gibi moleküller bulunur. Ayrıca bu süreçte, hücre yüzeyinde bulunan integrinler de önemli bir rol oynar. Integrinler, alfa (α) ve beta (β) alt birimlerinden oluşan heterodimerler şeklinde bir araya gelir. Kolajenle etkileşen dört ana integrin türü bilinmektedir; bunlardan $\alpha1\beta1$ ve $\alpha2\beta1$ en yaygın olanlarıdır. Bu reseptörler, kolajen üretimini negatif geri besleme yoluyla düzenler ve kolajen matris sentezini ve remodelasyonunu artırır (White ve ark., 2004).

Tip I kolajen, neredeyse tüm dokularda yaygın olarak bulunan baskın formdur, özellikle tendonlar ve deri gibi yapılarla ilişkilidir. Diğer kolajen türleri ise belirli dokularda özel olarak bulunur; örneğin, tip II kolajen kıkırdakta ve korneada bulunurken, tip III kolajen kan damarlarının duvarlarında önemli bir bileşendir. Kolajen üretimi yalnızca fibroblastlar tarafından değil, aynı zamanda endotel ve epitel hücreleri tarafından da gerçekleştirilir (Bosman ve Stamenkovic, 2003).

2.2.1.2.Fibronektin

Fibronektin, kolajene oranla daha az incelenmiş olmakla birlikte, ECM'nin bazal membranı (BM) içinde önemli bir rol üstlenir. Hücre yapışmasında ve yara iyileşme süreçlerinde kritik bir işlevi olduğu tespit edilmiştir (Tanzer, 2006). Farelerde fibronektin eksikliğinin ölümcül olduğu gözlemlenmiş ve bu durum, fibronektinin embriyonik gelişim gibi *in vivo* süreçlerdeki kritik önemini ortaya koymuştur (Mao ve Schwarzbauer, 2005). Fibronektin, iki formda bulunur: biri kan plazmasında dolaşan ve yaralanma bölgelerine taşınan, diğeri ise fibroblastlar tarafından üretilen hücresel bir formdur (Eckes ve ark., 2010).

Fibronektin, kollajene benzer şekilde bir fibril ağı şeklinde düzenlenir ve hücre yüzeyindeki integrinlere bağlanır. Çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen bu protein, bağ dokularıyla sınırlı değildir. Fibronektin, disülfür bağları ile bağlanabilen dimer formunda üretilir ve her bir alt birim, tip I, II ve III olmak üzere üç türe ayrılır (Mao ve Schwarzbauer, 2005).

Fibronektinin hücrelerle etkileşimini sağlayan ana reseptör, integrin $\alpha 5 \beta 1$ olup, bu etkileşim, fibronektinin RGD bölgesi (Arg-Gly-Asp tripeptit dizisi) ile gerçekleşir (Fogerty ve ark., 1990). Fibronektin matrisi, integrin aktivasyonu aracılığıyla hücrelerin aktin iskeletiyle bağlantı kurar. Bu etkileşim, başarılı matris oluşumu için kritik öneme sahiptir ve hücrelerin immünofloresan boyama yöntemleriyle izlenebilir (Wu ve ark., 1995). Fibronektin fibrilleri, oluşumlarına bağlı olarak 10 ila 1000 nm arasında değişen kalınlıklara sahip olabilir (Chen ve ark., 1978).

2.2.1.3.Laminin

Lamininler, trimerik yapıya sahip glikoproteinlerdir (Aumailley ve ark., 2005). Farklı α , β ve γ zincirlerinden oluşan lamininler, evrimsel süreçte, ilk başta basit bir laminin heterotrimerinden, omurgalılarda ise 16 farklı trimerik izoforma kadar çeşitlenmiştir

(Yurchenco, 2011). Lamininler ilk olarak fare Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarkomunun (Matrigel) ekstraselüler matriksinde bir bileşen olarak tanımlanmıştır.

Bu proteinler, kas ve epitel hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli doku türlerinde ifade edilir ve hücre yapışması, diferansiyasyonu ve göç gibi hücresel süreçlerde önemli bir rol oynar. Integrinler aracılığıyla hücreler ile alttaki matriks arasında iletişim kurarak bu süreçlerde aracılık yaparlar (Eckes ve ark., 2010). Embriyonal gelişim sırasında ortaya çıkan ilk ECM proteinleri arasında yer alan lamininler, genetik kusurlar sonucu embriyonik ölüm veya çoklu organları etkileyen ciddi hastalıklara yol açabilir. Bu özellikleri, lamininlerin sinir ve damarlar gibi farklı dokularda önemli fonksiyonlar üstlendiklerini göstermektedir (Domogatskaya ve ark., 2012).

2.2.2. Yaşlanma Sürecinde Ekstraselüler Matriks Değişiklikleri

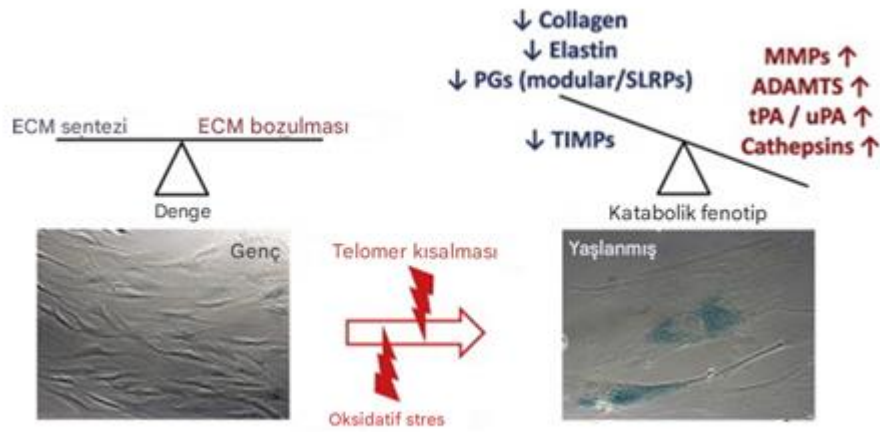
Yaşlanma süreciyle birlikte, birçok dokunun altındaki bazal membranın (BM) bozulduğu gözlemlenmiştir. Bu bozulma, daha az BM proteini sentezi ve artan MMP (matriks metaloproteinaz) seviyeleri ile ilişkilidir; bu durum, protein parçalanmasını artırır (Frantz ve ark., 2010). Yaşlanmış hücrelerde fibronektin, büyüme faktörleri (GF'ler), interlökinler ve sitokinler gibi moleküllerin seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. Birçok araştırma, yaşlı hücrelerin hücre döngüsünde çoğalmalarının engellendiğini telomer kısalmasıyla ilişkilendirir (Labat-Robert ve ark., 2012; Choi ve ark., 2011).

Yaşlanma süreciyle birlikte, dokulardaki kollajen miktarındaki azalma, doku bütünlüğü ve gücünde zayıflamaya yol açar (Damodarasamy ve ark., 2010). Ayrıca, yaşlanmış dokularda artan sertlik, gereksiz kolajen çapraz bağlanmasının artışıyla ilişkilendirilir; bu durum, biyomekanik özelliklerin bozulmasına ve ECM'nin organizasyonunun tehlikeye girmesine neden olur (Frantz ve ark., 2010). Yaşla birlikte, tip I kollajen liflerinin düzeni daha az organize hale gelir, daha gevşek ve parçalı bir yapı gösterir. Bu değişiklikler, özellikle cilt gibi yaşlanmış dokularda belirgin hale gelir (Fisher ve ark., 2008).

Kollajen liflerinin düzenindeki farklılıklar, genç ve yaşlı farelerin tendonlarından elde edilen örneklerde de gözlemlenmiştir (Sprenger ve ark., 2010). Genç farelerin tendonlarında, ECM bileşiminde düşük kollajen içeriği ve yüksek hücresel oranı tespit edilmiştir (Lavagnino

ve ark., 2013). Yaşlı farelerde ise tendonun kollajen içeriği artar ve bu da dokunun sertliğinin artmasına yol açar (Goh ve ark., 2008).

Yaşlanma ile birlikte, cilt dahil diğer bağ dokularda da matriks sentezi ile matriks yıkımı arasındaki denge matriks yıkımına kayar (Labat-Robert, 2004). Bu durum, ciltte elastikiyet kaybı ve kırışıklıklar gibi yaşlanma belirtilerine yol açar (Mancini ve ark., 2012). Esneklik kaybı, MMP'lerin ECM bileşenlerini, özellikle tip I ve III kollajenleri, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanları parçalamasıyla ilişkilidir (Carrino ve ark., 2003). ECM bileşenlerinin kaybı ve kollajenlerin artan çapraz bağlanması, dokuların biyomekanik özelliklerinde yaşla birlikte azalmaya neden olur (Şekil 2.3.) (Vedrenne ve ark., 2012).



Şekil 2.3. Genç ve Yaşlanmış Hücrelerde ECM Dengesi (Mavrogonatou ve ark.,2017)

Bu çalışmada, erken geçişli ve geç geçişli insan dermal fibroblastları karşılaştırıldığında, azalan kollajen I ve III seviyeleri ile birlikte plazminojen aktivatörü, ürokinaz (uPA) ve katepsin O gibi dermal matriksin parçalanmasında rol oynayan proteaz düzeylerinde artış gözlemlenmiştir (Shelton ve ark., 1999). Bu çekirdek ECM proteinlerinin kaybı, dermal matrisin yapısal bütünlüğünün ciddi şekilde bozulmasına neden olur; bu durum, kronolojik yaşlanma sürecinde dermal matris mimarisinin dejenerasyonu ile uyumlu bir bulgudur (West, 1994).

Örneğin, yaşlanma sırasında dermal fibroblastların boyutunda bir azalma, azalan mekanik gerilim ve fibroblast-ECM bağlanmasıyla ilgili bozulmadan kaynaklanmaktadır (Fisher ve ark., 2009). 3B kollajen matrisleri ile yapılan deneyler, azalan mekanik kuvvetlere yanıt

olarak dermal fibroblast boyutunun azalmasının, ECM bileşenlerinin üretimindeki azalma ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Quan ve ark., 2013).

Bir başka çalışmada ise, genç hücrelerin ECM etkileşimlerinin, yaşlı ve senesens hücrelerini genç bir fenotipe geri döndürerek proliferasyon kapasitelerini ve morfolojik özelliklerini restore edebileceği gösterilmiştir. Bu bulgu, ECM kaynaklı çevresel sinyallerin yaşlanmış hücrelerin gençlik özelliklerine yeniden kavuşmasını sağladığını ve hücre yaşlanmasının çevresel faktörlerle manipüle edilebileceğini ortaya koymuştur (Choi ve ark., 2010).

2.3.4. Hücre Yaşlanması ve ECM ile İlişkili Genler

2.3.4.1.p53

p53, 393 amino asitten oluşan ve 17. kromozomun kısa kolunda yaklaşık 20 kilobazlık bir bölgeyi kapsayan TP53 geninin kodladığı 11 eksonlu bir proteindir (Varley ve ark., 1997). Bu protein, hücre döngüsünün kontrolü, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, yaşlanma, programlanmış hücre ölümü, DNA onarımı ve genomik stabilitenin korunması gibi pek çok önemli hücresel süreçte rol oynar (Harris, 1996). p53, bu işlevleri, ya bir transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek ya da diğer proteinlerle veya doğrudan DNA ile etkileşime girerek yerine getirir (Koçak ve ark., 2011).

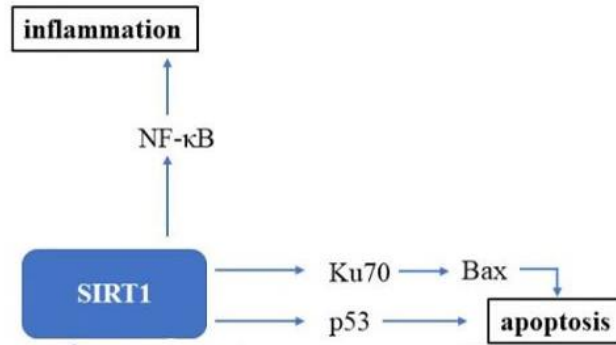
p53, hücre sağkalımı ve ölümüyle ilişkili yolların merkezinde yer alır ve hücrenin mevcut durumuna göre yaşam veya ölüm kararını verir (Velculescu ve El-Deiry, 1996). Hücrede hasar oluştuğunda, p53 stabilize olur ve hücre döngüsünü durdurarak hasarın onarılmasına olanak tanır. Eğer hasar, hücrenin onarım kapasitesini aşarsa, p53 apoptoza neden olan bir yol açar (Koçak ve ark., 2011).

p53, hücre hasar durumunda bir transkripsiyon faktörü olarak DNA'ya bağlanır ve p21 (WAF2/Cip1) protein gen ekspresyonunu uyarır. p21, hücre döngüsünün G0/G1 evresindeki siklin bağımlı kinazların işlevini engelleyerek hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurur. Hasar onarılamazsa, p53, BCL-2 interacting killer (Bik) proteinini indükleyerek hücreyi apoptoza yönlendirir (Mates ve ark., 2008).

2.3.4.2.NAD Bağımlı Deasetilaz Sirtuin-1 (SİRTUİN 1)

Sirtuinler (SIRT), ilk olarak 1970'lerde doğada keşfedilmiş ve hücrel yaşlanmayı geciktirmede ve organizma ömrünü uzatmada önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (Lee ve ark., 2019). İnsanlarda bulunan yedi SIRT izoformu arasında en çok çalışılanı SIRT1'dir (Wang ve ark., 2019). SIRT1, NAD⁺ bağımlı bir deasetilazdır ve bu nedenle tümör baskılayıcı p53 proteini, DNA onarım faktörü Ku70, NF-κB, sinyal transdüktörü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) ve FOXO ailesi gibi çeşitli proteinlerle etkileşime girer (J. Biol. Chem., 2011).

Sirtuinlerin hücrel yaşlanmayı baskılama mekanizmaları, yaşa bağlı telomer kısalmasının geciktirilmesi, genom bütünlüğünün korunması ve DNA hasar onarımının teşvik edilmesi gibi yollarla gerçekleşir. SIRT1, hücre döngüsünü durdurma yeteneğini artırabilir, oksidatif strese karşı direnci sürdürebilir ve hücre ölümünü ve apoptoz yollarını engelleyebilir (Şekil 2.4.) (Brunet ve ark., 2004). Ayrıca, Ku70'in stres kaynaklı apoptotik hücre ölümünü engelleyerek proapoptotik faktör Bax'ı mitokondriden uzak tutarak hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir. NF-κB ise hücre hayatta kalmasını kontrol eden genlerin ifade edilmesinde önemli bir rol oynar. SIRT1, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok yaşa bağlı bozuklukta yer alır (Zhao ve ark., 2020).



Şekil 2.4. SIRT1'in hücrel yaşlanmayı baskılama mekanizması (Mengdi, 2021)

2.3.4.2.1. Sirtuin 1 Yaşlanmadaki Rolü

Sirtuinlerin yaşlanmadaki rolü, ilk kez maya (*Saccharomyces cerevisiae*) modelinde keşfedilmiştir. Bu modelde, bir maya ana hücrenin senesens (hücre yaşlanması) öncesinde kaç kez yavru hücre üretebildiği, yani replikatif yaşam süresi aracılığıyla araştırılmıştır. 1997 yılında yapılan bir çalışmada, maya yaşlanmasının sebeplerinden birinin rDNA bölgelerinde

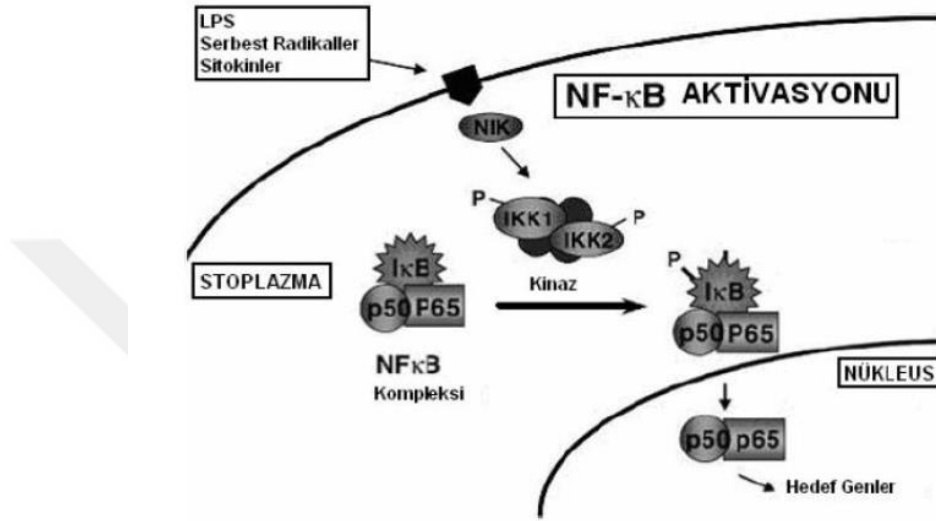
meydana gelen rekombinasyon olduğu belirlenmiştir (Sinclair ve Guarente, 1997). Bu çalışma, homolog rekombinasyon yoluyla ekstrakromozomal rDNA halkası (ERC) oluşumunun, yaşlanan hücrelerde ERC'lerin çoğalmasına ve hücrelerde birikmesine yol açtığını göstermiştir. 1999 yılında yapılan bir başka çalışmada ise, SIR2 geninin ekstra bir kopyasının eklenmesinin, rDNA rekombinasyonunu baskılayarak ERC oluşumunu azaltıp replikatif yaşam süresini yaklaşık %30 oranında uzattığı gösterilmiştir. Buna karşın, SIR2'nin silinmesi ERC'lerin artışına ve yaşam süresinin kısalmasına yol açmıştır (Kaeberlein, McVey ve Guarente, 1999).

Özellikle, SIRT1 hücrel metabolizmayı ve hayatta kalmayı düzenleyebilir (Imai, 2011) ve insan dermal fibroblastlarının (HDF'ler) yaşlanmasını tetikleyen inflamasyon tepkileri ile yaşlanma süreçlerinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, farelerde SIRT1'in genetik olarak yok edilmesi, NF- κ B aktivasyonunu ve pro-inflamatuvar sitokin salınımını artırmıştır. Bu bulgular, SIRT1'in NF- κ B sinyal yolunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ancak, SIRT1/NF- κ B sinyal yolunun HDF yaşlanmasını nasıl etkilediği ve düzenlediği konusunda hala tam bir anlayış bulunmamaktadır.

2.3.4.3.NÜKLEER FAKTÖR KAPPA-B (NF- κ B)

NF- κ B, hücre proliferasyonu, apoptoz ve oksidatif strese karşı yanıt gibi önemli işlevleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. İlk olarak 1986'da Ranjan Sen ve David Baltimore tarafından tanımlanmıştır (Sen ve Baltimore, 1986). NF- κ B ailesi beş farklı üyeden oluşur: NF κ B1 (p50/p105), NF κ B2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB ve cRel. Bu üyeler hücre içinde heterodimer veya homodimer kompleksler şeklinde bulunur (Kierszenbaum, 2007; Shishodia ve Aggarwal, 2002). NF κ B1, başlangıçta 105 kDa'lık uzun bir prekürsör molekül olarak sentezlenir ve daha sonra işlenerek p65 alt birimi ile p50/p65 heterodimerini oluşturur (Bakkar ve Guttridge, 2010). Bu heterodimer kompleksinde, p50 alt birimi DNA'ya bağlanırken, p65 alt birimi transkripsiyonel aktivasyonu başlatır. Normalde, stres durumları olmadığında, NF- κ B dimerleri sitoplazmada, IK-B olarak bilinen inhibitör proteinlerle bağlı halde inaktif olarak bulunur (Ling ve ark., 1998). NF- κ B'nin aktivitesini düzenlemek için en az altı farklı IkB proteini gereklidir. IkB proteinlerinin N-terminal kısımlarındaki serin kalıntıları, çeşitli uyarılarla fosforile olur. Bu fosforilasyon, IkB proteinlerinin proteolitik yıkımını başlatır ve böylece NF- κ B aktive olur. Aktif NF- κ B, nükleusa geçerek burada inflamasyonla ilişkili genlerin transkripsiyonunu başlatan enhancer veya promoter bölgelerine

bağlanır (Ling ve ark., 1998). Bu mekanizma sayesinde NF- κ B, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi süreçlerde kritik bir rol oynar (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. NF- κ B Aktivasyonu (Ling ve ark., 1998)

2.3.4.3.1. NF- κ B nin Yaşlanmadaki Rolü

NF- κ B'nin yaşlanma sürecindeki rolü, deri yaşlanmasının klinik belirtileri ve ekstrasellüler matriksin (ECM) önemli bileşenleri olan kollajen ve elastindeki değişikliklerle ilişkilidir. Yaşlanma sırasında serbest radikallerin birikmesi, fibroblastların yüzeyindeki büyüme faktörleri ve sitokin reseptörlerinin aktive olmasına yol açar. Bu aktivasyon, bir sinyal iletim kaskadının tetiklenmesine neden olur (Tekin, 2005). Sonuç olarak, aktivatör protein 1 (AP-1) ve proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu düzenleyen NF- κ B transkripsiyon faktörü aktive olur. Bu iki faktör, kollajenaz (MMP-1) ve 92 kDa jelatinaz (MMP-2) üretimini artırarak ECM'nin bozulmasına ve dermal yapının zayıflamasına yol açar (Chung ve ark., 2003; Fisher ve ark., 2002). Yaşlanan fibroblastlarda MMP enzimlerinin artışı, dermal yapının parçalanmasına neden olur (Hadshiew ve ark., 2000).

MMP'ler, matriks metalloproteinazlar (MMP), çinko içeren, kalsiyum bağımlı enzimlerdir ve ekstrasellüler matriks ve bazal membran bileşenlerini parçalayabilirler (Rundhaug, 2005). MMP ailesi, bağ dokusu hücreleri tarafından salgılanarak, doku yeniden yapılanması, deri yaşlanması, morfogenez ve yara iyileşmesi gibi biyolojik süreçlerde

önemli roller oynar. Ayrıca, bu enzimler tümör hücre invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alır (Wiseman ve ark., 2003; Maskos, 2005). MMP ailesi, 26 farklı üyeye sahiptir ve özellikle MMP-1 ve MMP-2, matriksin parçalanmasında kritik işlevlere sahiptir (Jenkins, 2002). MMP-1, fibriler kollajeni hidrolize ederek üçlü helikal yapıyı bozar; MMP-2 ise bu denatüre kollajeni daha küçük parçalara ayırarak kollajen yapısının bozulmasına yol açar. Yaşlanan deride, hücre proliferasyonu ile apoptoz arasındaki denge bozulur. Birçok araştırma, NF-kB'nin yaşlanma ile birlikte aktivitesinin arttığını göstermektedir (Kriete ve ark., 2008). Yaşlı bireylerin deri fibroblastlarında NF-kB aktivitesinin arttığını belirten bulgular mevcuttur. Ayrıca, yaşlı farelerde NF-kB'nin genetik olarak inhibe edilmesi, yaşa bağlı patolojileri tersine çevirmiştir, bu da NF-kB'nin inhibisyonunun yaşlanma sürecine karşı potansiyel bir tedavi stratejisi olabileceğini düşündürmektedir (Adler ve ark., 2007).

2.4. Doku Mühendisliği

1990'ların başında Langer ve Vacanti, doku fonksiyonlarını geri kazandırma, koruma veya onarma amacıyla biyolojik ikameler geliştirmek için mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilkelerini birleştiren disiplinlerarası bir alan olarak doku mühendisliğini tanımlamıştır (Langer ve Vacanti, 1993). Doku mühendisliği, dokuya özgü rejenerasyon süreçlerini başlatmayı ve organ nakli sırasında karşılaşılan zorlukları (örneğin, donör eksikliği ve immünoşüpresif tedavi ihtiyacı) aşmayı hedeflemektedir (Caddeo, Boffito ve Sartori, 2017). Günümüzde, doku mühendisliği, doku benzeri yapılar üretmek için canlı hücreler, biyouyumlu malzemeler, biyokimyasal (örneğin, büyüme faktörleri) ve fiziksel (örneğin, döngüsel mekanik yükleme) faktörlerin kombinasyonlarını kullanan, görece yeni bir alan olarak kabul edilmektedir. Bu yaklaşımın nihai amacı, yaralanmaları onarmak veya işlevini kaybetmiş organların yerine geçebilecek doku yapılarının vücuda implantasyonu ile iyileşmeyi sağlamaktır (Berthiaume, Maguire ve Yarmush, 2011). Rejeneratif tıp, doku mühendisliğini kapsayan bir alan olup, vücudun kendi hücreleri ve biyolojik materyallerin birlikte kullanılarak dokuların ve organların yeniden yapılandırılması, yani vücudun kendi kendini iyileştirme yeteneğine odaklanmaktadır (Masson ve Dunnill, 2008). Bu bağlamda, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp terimleri birbirinin yerine kullanılabilir hale gelmiştir. Her iki yaklaşım da, hasar görmüş dokunun işlevini yeniden kazanması ve etkin bir rejenerasyon sürecinin sağlanmasıyla başarıya ulaşır.

2.4.1. Doku mühendisliği stratejileri

Doku mühendisliği yaklaşımları, rejenerasyon amacı güden farklı yöntemleri kapsamaktadır. Hücresiz greftler, donör dokudan hücrelerin uzaklaştırılmasıyla elde edilen, hücresel bileşenlerden arındırılmış ancak hücre dışı matriks (HDM) elemanlarını koruyan iskelelerdir. Bu tür iskeleler, aynı zamanda sentetik biyomateryaller kullanılarak da üretilmektedir. HDM iskeleleri, hücrelerin uzaklaştırılması sayesinde daha yüksek biyoyumluluk sunarak, yeni doku gelişimi için daha uygun hale gelir ve bu özellikleriyle gelecekte önemli bir seçenek olarak öne çıkmaktadır. İskelelerin yapımında, proteinler ve yapay malzemeler dahil olmak üzere farklı biyomateryaller veya HDM'ler kullanılmaktadır. Bu iskeleler üzerine, büyüme faktörleri içeren veya içermeyen hücre grupları eklenebilir ve uygun ortam sağlandığında doku gelişimi beklenir (Belleghem ve ark., 2020).

2.4.2. 3 Boyutlu Biyoyazıcı

3B biyoyazıcı teknolojisi, biyomalzemeler ve hücreleri mikrometre ve milimetre aralığında istenilen şekillerde birleştirerek, mühendislik ürünü doku benzeri yapılar üretmeyi mümkün kılan yenilikçi bir yaklaşımdır. Son on yılda büyük bir hızla gelişen bu teknoloji, rejeneratif tıp alanında önemli bir rol oynamaktadır. 3B biyoyazıcılar, canlı hücreleri ve biyomalzemeleri aynı anda birleştirerek, kullanıcı tarafından belirlenen desenlere göre "tabandan yukarıya" doğru 3B yapay implantlar veya karmaşık doku yapıları üretme imkânı sunmaktadır (Mandrycky ve ark., 2016). Bu süreçte hücreler, biyomürekkep olarak kullanılırken, kullanılan biyomalzemelerin biyoyumlu olması, hücre hasarını önlemesi ve uygun reolojik ile mekanik mukavemete sahip olması kritik öneme sahiptir (Murphy ve Atala, 2014; Groll ve Yoo, 2018).

Hidrojeller, hücre kapsülleme için biyoyumlu ve mekanik olarak destekleyici bir mikro çevre sağladıkları için 3B hücre baskısında biyomürekkep olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Park, 2011). Kollajen, kitosan, jelatin metakriloyl (GelMA), aljinat ve hyaluronik asit (HA) gibi çeşitli hidrojel bazlı iskelelerin, biyoyumluluk ve kontrol edilebilir malzeme özellikleri sunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Fernandes-Cunha ve ark., 2020; Guo ve ark., 2024).

Bu polimerler arasında kollajen, doğal bir ECM proteini olarak hayvan kaynaklarından elde edilebilmesi sayesinde belirgin bir avantaj sunar. Ancak, kollajenin düşük mekanik dayanıklılığı ve baskı sonrasında yeterli şekil sadakatine ulaşamaması hem *in vitro* hem de *in*

vivo ortamda 3B yapının korunmasını zorlaştırmaktadır (Singh ve ark., 2016). Bu dezavantajları gidermek amacıyla, kollajen genellikle farklı doğal veya sentetik polimerlerle kombine edilerek kompozit hidrojellerin oluşturulmasında kullanılmaktadır.

3B biyobaskı teknolojisi, karmaşık mikro yapıları hassas bir şekilde kontrol edebilme kabiliyeti ile dokuya özgü yapıların oluşturulmasını mümkün kılmakta ve umut vadeden sonuçlar sunmaktadır (Levato ve ark., 2014). Bu yöntem, farklı polimerlerin ve canlı hücrelerin eş zamanlı olarak basılmasına olanak tanır ve doku mühendisliği uygulamaları için gerekli olan hücresel yapıları destekler (Malda ve ark., 2013). Ayrıca, hedef doku hücreleri ile hazırlanmış hidrojellerin biyomürekkep olarak kullanılmasıyla, biyolojik ve fiziksel açıdan uyumlu, yenilenme kapasitesi yüksek iskelelerin üretilmesi sağlanabilir (Zhang ve Huang, 2021). Bu durum, doku onarımı ve rejeneratif tıp alanlarında yeni ve güçlü uygulamaların önünü açmaktadır.

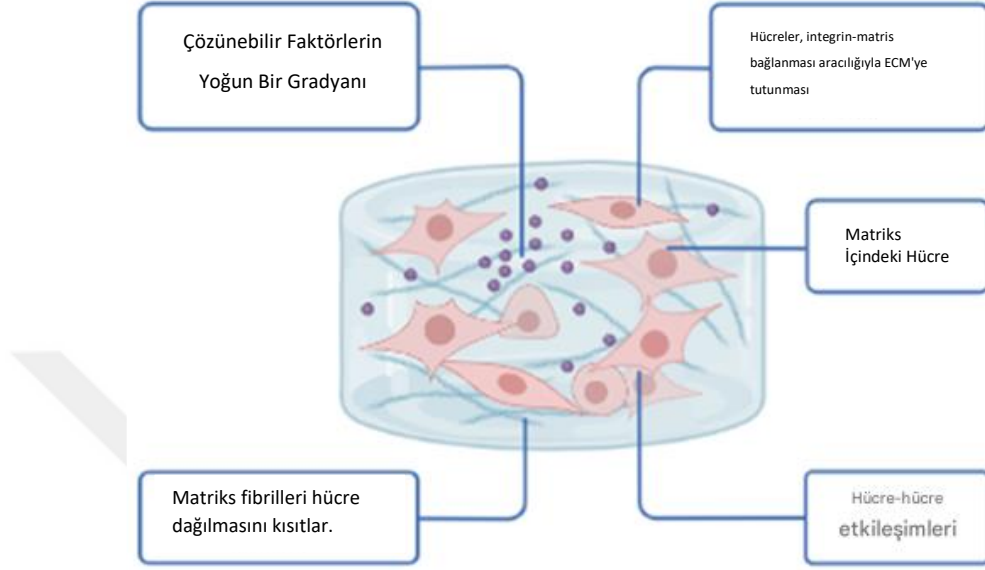
2.5. Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Üç boyutlu (3B) hücre kültürü, hücrelerin karmaşık *in vivo* ortamları daha iyi simüle etmesini sağlar (Ravi ve ark., 2015). Hücreler 3B yapılar içinde büyüdüğünde, hücreler arası iletişim ve sinyal iletimi gibi süreçler daha etkin gerçekleşir (Saji Joseph ve ark., 2019). 3B hücre kültürü sistemleri genel olarak iskele içermeyen, iskele bazlı ve hibrit modeller olmak üzere üç ana kategoriye ayrılır (Şekil 2.6.) (Jensen ve Teng, 2020).

İskele içermeyen teknikler, katı bir destek yapıya ihtiyaç duymadan hücre agregatları veya sferoidlerin oluşumuna olanak tanır. Bu yöntemler arasında askıda damla tekniği, düşük yapışkanlık yüzeyleri ve manyetik levitasyon gibi uygulamalar öne çıkar. İskele bazlı modellerde ise biyolojik veya sentetik hidrojeller, hücreler için 3B ortam oluşturacak şekilde iskele olarak kullanılır. Hibrit modeller ise hem iskele bazlı hem de iskele içermeyen yöntemlerin avantajlarını birleştirir.

Bir 3B kültür modelinin seçimi, hücrelerin proliferasyonu, agregasyonu ve farklılaşması için dokuya özgü fizyolojik bir mikro çevrenin taklit edilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Anton ve ark., 2015). Bununla birlikte, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks (ECM) etkileşimlerinin yanı sıra, dokuya özgü sertlik, oksijen ve besin gradyanları ile metabolik atıkların uzaklaştırılması gibi unsurların sağlanması gereklidir (Griffith ve Swartz,

2006). Bu nedenlerle, çalışma amacı doğrultusunda en uygun 3B hücre kültürü modelinin belirlenmesi büyük önem taşır.



Şekil 2.6. Üç Boyutlu Hücre Kültürü (Owems, 2023)

2.5.1. İskele bazlı 3B hücre kültürü modelleri

İskele bazlı kültür teknolojileri, hücrelere agregasyon, proliferasyon ve göç için gerekli mekanik desteği sunan, ECM benzeri matrislerin fiziksel yapısını sağlayan önemli bir yöntemdir (Hayward ve ark., 2013). Bu teknolojilerde kullanılan iskelelerin kimyasal ve fiziksel özellikleri, hücrelerin fonksiyonlarını doğrudan etkileyebilir (Kapałczyńska ve ark., 2018). Hücreler, iskele üzerinde veya içinde yerleştirilerek doğal ECM ortamında gerçekleşen işlevlerini taklit eden bir mikro çevre oluşturur. İskele malzemeleri, biyolojik kaynaklı kolajen, matrigel, jelatin ve aljinat gibi materyallerin yanı sıra polietilen glikol, polilaktik asit ve hiyalüronik asit gibi sentetik polimerlerden de üretilebilir (Langhans, 2018).

Doğal kaynaklı malzemeler arasında kolajen, fibrin ve hiyalüronik asit gibi ECM'nin temel bileşenleri öne çıkar (Willerth ve ark., 2006; Gerecht ve ark., 2007). Bunlar, hücre yapışmasını destekleyen doğal adezyon bölgeleri sağlayarak hücrelerin canlılık, proliferasyon ve farklılaşma süreçlerini olumlu yönde etkiler. Ayrıca, ipek, jelatin ve aljinat gibi diğer doğal türevli materyaller de iskele üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Awad ve ark., 2004).

Sentetik malzemeler ise ECM'nin mekanik özelliklerini taklit edecek şekilde tasarlanır ve genellikle belirli kimyasal formülasyonlara uyarlanabilirlik ve ayarlanabilir mekanik özellikler gibi avantajlar sunar (Langhans, 2018). Polimerler, titanyum, biyoseramikler, biyoaktif camlar ve peptitler gibi malzemeler bu kategoride yer alır (Gunatillake ve ark., 2003; Lu ve ark., 2003). Bunun yanı sıra, bazı sentetik iskelelerde hormonlar, büyüme faktörleri veya biyolojik olarak aktif moleküller kapsüllenerek hücre adezyonu, farklılaşması veya proliferasyonu desteklenebilir (Hayward ve ark., 2013).

İskele tasarımında kullanılan materyallerin biyobozunurluk, gözeneklilik, gözenek boyutu, sertlik ve stabilite gibi özellikleri kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte, bazı sentetik malzemeler doğal ECM'nin adezyon bölgelerinden yoksun olabilir ve bu eksiklik, iskelelerin ECM proteinleriyle kaplanmasıyla giderilebilir (Caliari ve Burdick, 2016). Bu özelliklerin optimizasyonu, iskelelerin hücre kültürü uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için gereklidir.

2.5.1.1.Biyolojik Hidrojel

Hidrojel, çapraz bağlar veya hidrojen bağları yoluyla birbirine bağlanan seyrek polimer zincirlerinden oluşan ve yüksek su tutma kapasitesine sahip hidrofilik polimer ağlarıdır (Lian ve ark., 2017). Hidrojellerin en önemli özelliklerinden biri, ECM yapısını taklit edebilmesi ve büyüme faktörleri ile sitokinler gibi çözünebilir moleküllerin jel içinde serbestçe hareketine olanak sağlamasıdır (Jensen ve Teng, 2020). Bu özellikleri, hidrojelleri doku mühendisliğinde en yaygın kullanılan iskele malzemelerinden biri haline getirmektedir.

Hidrofilik yapısı sayesinde büyük miktarda su emme ve tutma kapasitesine sahip olan hidrojeller, aynı zamanda düşük yüzey gerilimi, yumuşaklık ve lastik benzeri esneklik gibi özellikler sunar (Hamidi ve ark., 2008). Bu özellikleri, hidrojelleri doğal dokularla uyumlu ve çok yönlü bir seçenek haline getirir. Hidrojel yapımında sentetik, doğal veya her iki tür malzemenin kombinasyonundan oluşan hibrit yaklaşımlar kullanılabilmektedir. Hibrit hidrojeller, fiziksel ve biyolojik özelliklerin geliştirilmesi amacıyla tasarlanmıştır (Zhu, 2011).

Doğal hidrojeller genellikle kolajen, matrigel, jelatin, fibrinojen, hiyalüronik asit ve aljinat gibi biyopolimerlerden üretilmektedir. Bu tür hidrojeller, hücrelerin yapışması, hayatta kalması, kontrollü çoğalması ve farklılaşması için uygun bir ortam sağlar (Drury ve Mooney,

2003). Kolajen, bu alanda en çok tercih edilen doğal polimerlerden biri olup, hidrojel hazırlığında yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.5.2. Biyomürekkep olarak ECM'nin rolü

Doku mühendisliği uygulamalarında doğal biyopolimerler, kollajen, kitosan, alginat, fibrin, elastin, laminin, heparan sülfat ve hyaluronik asit gibi çeşitli malzemelerden yararlanılarak doğal iskeleler olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, hücreleştirme yöntemiyle farklı dokulardan elde edilen hücre dışı matriks (ECM), biyolojik iskele olarak sıkça tercih edilmektedir. Hücreleştirilmiş doku ve organlardan elde edilen biyolojik yapıların hem klinik öncesi hayvan modellerinde hem de insan klinik uygulamalarında başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Lin ve ark., 2004; Dellgren ve ark., 1999).

ECM'den türetilen biyolojik iskeleler, farklı doku türlerinin yenilenmesini destekleme yeteneğiyle ön plana çıkmaktadır. Her doku ve organa özgü ECM bileşenleri, yapısal düzenlenmeleri ve biyomekanik özellikleri sayesinde biyomalzeme tasarımı ve üretim süreçlerinde büyük ilgi görmektedir (Nieponice ve ark., 2009).

Hücreleştirilmiş ECM iskeleleri, içerdikleri kollajen, glikozaminoglikanlar (GAG), matris proteinleri ve büyüme faktörleri ile sentetik iskelelere kıyasla biyomimetik özellikleri açısından daha üstün kabul edilmektedir. Bu özellikler, hücreleştirilmiş ECM iskelelerini daha etkili bir biyolojik taşıyıcı haline getirmektedir (Jain ve Bansal, 2015).

Son yıllarda, dokuya özgü ECM biyomürekkeplerinin geliştirilmesi, 3B baskı teknolojileriyle kusurlu dokuların daha uyumlu ve işlevsel yapılarla yenilenmesini mümkün kılmıştır. Hücre yüklü, 3B baskılı ECM yapıları, yalnızca kollajen bazlı yapılara kıyasla daha fazla doku oluşumunu desteklemiştir. Örneğin, ECM molekülleri kullanılarak oluşturulan yeni bir deri ECM türevli biyomürekkep, yumuşak doku yenilenmesi için önemli bir potansiyele sahiptir (Pati ve ark., 2015).

2.6. Hücreleştirme

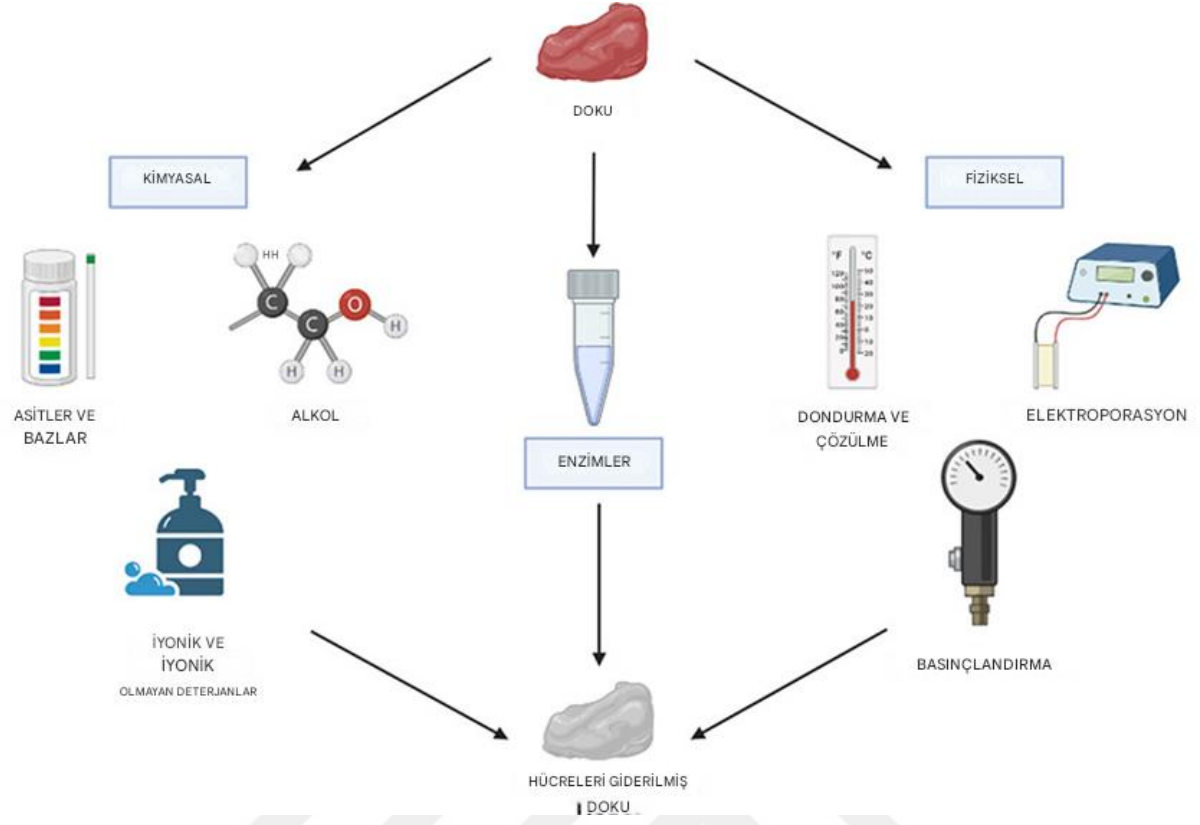
Hücreleştirme işlemi sırasında, doğal doku yapısının ve ECM bileşiminin korunması büyük önem taşır. Hücreleştirme yöntemleri ve kullanılan dokunun kökeni, ECM'nin yapısal bütünlüğünü ve biyokimyasal özelliklerini etkileyebilir. Aynı zamanda bu süreçte uygulanan sterilizasyon yöntemleri de ECM'nin biyolojik tepkilerini

değiştirebilmektedir. Hücresizleştirme işlemi, farklı doku ve organlara uygulanabilir, ancak her bir uygulamada kullanılan yöntemlerin ECM'nin yapısına olan etkisi değişiklik gösterebilir (Crapo ve ark., 2011).

Bu işlem genellikle fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin tek başına veya kombinasyon halinde kullanılmasını içerir (Şekil 2.7.). Fiziksel yöntemler arasında karıştırma, sonikasyon ve dondurma/çözme gibi teknikler yer alır. Bu yöntemler, hücre zarlarını tahrip ederek hücre içeriğinin serbest bırakılmasını ve ardından yıkama işlemiyle hücresel kalıntıların ECM'den uzaklaştırılmasını sağlar. Ancak, fiziksel yöntemlerin tek başına yeterli olmadığı durumlarda kimyasal ve enzimatik yöntemlerle desteklenmesi gerekebilir.

Hücresizleştirme protokollerinde genellikle önce hücre zarlarının parçalanması sağlanır, ardından enzimatik yöntemlerle hücresel içerikler ECM'den ayrılır. Kimyasal ajanlar ise sitoplazmik içeriklerin çözünür hale getirilmesine yardımcı olur. Sürecin sonunda, hücresel kalıntılar tamamen uzaklaştırılarak saf ECM elde edilir (Gilbert ve ark., 2006).

Hücresizleştirilmiş dokuların değerlendirilmesinde, çekirdek kalıntılarının bulunmaması ve çift sarmallı DNA (dsDNA) miktarındaki belirgin azalma önemli bir başarı göstergesidir. Bu bulgular, hücresizleştirme sürecinin etkili bir şekilde gerçekleştirildiğini ve hedef dokudan hücresel içeriğin tamamen uzaklaştırıldığını işaret eder. Aynı zamanda, bu süreçte antijen gibi diğer hücresel içeriklerin de uzaklaştırıldığı varsayılır. Hücresizleştirme işleminin etkinliği, biyolojik ve klinik uygulamalarda kullanılacak dokuların güvenliği ve uygunluğu açısından kritik bir öneme sahiptir (Neishabouri ve ark., 2022).



Şekil 2.7. Hücresizleştirme Yöntemleri (Paula ve ark., 2023)

2.6.1. Hücresizleştirilmiş Ekstrasellüler Matriks Hidrojeli

ECM hidrojellerinin üretimi, öncelikle hedef dokunun tamamen hücresizleştirilmesini takiben bir dizi işlem gerektirir. Bu işlemler arasında dondurarak kurutma, toz haline getirme, kısmi enzimatik sindirim ve fizyolojik koşullara nötralizasyon bulunur. Hücresizleştirilmiş dokuların dondurarak kurutulması, hem su içeriğinin uzaklaştırılması hem de dECM'nin uzun süreli saklanması açısından kritik bir adımdır. Özellikle yüksek su içeriğine sahip dokular için dondurarak kurutma yöntemi en uygun seçenektir (Farnebo ve ark., 2014). Kurutulmuş dECM'nin toz haline getirilmesi, ECM'nin yüzey alanını artırarak enzimatik sindirim sürecinin verimliliğini önemli ölçüde artırır. Bu adım, sindirim süresini kısaltarak ECM'nin asidik koşullarda uzun süre maruz kalmasının önüne geçer.

Kısmi enzimatik sindirim işlemi, ECM'nin çözünmesini sağlamak amacıyla gerçekleştirilir. Toz haline getirilmiş ECM, yoğun kollajen lifleri nedeniyle fosfat çözeltisi gibi biyolojik çözücülerde çözünmez. Bu nedenle, pepsin gibi enzimler kullanılarak kısmi sindirim uygulanır. Sindirim süreci; enzim konsantrasyonu, enzim ile ECM tozu oranı ve çözücü türü gibi faktörlere bağlı olarak farklılık gösterebilir. Ancak yetersiz veya aşırı

sindirim, hidrojellerin homojen lif dağılımı ve mekanik özelliklerini olumsuz etkileyerek istenilen yapı ve özelliklerin elde edilmesini zorlaştırabilir. Bu nedenle, en uygun sindirim koşullarının belirlenmesi büyük önem taşır (Wolf ve ark., 2012; Wu ve ark., 2015; Ahearne ve Coyle, 2016; Wassenaar ve ark., 2015).

Sonuç olarak, ECM'nin hidrojel formuna dönüştürülmesi sürecinde, fizyolojik tuz, pH ve sıcaklık gibi koşulların dikkatle kontrol edilmesi gereklidir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Aljinat, Sigma, Almanya
- Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- DMEM/Ham's F-12 (DMEM/F-12), with L-Glutamine, Diagnostics
- Etanol, Merck, Almanya
- Fetal Sığır Serum (FBS), Diagnostics
- Fosfat tuz çözeltisi (PBS), Gibco, USA
- Hidroklorik Asit (HCl), ISOLAB
- Kloroform, Sigma, Almanya
- Pepsin, Sigma, Almanya
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Diagnostics
- Sodyum Hidroksit (NaOH) , Merck, Almanya
- Sodyum Klorit (CaCl₂), Merck, Almanya
- %0,25 Trypsin/EDTA, Diagnostics
- TRUEzol Reagent, ClearBand
- Triton X-100, Sigma, Almanya
- Dispaz II, Sigma, Almanya
- SDS
- İzopropanol

Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler

- 25 cm²'lik Hücre Kültürü Flaskaları, Nest
- 75 cm²'lik Hücre Kültürü Flaskaları, Nest
- 150 cm²'lik Hücre Kültürü Flaskaları, Nest
- 5 mL Serolojik Pipetler, Medpoint

- 10 mL Serolojik Pipetler, Medpoint
- 25 mL Serolojik Pipetler, Medpoint
- 50 mL Serolojik Pipetler, Medpoint
- Pipet Ucu 10 µL, Eppendorf, Almanya
- Pipet Ucu 200 µL, Greiner
- Pipet Ucu 1000 µL, Eppendorf, Almanya
- 10 mL Steril Enjektör, Ayset
- 0,22 µm Steril Şırınga Filtresi, TPP
- 6 kuyulu kültür kapları, Nest
- 0,2 mL PZR Tüpü, Axygen
- 15 mL Santrifüj Tüpü, Nest
- 50 mL Santrifüj Tüpü, Nest
- 1,5 mL Mikrosantrifüj Tüpü, Axygen
- 0,2 mL PZR Tüpü, Axygen
- 96 Kuyucuklu PZR Plakası, Nest
- Kriyotüp, TPP

Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- 3B Biyoyazıcı, Axolotl Biosistem, Türkiye
- Hassas Terazî, Ohaus, USA
- Manyetik Karıştırıcı, Weightlab Instruments
- Distile su cihazı
- pH Metre
- Vorteks
- Otoklav
- Su banyosu

- Biyogüvenlik-2 Kabini
- Hücre Kültürü İnkübatörü (CO₂ inkübatörü), Thermo Scientific
- Serolojik pipet tabancası, Thermo Scientific
- Santrifüj
- Inverted Mikroskop
- Işık Mikroskobu
- Hücre Görüntüleme Cihazı, Evos Flouid Microscope
- Hücre Sayım Cihazı, Anvajo
- Buzdolabı
- - 80°C Dondurucu
- Sıvı Azot Tankı
- PZR Kabini
- Gerçek zamanlı PZR Cihazı
- Nanodrop Cihazı
- Termal Döngüleyici
- Mikropipetler, Eppendorf, Almanya
- Liyofilizatör (freeze dryer), CHRIST

Kullanılan Kitler

- BlasTaq™ 2X qPCR Master Mix, Abmgood
- OneScript Plus cDNA Synthesis Kit, Abmgood
- qPCR MasterMix, Abmgood

3.1. Hücresizleşmiş Dermal Hücre Dışı Matriksinin Eldesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 23.06.2023 tarihli ve 2023/27 sayılı Etik Kurul Raporu kapsamında gerçekleştirilmiştir. Wistar Albino türü sıçanlar, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Deneysel Tıp Araştırma Laboratuvarı (DETALAB)'tan temin edilmiştir. Bu çalışmada, yaşa göre iki farklı gruba ayrılan 2 aylık (genç) ve 8 aylık (yaşlı) Wistar Albino türü sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar ksilazin (75 mg/kg) - ketamin (8 mg/kg) anestezisi altında ötanazi edilerek sırt derisi dokuları alınmıştır (Şekil 3.1.).

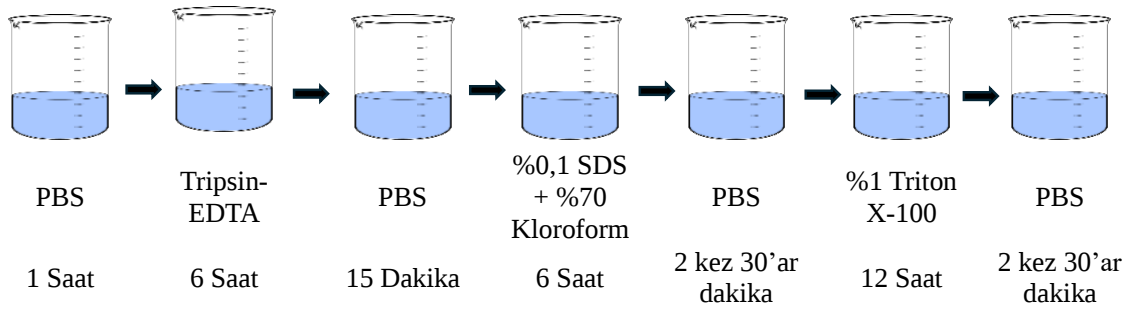


Şekil 3.1. Genç sıçan (solda) ve yaşlı sıçan (sağda)

Sıçan deri dokusundan hücrelerin uzaklaştırılması ve doğal dokuya en yakın yapının (HDM) elde edilmesi amacıyla literatürde yaygın olarak kullanılan Triton X-100 bu çalışmada da tercih edilmiştir. Hücresizleştirme işlemine başlamadan önce, dokuların belirli bir kısmı "doğal doku (kontrol grubu)" olarak ayrılmış ve bu dokular, uygulamalara kadar -80°C 'de saklanmıştır.

Hücresizleştirmeye başlamadan önce deri örnekleri, üzerlerindeki kan kalıntılarını temizlemek amacıyla PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından, hipodermis tabakasındaki yağ dokusu pens yardımıyla dikkatlice temizlenmiştir. Epidermis tabakası, dispaz II enzimi (50 U/mL) kullanılarak 4°C 'de bir gece süren inkübasyonla dermis tabakasından cımbız yardımıyla ayrılmıştır. Enzim uygulaması ile ayrılan dermis tabakası, $1 \times 1 \text{ cm}^2$ boyutlarında kesilmiş ve hücresizleştirme protokolüne tabi tutulmuştur. Tüm işlemler manyetik karıştırıcıda (300 rpm) oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Deri doku parçaları öncelikle $1 \times$ PBS çözeltisi ile 1 saat muamele edilmiştir. Ardından, 37°C 'de %0,25 Trypsin-EDTA ile 6 saat bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında, tekrar 37°C 'de PBS ile üç kez durulanmıştır. Daha sonra, %70 izopropanol ve %0,1 SDS karışımında 37°C 'de 6 saat bekletilmiştir ve ardından distile su ile beş kez durulama yapılmıştır. Takip eden aşamada, %1 Triton X-100 kullanılarak 37°C 'de 12 saat boyunca işlemler gerçekleştirilmiş, Daha sonra PBS ile iki kez durulama yapılmıştır. İşlemler tamamlandıktan sonra, örnekler üç gün boyunca liyofilize edilmiş ve kullanıma kadar -20°C 'de saklanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Hücresizleştirme protokolünün akış şeması

3.2. Hücresizleşmiş Dermal Hücre Dışı Matriksinin Karakterize Edilmesi

Deselülerize edilmiş dermal HDM'nin karakterizasyonuna yönelik tüm analizlerde, pozitif kontrol olarak hücresizleştirme işlemi uygulanmamış doğal deri dokusu kullanılmıştır.

3.2.1. DNA içerik analizi

Dokuların DNA içerikleri, ticari bir kit (Zymo Research) kullanılarak belirlenmiştir. İlk olarak, dokulara kit içerisindeki 200 µL bağlama çözeltisi (Binding Buffer) ve 40 µL Proteinaz K eklenmiş ve vortexlenmiştir. 60 °C'de 5 dakika inkübasyon yapılarak doku sindirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonrasında, örnekler 200 µL %99 etil alkol eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Kitin içeriğinde yer alan filtreli tüpler ve toplayıcı tüpler ile birleştirilmiş, ardından Eppendorf tüplerindeki karışım pipetle filtreli tüplere aktarılmıştır. 18.000 g'de 2 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve santrifüj sonrası filtrelenen kısım tüpten uzaklaştırılmıştır. Filtreli tüplerin üzerine 400 µL inhibitör çözelti eklenerek tekrar 18.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpdeki filtrelenen kısım bu aşamada da uzaklaştırılmış ve 750 µL yıkama çözeltisi eklenerek yine 18.000 g'de 2 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüjün ardından tüpler atılmış ve filtreli tüpler eppendorf tüplere yerleştirilmiştir. Daha önce 70 °C'de ısıtılan elüsyon çözeltisinden 100 µL eklenmiş ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak, 18.000 g'de 2 dakika santrifüj işlemi yapılmış ve santrifüj sonrasında filtreli tüpler atılmıştır. Eppendorf tüplerdeki DNA'lar, bir gece +4 °C'de bekletildikten sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. DNA Miktarının Ölçümü ve Saflık Tayini

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflık dereceleri, Microplate (Thermo Scientific – Multiskan) spektrofotometre cihazı kullanılarak belirlenmiştir. DNA'nın saflık ve

miktar tayini, spektrofotometrede 260 nm, 280 nm, 260 nm/280 nm ve 260/230 nm dalga boylarında yapılan okumalar sonucunda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Hücesizleştirilmiş ve doğal doku örnekleri arasındaki kimyasal bağ benzerlikleri ile her iki yapıdaki fonksiyonel grupların tespiti amacıyla, zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) yöntemi kullanılarak FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer, Jasco, UK) analizi yapılmıştır. Spektrumlar, $500-4000\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında ve 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte elde edilmiştir. Arka plan absorpsiyonu ise 100 tarama ile ölçülmüştür. Ölçüm sonunda elde edilen pikler şunları ifade etmektedir (Şekil 3.3.):

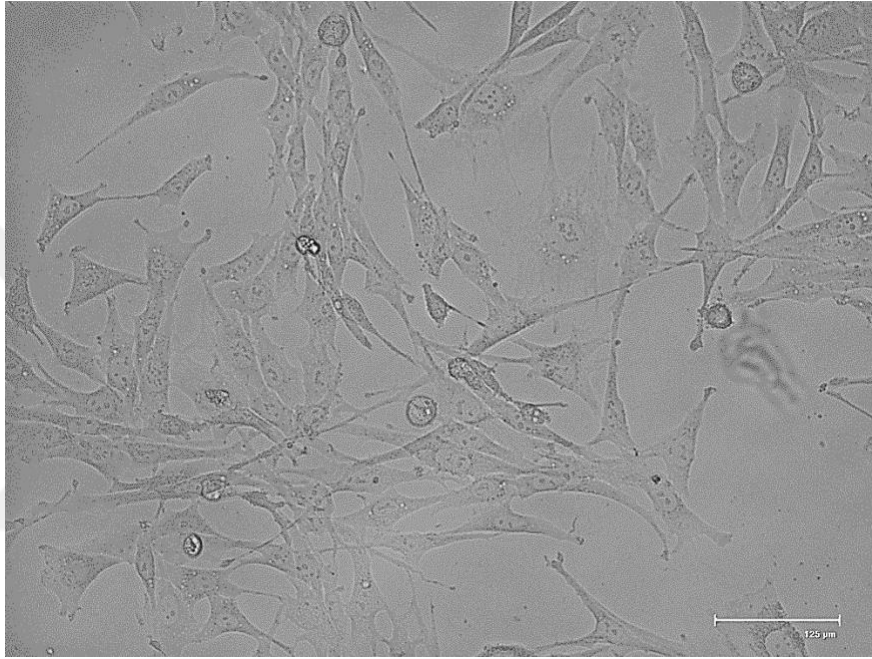
- 2900 cm^{-1} : Lipit (-CH grupları)
- $1600-1700\text{ cm}^{-1}$: Protein yapısı (Amid I, genellikle alfa heliks ve beta tabaka)
- $1500-1550\text{ cm}^{-1}$: Protein yapısı (Amid II)
- $1030-1150\text{ cm}^{-1}$: Karbonhidratlar, glikozaminoglikanlar (GAG)
- $600-1500\text{ cm}^{-1}$: Diğer fonksiyonel gruplar



Şekil 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan FTIR cihazı

3.4. Hücre Kültürü

Tez kapsamında, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edilen İnsan Dermal Fibroblast Hücre Hattı (HDF) kullanılarak bir üç boyutlu kültür modeli geliştirilmiştir. Deneysel süreçlerde, İnsan Dermal Fibroblast hücreleri için erken pasaj (genç) için 35, geç pasaj (yaşlı) için 61 arasında pasaj numaraları kullanılmıştır. HDF hücre hattı Marmara Üniversitesi'nden Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Ceren Çalikoğlu Koyuncu tarafından temin edilmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. İnsan Dermal Fibroblastlarının Mikroskopik Görüntüsü (10X).

3.4.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

Hücrelerin kültüre edilme süreci, dondurma solüsyonunda bulunan DMSO'nun yüksek toksisitesi nedeniyle hızla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hücreler sıvı azot tankından çıkarılmış ve elde hızlı bir şekilde çözülmüştür. Çözülen kriyotüpler, biyogüvenlik kabini içinde %70 alkol ile dekontamine edilmiştir.

Hücreler, aşırı pipetleme ile köpürmenin önüne geçmek için 2 ml'lik bir pipet kullanılarak dikkatlice 5 kez yeniden süspanse edilmiştir. Sonrasında, hücreler 15 ml'lik Falcon tüpüne aktarılmış ve üzerine 5 ml uygun besiyeri eklenerek 500 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında, süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış ve hücre peleti uygun besiyeri içinde yeniden süspanse edilmiştir.

Süspanse edilen hücreler, T75'lik flask içerisine eklenmiş ve yapışmalarını sağlamak amacıyla 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre zarfında hücrelere müdahale edilmemiştir. İlk 24 saatlik inkübasyonun ardından, kalan olası DMSO izlerini gidermek amacıyla besiyeri değiştirilmiş ve hücreler yeniden inkübatöre yerleştirilmiştir.

3.4.2. Hücrelerin Beslenmesi ve Pasajlanması

Hücre kültürü çalışmalarında, %10 FBS içeren High Glucose DMEM besiyeri hazırlanması için 450 ml besiyeri üzerine 5 ml penisilin-streptomisin ve 50 ml FBS eklenmiştir. Çalışma süresince hücreler düzenli aralıklarla ters mikroskop ile gözlemlenmiş ve her 2 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücreler kültür kabının yüzeyini %80-90 oranında kapladığında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Pasajlama işlemi sırasında, mevcut besiyeri serolojik pipet kullanılarak uzaklaştırılmış, hücreler kültür kabının yüzeyi uygun şekilde 2 kez PBS ile yıkanmıştır. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, hücrelerin yüzeyden ayrılması amacıyla 37°C'de 5 dakika süreyle Tripsin/EDTA solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskop altında gözlemlendikten sonra, Tripsin/EDTA'nın etkisini durdurmak için iki katı kadar besiyeri eklenmiş ve hücreler santrifüj tüpüne alınarak 500 g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant dikkatlice atılmış, hücre peleti besiyeri içinde çözülmüş ve hücre sayımı için 20 µl ayrılmıştır. Geri kalan hücreler ise daha geniş yüzey alanına sahip kültür kaplarına aktarılmış ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre devam edilmiştir.

3.4.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımında, Anvajo markalı otomatik hücre sayım cihazı kullanılmıştır. Pasajlama işlemi sırasında, hücre sayımı amacıyla ayrılan 20 µl hücre süspansiyonu hücre sayım lamına aktarılmıştır. Hücrelerin doğru bir şekilde sayılabilmesi için uygun bir seyreltme faktörü uygulanmıştır. Seyreltme işleminin ardından, hücre sayım lamı otomatik sayım cihazına yerleştirilmiş ve cihaz yardımıyla hem canlı hücre sayısı hem de canlılık yüzdesi hesaplanmıştır.

3.4.4. Hücrelerin Dondurulması

Çalışmanın tekrarlanabilirliğini sağlamak ve hücre hatlarını pasaj sayısının olumsuz etkilerinden korumak amacıyla hücre hatlarının stoklanması gereklidir. Bu işlem, hücre hattının dondurulması yoluyla gerçekleştirilir. Dondurma solüsyonunda yer alan DMSO, hücreler açısından toksik olmasına rağmen, suyun donarken kristalleşmesini önleyerek hücrelerin zarar görmesini engeller. Böylece, su amorf bir şekilde donar ve buz kristallerinin hücrelere zarar verme riski azaltılır. Solüsyonun diğer bileşeni olan FBS, hücrelerde oksidatif stresi azaltmada önemli bir rol oynar. Dondurma solüsyonu, %90 FBS (fetal sığır serumu) ve %10 DMSO (Dimetil sülfoksit) içermektedir.

Dondurma işlemine başlamadan önce, her kriyotüp üzerine tarih, hücre hattı ve pasaj numarası kalıcı bir marker ile yazılmış ve dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. Hücreler dondurulmadan önce pasajlama işlemi uygulanmış, santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak dondurma solüsyonu yavaşça hücre peletine eklenmiş ve süspansiyon haline getirilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu mikropipet yardımıyla kriyotüplere bölünmüş ve her kriyotüpte 2 ila 5 x 10⁶ hücre olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücrelerin zarar görmesini en aza indirmek amacıyla kademeli dondurma işlemi uygulanmış; hücreler önce bir saat süreyle -20°C'de bekletilmiş, ardından gece boyunca -80°C'de saklanmış ve daha sonra sıvı azot tankına alınarak uzun süreli saklama sağlanmıştır.

3.5. Deselülerize dermal hücre dışı matriksinin 3B biyobaskı teknoloji kullanılarak üretimi

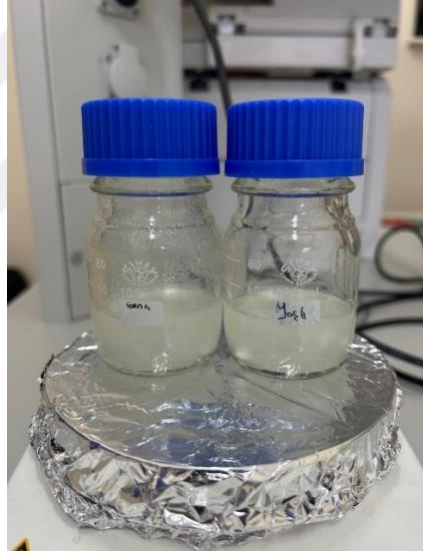
Yapı bütünlüğü korunmuş ve doğal dokuya benzer özellikler sergileyen HDM, liyofilize edildikten sonra bu çalışmalarda kullanılmıştır.

3.5.1. Hidrojel hazırlanması

Liyofilizasyon işlemi sonrasında elde edilen kuru doku örnekleri küçük parçalara ayrılarak (Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.) , 10 mg HDM dokusu 0.01 N HCl (pH:1.8) içerisinde hazırlanan 1 mg/mL pepsin çözeltisine alınmış ve manyetik karıştırıcıda 72 saat boyunca sindirilmiştir. Sindirim sonrasında, 1:10 oranında 1M NaOH eklenerek nötralizasyon sağlanmış, ardından 1:9 oranında 10x PBS eklenmiştir. 3B biyobaskı işlemlerine kadar 4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.5. Liyofilize Doku



Şekil 3.6. HDM dokusunun sindirilme süreci.

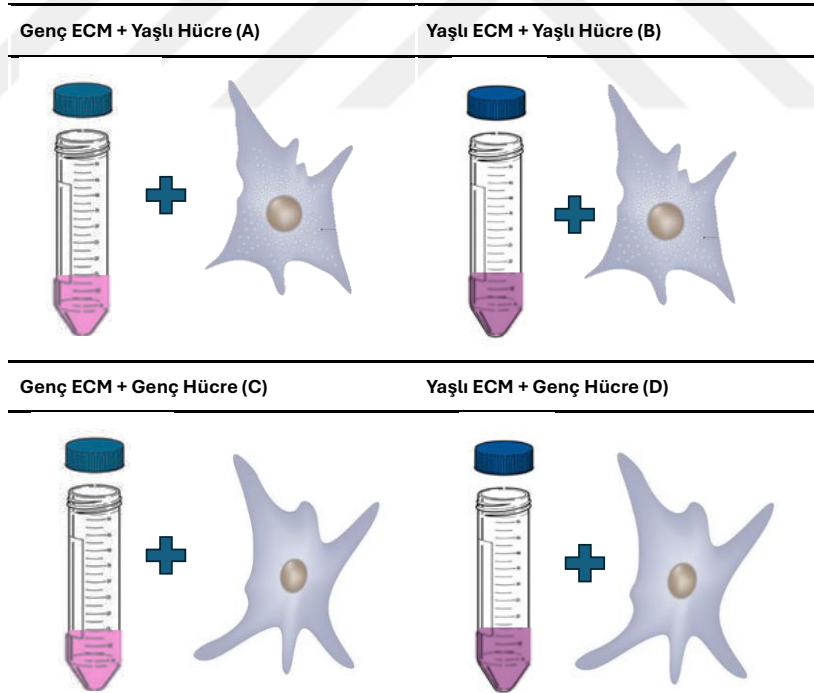
3.5.2. Hücre Yüklü Hidrojel Hazırlanması

Ekstrasellüler matriksin hücre yaşlanması üzerindeki etkisinin 3B hücre kültürü temelli modelle değerlendirmek amacıyla kültüre edilen erken (35) ve geç (61) pasaj fibroblast hücreleri, besiyerinden uzaklaştırıldıktan sonra iki kez PBS ile yıkandı. Hücreler, tripsin ile inkübe edilerek ortamdan ayrıldı, santrifüj yapıp süpernatant atıldı ve ardından %10 FBS içeren High Glucose DMEM besiyeri ile tekrar süspansiyon haline getirildi. Bu işlem sonrasında, 20 μ l hücre süspansiyonu ayrılarak hücre sayımı yapıldı ve hücre konsantrasyonu 1.5×10^6 hücre/mL olarak belirlendi. Stok halinde muhafaza edilen asidik Hücresizleştirilmiş ekstrasellüler matriks (dECM) hidrojel, pH 7.4'e getirilerek nötralizasyon

işlemi tamamlanmış ve hücrelerle karıştırılmaya uygun hale getirilmiştir. Viskozite düşüklüğü ve yetersiz jelleşme özellikleri göz önünde bulundurularak, çalışmalar doğrultusunda uygun görülen %4'lük aljinat ile 1:1 oranında homojen bir karışım elde edilmiştir. Jelleşme tamamlandığında, hücre yüklü hidrojel oluşturmak için kabarcık oluşumundan kaçınılarak dikkatlice pipetle 5:1 oranında hidrojel hücre karışımı hazırlandı. Biyoyazıcı sistemine uygun formda hazırlanmış olan hücre yüklü hidrojeller 3 ml'lik pnömatik tüplere aktarılmıştır.

Dört farklı kombinasyon üzerinde çalışmalar yürütülmüş ve her bir grup, daha kolay tanımlanabilmesi amacıyla harflerle adlandırılmıştır. İlerleyen bölümlerde, gruplar bu harfler ile ifade edilecektir (Şekil 3.7.).

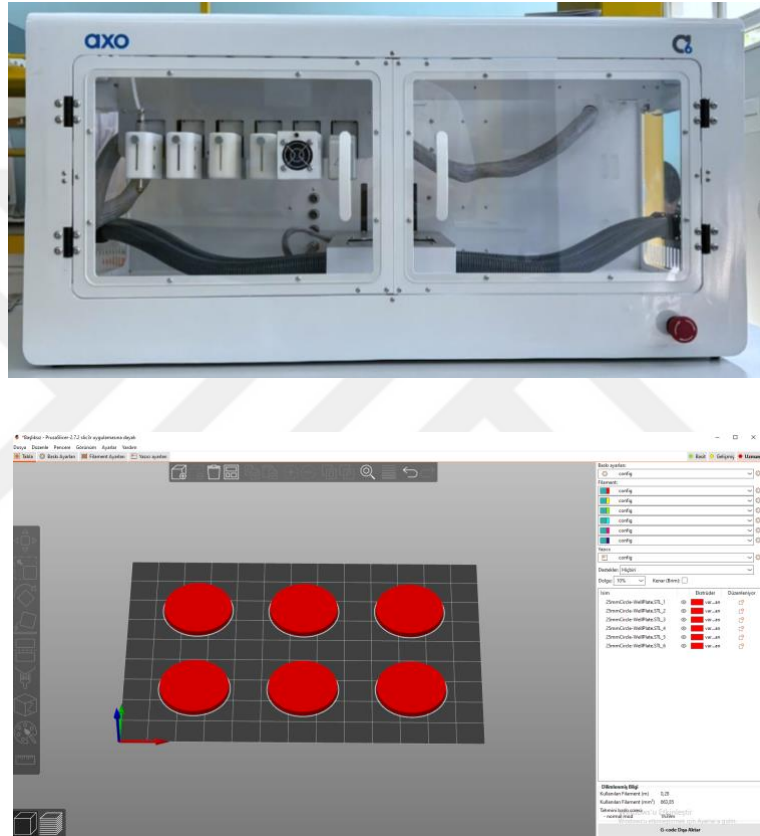
- **A:** Genç ECM + Yaşlı Fibroblast
- **B:** Yaşlı ECM + Yaşlı Fibroblast
- **C:** Genç ECM + Genç Fibroblast
- **D:** Yaşlı ECM + Genç Fibroblast



Şekil 3.7. Genç ve yaşlı ECM ile fibroblast kombinasyonlarını gösteren deneysel grup şeması

3.5.3. Üç Boyutlu Biyoyazıcı Sistemi

Tez çalışması süresince hücre yüklü hidrojel, ekstrüzyon tabanlı üç boyutlu biyoyazıcı sistemi Axo A6 Bioprinting System ile basılmıştır, hücre yüklü hidrojel bilgisayar destekli PrusaSlicer yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. Yapıların boyutları 25 mm x 25 mm x 1 mm olarak belirlenmiş ve biyobasım sonucunda her kuyucuk için üç dairesel katman şeklinde ekstrüde edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Üç Boyutlu Biyoyazıcı Sistemi ve Tasarımı

3.5.4. Üç Boyutlu Biyobasım Süreci

Steril koşullarda hazırlanan hücre yüklü biyomürekkep, 3 ml'lik pnömatik şırıngaya dikkatlice yerleştirildikten sonra, baskı öncesi hava kabarcıklarının tamamen giderilmesine özen gösterilmiştir. Ardından, 0.41 mm iç çapa sahip 22 G iğne şırınganın ucuna takılmış ve şırınga, basınç kontrollü ekstrüzyon kafasına sabitlenmiştir. Biyoyazıcı tablasına, 6 oyuklu plaka yerleştirilmiş, kalibrasyon ve yazıcının yönlendirilmesi Repetier-Host yazılımı ile yapılmıştır. Baskı parametreleri optimize edilerek, oda sıcaklığında ve 100 hızla, nihai yüksekliği 1 mm olan 3 katmanlı dermal yapılar basılmıştır. Baskı sonrası yapılar, iki aşamalı

bir çapraz bağlanma işlemine tabi tutulmuştur. İlk aşamada, dECM jeli 37°C’de inkübe edilerek jelleşme ve çapraz bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada ise yapılar, 1 M CaCl₂ çözeltisinde 15 dakika bekletilerek iyonik çapraz bağlanma sağlanmış, sonrasında Ca²⁺ ve Mg²⁺ içeren PBS ile iki kez yıkanarak inkübasyon aşamasına alınmıştır. Deneyler, 0., 3., 7. ve 10. günlerde analiz edilecek şekilde planlanmıştır (şekil 3.9).



şekil 3.9. dECM Hidrojelin şırınga İçerisindeki Görüntüsü

3.5.5. Biyobasım İnkübasyon Süreci

Üç boyutlu yapılar, PBS ile yıkama işlemi sonrasında, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin ile desteklenmiş High Glucose DMEM ortamına aktarılmış ve 37°C, %5 CO₂ koşullarında 10 gün süreyle inkübe edilmiştir.

3.5.6. Örneklerin Toplanması

Üç boyutlu hücre yüklü hidrojeller, basım işlemi sonrası 0., 3., 7. ve 10. günlerde örneklendi ve -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.5.7. RNA İzolasyonu

Dört gruptan alınan örnekler, RT-PZR analizleri için belirlenen zaman noktalarında (0., 3., 7. ve 10. günlerde) toplanmış ve biyolojik aktivitenin korunması amacıyla çalışma

gününe kadar -80°C 'de saklanmıştır. RNA izolasyonu sırasında yüksek verimli ve saf RNA elde etmek için Trizol reaktifi kullanılmıştır.

1. Örneklerin her biri 15 ml'lik tüplere alınarak 1000 μL Trizol ile muamele edilmiştir.
2. Hidrojelin Trizol içerisinde parçalanmasını sağlamak için pipetaj işlemi yapılmıştır.
3. Örnekler, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
4. Her 1 mL Trizol başına 0.2 mL kloroform eklenmiştir.
5. Kloroform eklendikten sonra, örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
6. Ardından, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $12,000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonrası tüplerde üç faz oluşmuştur: üst faz (RNA içeren), ara faz (DNA içeren) ve alt faz (protein içeren).
8. RNA'nın bulunduğu üst faz, dikkatlice çekilerek Eppendorf tüplere aktarılmıştır.
9. Lizis için kullanılan 1 mL Trizol reaktifi başına, RNA içeren sulu faza 0.5 mL izopropanol eklenmiştir.
10. Örnekler, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
11. İnkübasyon sonunda, örnekler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $12,000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
12. RNA içeren faz, 1:1 oranında %75'lik etanol ile yeniden süspanse edilmiştir.
13. Süspanse edilen faz, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $7500 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
14. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atılmıştır.
15. RNA'larda kontaminasyonu önlemek için, pellet %75'lik etanol ile iki kez yıkanmıştır.
16. RNA pelleti, 10 dakika boyunca hava ile kurutulmuştur.
17. Her pellet, 20 μL RNase içermeyen su solüsyonu ile yukarı ve aşağı doğru pipetleme yapılarak tekrar süspanse edilmiştir.
18. İzolasyonu tamamlanan RNA'lar, bir sonraki aşamaya kadar -80°C 'de saklanmıştır.

Bu işlem, tüm örnekler için tekrarlanmıştır.

3.5.8. Konsantrasyon Ölçümü

Saf RNA örneklerinin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla NanoDrop cihazı kullanılmıştır. İlk olarak, NanoDrop cihazına 1 µL RNAaz içermeyen su eklenerek cihazın sıfırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, elde edilen saf RNA örneklerinden 1 µL alınarak NanoDrop cihazında RNA konsantrasyonunun ölçümü yapılmıştır. Elde edilen RNA konsantrasyon değerlerine dayanarak, uygun cDNA sentezi için gerekli hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

3.5.9. cDNA Sentezi

RNA örneklerinin cDNA'ya dönüştürülmesi işlemi, Abmgood markalı OneScript Plus cDNA Synthesis kiti ve BIO-RAD markalı Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm süreç, üretici firmanın önerdiği protokole uygun şekilde yürütülmüştür. Enzimlerin aktivitesini korumak ve reaksiyonların doğruluğunu sağlamak amacıyla tüm malzemeler buz üzerinde muhafaza edilmiştir. cDNA sentezi için kullanılacak toplam RNA örnekleri, cDNA MasterMix ile karıştırılarak hazırlanmıştır; bu işlem ayrıntılı olarak Tablo 3.1'de sunulmuştur. cDNA sentezi tamamlandıktan sonra, elde edilen örnekler -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1. cDNA Sentezi: Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları.

5x RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Random Primer	1 µl
RTase	1 µl
Total RNA	1000 ng
RNase içermeyen su	20 µl'yi tamamlayacak kadar

3.5.10. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) İşlemi

Deneysel çalışmaların 0., 3., 7. ve 10. günlerinde alınan örneklerden izole edilen RNA, OneScript® Plus cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. Hedef genin

ifade seviyeleri, CFX96 Touch Real-Time PCR cihazında BlasTaq™ 2X qPCR Master Mix ile gerçekleştirilen GZ-PZR yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. GZ-PZR işlemi öncesinde, GZ-PZR reaksiyon karışımının içeriği hazırlanmıştır; bu içerik ayrıntılı olarak tablo 3.2'de sunulmuştur.

Tablo 3.2. GZ-PZR Reaksiyon Karışımı İçeriği.

SYBR Green PCR Mastermix	5 µl
cDNA	1000 ng
Forward Primer	0.25 µl
Reverse Primer	0.25 µl
RNase içermeyen su	3.5 µl

GZ-PZR işlemi, gen ifade düzeylerini belirlemek amacıyla Bio-Rad Real Time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GZ-PZR deneyinde kullanılan spesifik termal döngü koşulları, Tablo 3.3'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Tablo 3.3. GZ-PZR Termal Döngü Koşulları.

Döngü	Sıcaklık	Süre	40 DÖNGÜ
Ön Denatürasyon	95°C	3 dakika	
Denatürasyon	95°C	15 saniye	
Primer Bağlanması	60°C	15 saniye	
Uzama	72°C	45 saniye	

GZ-PZR analizi için referans gen olarak β -actin (ACTB) kullanılmıştır. Bu genin sabit ifadesi, diğer hedef genlerin relatif ifade seviyelerinin doğru bir şekilde karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır. Analizde incelenen hedef genler arasında p53 (tümör protein p53), COL1A1 (Kolajen Tip I Alfa 1 Zinciri), MMP1 (matris metalloproteinaz 1), GLB1 (beta galaktosidaz 1), SIRT1 (Sirtuin 1), ve NF-kB (Nükleer faktör-kappa-B) bulunmaktadır. Bu genlerin primer dizileri, Tablo 3.4'te ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Tablo 3.4. GZ-PZR'da Kullanılan Primer Dizileri.

Sembol	Gen	Baz Dizilimi (5'→3')
P53	Tümör Protein p53	F:5'CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG3' R:5'TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC3'
COL1A1	Kollajen1	F:5'GATTCCCTGGACCTAAAGGTGC 3' R:5'AGCCTCTCCATCTTTGCCAGCA 3'
MMP1	Matris Metalloproteinaz 1	F:5'ATGAAGCAGCCCAGATGTGGAG3' R:5'TGGTCCACATCTGCTCTTGGA3'
GLB1	Beta Galaktosidaz 1	F:5'CACTCCACAATCAAGACCGAAGC3' R:5'CTGTGCTGCATAGGGTGAGTTG3'
SIRT1	Sirtuin 1	F:5'TAGACACGCTGGAACAGGTTGC3' R:5'CTCCTCGTACAGCTTCACAGTC3'
NF-kB	Nükleer Faktör NF-kappa-B	F:5'GCAGCACTACTTCTTGACCACC3' R:5'TCTGCTCCTGAGCATTGACGTC3'
ACTB	β -Actin	F:5'CACCATTGGCAATGAGCGGTTC3' R:5'AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT3'

F:Forward, R: Reverse

3.8. İstatistiksel Analiz

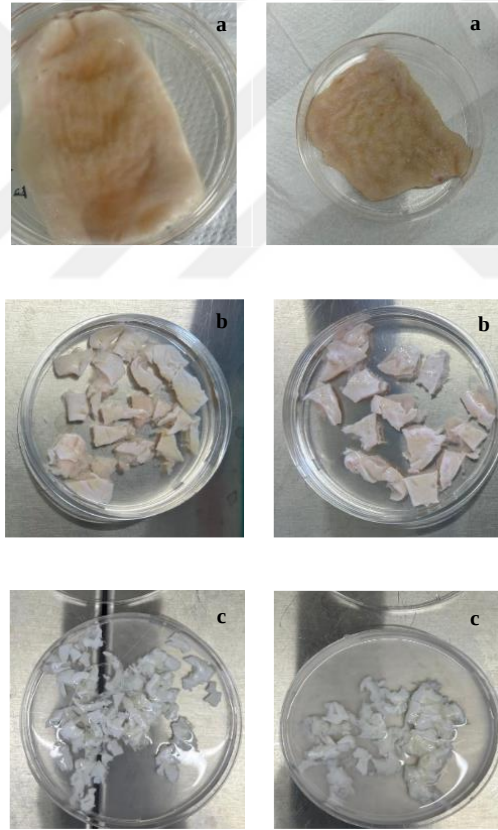
Analiz sonucunda elde edilen Ct değerleri kullanarak gen ifadesindeki değişiklikler ΔCt yöntemi ile hesaplanmıştır. Elde edilen veriler, gen ifadesindeki kat değişimini göstermek amacıyla $2^{(-\Delta Ct)}$ matematiksel formülü doğrultusunda değerlendirilmiştir. Kat değişimi, ilgili genin ifadesinin kontrol grubuna kıyasla ne kadar arttığını veya azaldığını ifade etmektedir. İstatistiksel anlamlılık, Student'ın t testi kullanılarak hesaplanmış ve anlamlılık eğiğı $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ olarak belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Hücresizleştirme Protokolünün İşlemi ve Doğrulanması

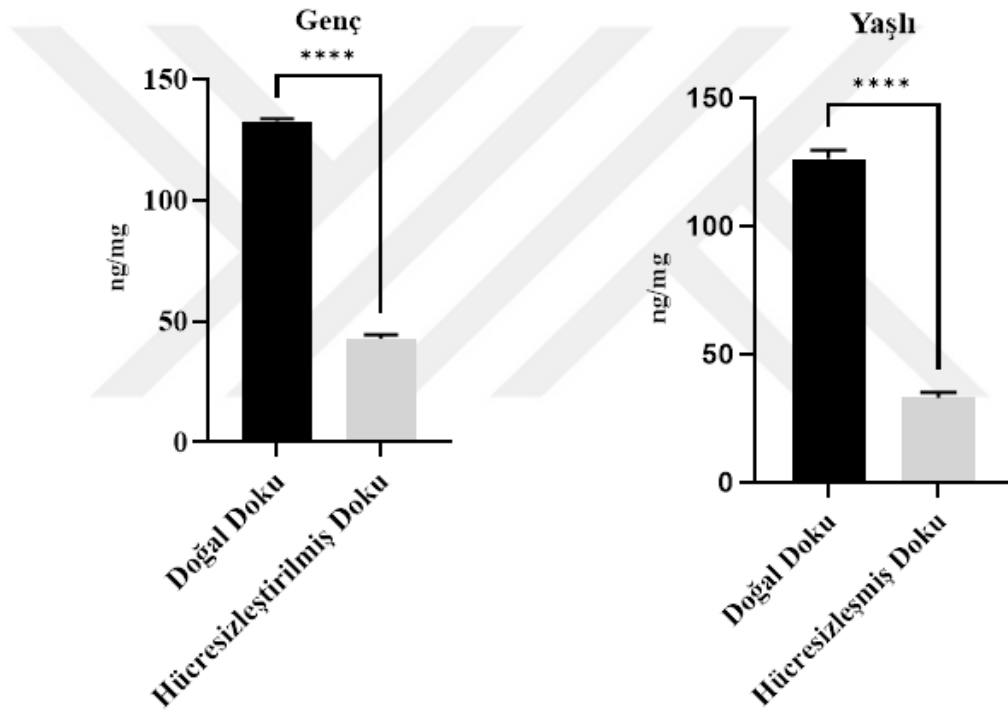
Çalışma kapsamında, genç ve yaşlı sıçan deri dokularının hücresizleştirilmesi için en uygun protokol uygulanmıştır. Soğuk zincir ile laboratuvara ulaştırılan deri doku örnekleri, epidermis ve hipodermis tabakalarından ayrıştırılarak küçük parçalara bölünmüştür. Hücresizleştirme işlemi sonrasında, dış doku görünümünde beklenen değişiklikler gözlemlenmiş ve dokunun doğal renginin tamamen kaybolmasıyla, hücresizleştirmenin bir göstergesi olan beyaz renk elde edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Hücresizleştirme Protokolünün Süreci

4.1.1. DNA Miktarının Ölçümü

Protokolün doğrulanması amacıyla, uygulama sonrası elde edilen dokuların DNA miktarları, doğal doku DNA miktarlarıyla karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, genç ve yaşlı doğal dokuya ait DNA miktarları sırasıyla $126,3 \pm 5$ ng/mg ve $132,7 \pm 7$ ng/mg olarak belirlenmiştir. Protokol uygulandıktan sonra, hücresizleştirilmiş genç ve yaşlı dokuların DNA miktarlarının sırasıyla $33,1 \pm 3$ ng/mg ve $42,8 \pm 8$ ng/mg'ye düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.).

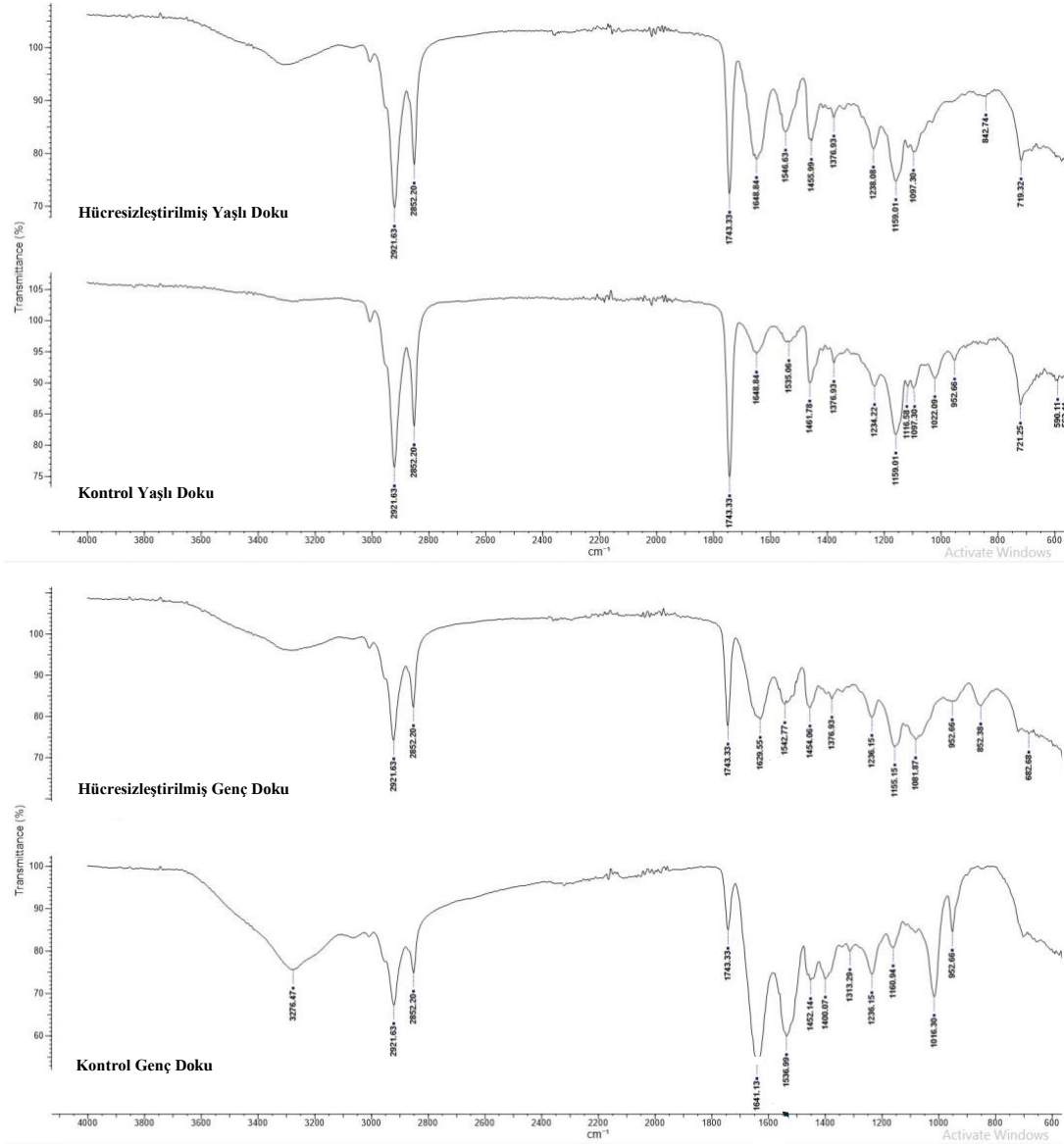


Şekil 4.2. DNA Miktarının Ölçülmesi

4.1.2. FTIR Analizi

Bu aşamada, üç boyutlu biyobaskılama işlemi için seçilen hücresizleştirilmiş genç ve yaşlı deri matrisinin (HDM), kimyasal bağ ve fonksiyonel grup içeriği açısından doğal doku ile benzerliğini ortaya koymak amacıyla Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri sonucunda elde edilen spektrumları incelendiğinde, hem yaşlı hem de genç deri dokularında belirli bölgelerde benzer özelliklerin korunduğunu göstermektedir.

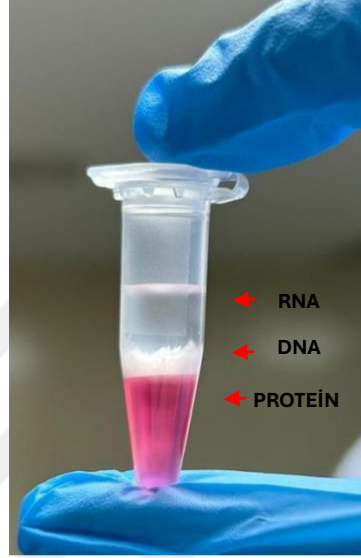
Hücresizleştirme işlemi öncesi ve sonrası elde edilen FTIR spektrumları incelendiğinde; her iki dokuda da 2900 cm^{-1} civarında bulunan lipid piklerinde kayda değer bir değişim bulunmamıştır. Amid I ve Amid II bölgelerinde ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ve $1500\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$) her iki doku tipinde de pik yoğunluklarında hafif azalmalar gözlemlenmiştir. Glikozaminoglikanlar (GAG) ve diğer karbonhidratlarla ilişkili $1030\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ bandında yaşlı dokuda hücresizleştirmeden sonra değişiklikler gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3. Genç ve Yaşlı Doğal doku ve HDM FTIR spektrumları

4.2.RNA İzolasyon Bulguları

Hidrojelden RNA izolasyonu, Trizol ile işleme tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonucunda üç ayrı faz oluşmuştur: üst faz RNA'yı, orta faz DNA'yı ve alt faz proteinleri içermektedir. Bu faz ayrımı, RNA'nın saf olarak elde edilmesine olanak tanımıştır.



Şekil 4.4. Trizol İzolasyonu Sonrası; RNA, DNA, ve Protein Fazlarına Ayrılmış Örnek.

Toplanan üst faz, santrifüj ile RNA çöktürülmüştür. Elde edilen RNA pelletleri, RNase-free çözeltisinde çözülerek saflaştırılmıştır.

4.2.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları (GZ-PZR)

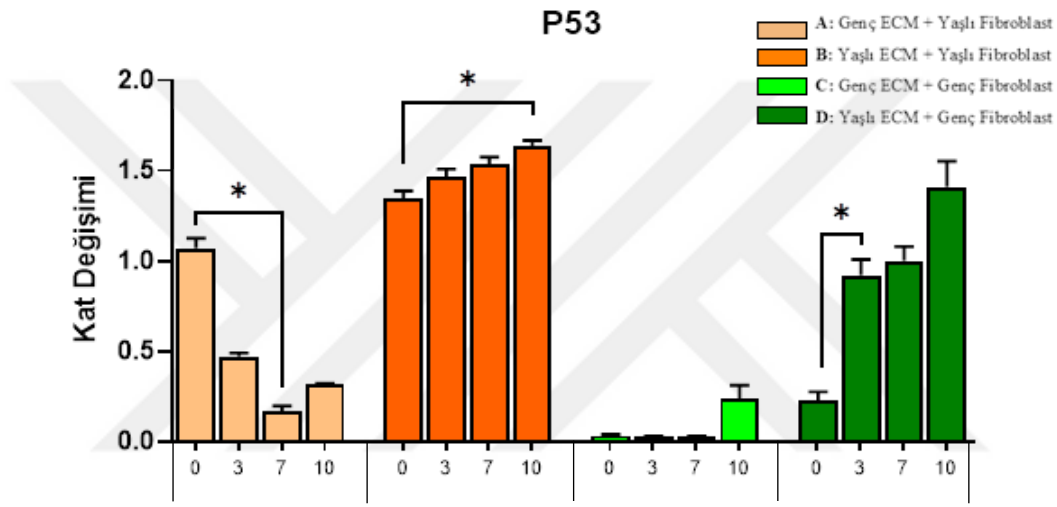
Dört farklı gruba ait örneklerin (A,B,C,D) 0., 3., 7. ve 10. günlerde elde edilen GZ-PZR sonuçları değerlendirilmiştir. Seçilen genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesinde referans gen olarak ACTB (β -actin) kullanılmıştır.

4.2.2. Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) deneylerinden elde edilen sonuçlar, ortalama değerler $\pm$ SD olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizlerde p-değeri kullanılmış ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.2.2.1.GZ-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Genç ve yaşlı ECM ortamında kültüre edilen yaşlı ve genç hücrelerde, günlere bağlı olarak p53 geninin ekspresyon seviyesi incelenmiştir. A grubunda, p53 ekspresyon seviyesinde 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (p:0,013). B grubunda ise 10. günde, 0. güne kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p:0,012). C grubunda, 10. günde p53 ekspresyon seviyesinde bir artış gözlenmiş olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0,056). D grubunda ise 3. günde, 0. güne kıyasla anlamlı bir artış saptanmıştır (p:0,013).

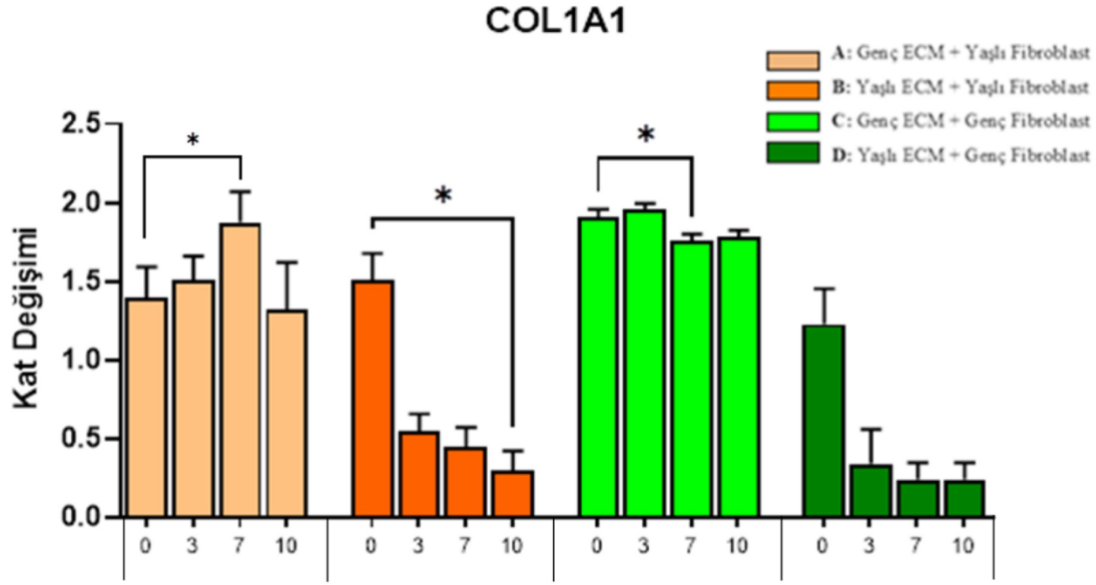


Şekil 4.5. A, B, C ve D gruplarında bulunan fibroblast hücrelerinde p53 gen ifadesinin 0., 3., 7. ve 10. günlerdeki değişiminin incelenmesi.

Yaşlı hücrelerin p53 ekspresyon seviyesi A grubunda B grubuna göre %66,1 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Öte yandan genç hücrelerin D grubunda C grubuna göre p53 ekspresyon seviyeleri %91 oranında artmıştır.

Genç ve yaşlı ECM ortamında kültüre edilen yaşlı ve genç hücrelerde, günlere bağlı olarak COL1A1 geninin ekspresyon seviyesi incelenmiştir. Genç ve yaşlı ECM ortamında kültüre edilen yaşlı ve genç hücrelerde, günlere bağlı olarak COL1A1 geninin ekspresyon seviyesi incelenmiştir. A grubunda 7. günde, 0. güne göre COL1A1 ekspresyon seviyesinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p:0,021). B grubunda 10. günde, 0. güne göre anlamlı bir azalma saptanmıştır (p:0,032). C grubunda 7. günde, 0. güne göre anlamlı bir azalma görülmüştür (p:0,046). D grubunda ise 3. günde, 0. güne göre

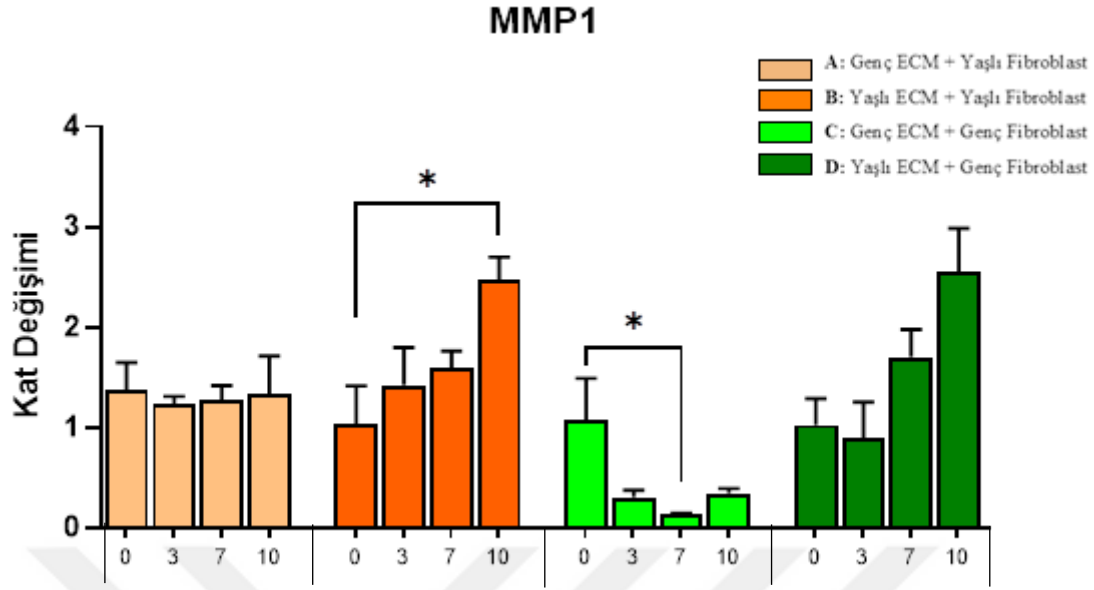
belirgin bir azalma gözlenmiş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0,526).



Şekil 4.6. A,B,C ve D gruplarında bulunan fibroblast hücrelerinin COL1A1 gen ifadesinin 0., 3., 7. ve 10. günlerdeki değişiminin incelenmesi.

Yaşlı hücrelerin COL1A1 ekspresyon seviyesinin, A grubunda B grubuna kıyasla %53,9 oranında arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, genç hücrelerin D grubunda C grubuna göre COL1A1 ekspresyon seviyelerinde %59 oranında bir azalma görülmüştür.

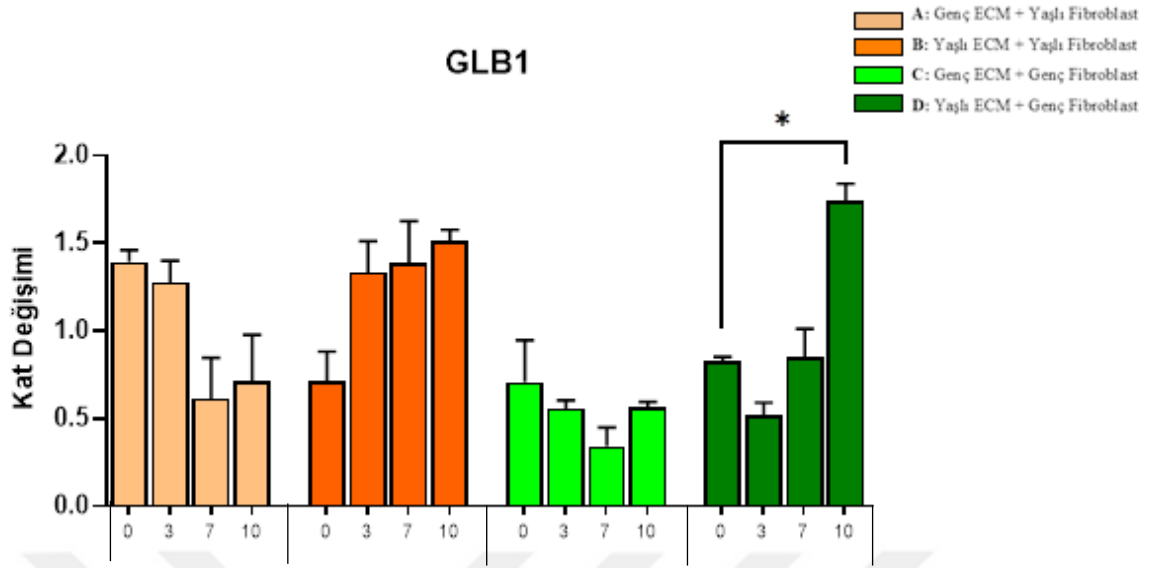
Genç ve yaşlı ECM ortamında kültüre edilen yaşlı ve genç hücrelerde, günlere bağlı olarak MMP1 geninin ekspresyon seviyesi incelenmiştir. A grubunda 7. günde 0. güne kıyasla bir azalma gözlemlenmiştir ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır (p:0,9). B grubunda ise, 10. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (p:0,032). C grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (p:0,012). D grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla artış gözlemlenmiştir ancak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p:0,076).



Şekil 4.7. A,B,C ve D gruplarında bulunan fibroblast hücrelerinin MMP1 gen ifadesinin 0., 3., 7. ve 10. günlerdeki değişiminin incelenmesi

A grubunda yaşlı hücrelerde MMP1 ekspresyon seviyesinin B grubuna göre %20,1 oranında düştüğü saptanmıştır. Öte yandan, genç hücrelerde D grubunda C grubuna kıyasla MMP1 ekspresyon seviyelerinde %70'lik bir artış gözlemlenmiştir.

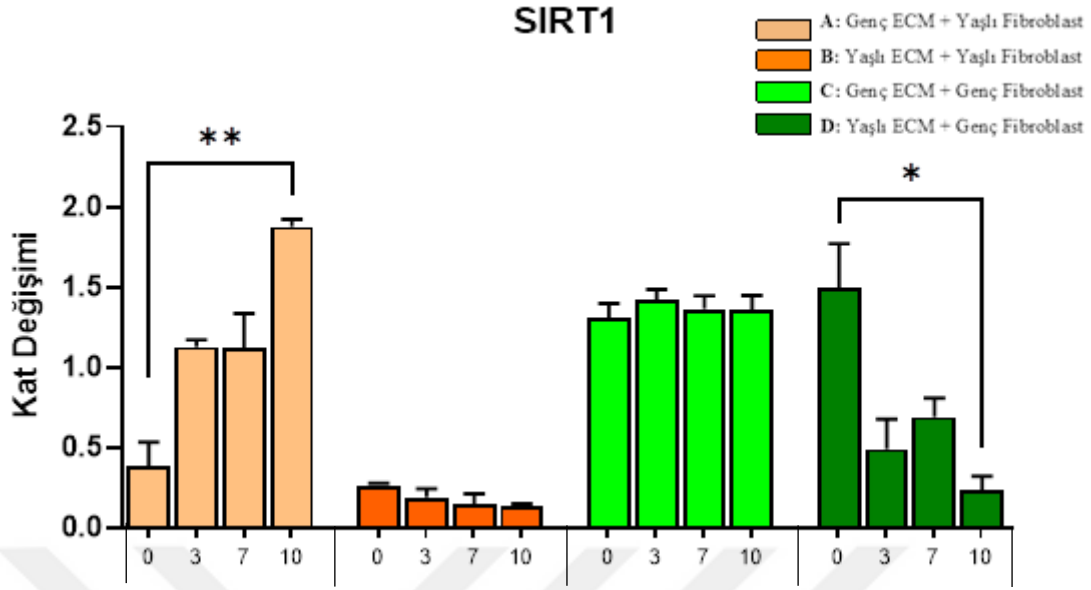
Genç ve yaşlı ECM ortamında kültüre edilen yaşlı ve genç hücrelerde, günlere bağlı olarak GLB1 geninin ekspresyon seviyesi incelenmiştir. A grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla belirgin bir azalma gözlemlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p:0,064$). B grubunda 0. güne kıyasla bir artış tespit edilmiştir ancak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p:0,055$). C grubunda 7. günde 0. güne göre bir azalma gözlenmiş olsa da anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p:0,09$). D grubunda ise 10. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p:0,013$).



Şekil 4.8. A,B,C ve D gruplarında bulunan fibroblast hücrelerinin GLB1 gen ifadesinin 0., 3., 7. ve 10. günlerdeki değişiminin incelenmesi

Yapılan incelemede, yaşlı hücrelerde GLB1 ekspresyon seviyesinin A grubunda B grubuna oranla %33,49 azaldığı tespit edilmiştir. Buna karşılık, genç hücrelerde D grubunun B grubuna göre GLB1 ekspresyon seviyelerinde %56'lık bir artış olduğu görülmüştür.

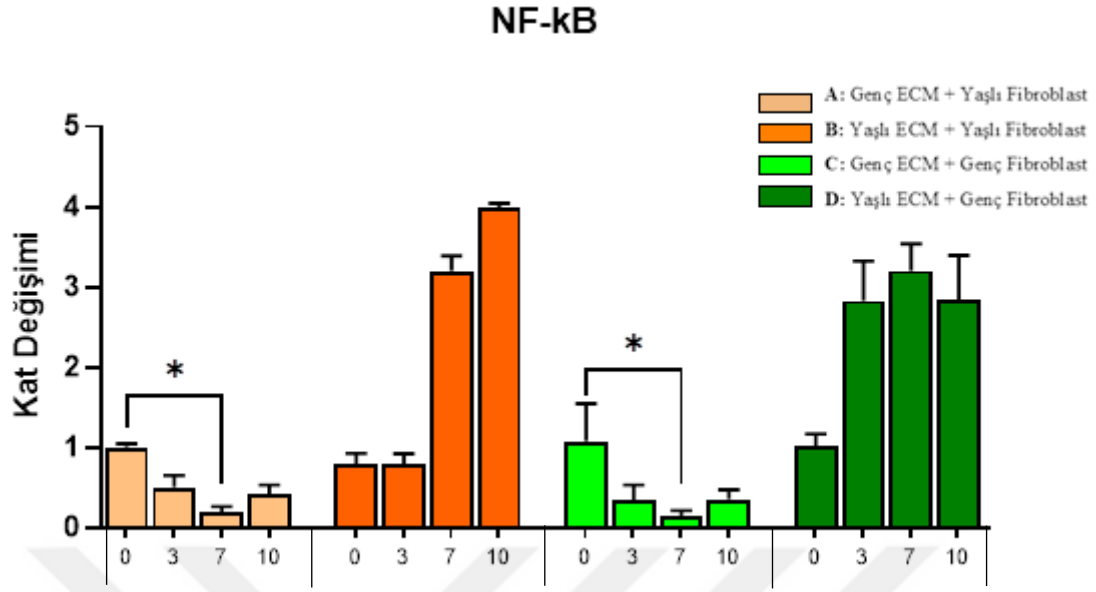
Genç ve yaşlı ECM ortamında kültüre edilen yaşlı ve genç hücrelerde, günlere bağlı olarak SIRT1 geninin ekspresyon seviyesi incelenmiştir. A grubunda 10. günde 0. güne göre artış görülmüştür ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır ($p:0,005$). B grubunda ise 10. günde en düşük ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir ($p:0,066$). C grubunda 0. Güne göre anlamlı bir değişim bulunmamıştır ($p:0,42$). D grubunda ise 10. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p:0,019$).



Şekil 4.9. A,B,C ve D gruplarında bulunan fibroblast hücrelerinin SIRT1 gen ifadesinin 0., 3., 7. ve 10. günlerdeki değişiminin incelenmesi

Sonuçlar, yaşlı hücrelerde A grubunda SIRT1 ekspresyon seviyesinin B grubuna kıyasla %83,78 oranında arttığını göstermektedir. Genç hücrelerde ise D grubunun B grubuna göre SIRT1 ekspresyon seviyelerinde %46,66 oranında bir azalma kaydedilmiştir.

Genç ve yaşlı ECM ortamında kültüre edilen yaşlı ve genç hücrelerde, günlere bağlı olarak NF-kB geninin ekspresyon seviyesi incelenmiştir. A grubunda 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p:0,013$). B grubunda ise, 10. günde 0. güne kıyasla en fazla artış gözlemlenmiş ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır ($p:0,055$). C grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p:0,019$). D grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla artış gözlemlenmiştir ancak anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p:0,088$).



Şekil 4.10. A, B, C ve D gruplarında bulunan fibroblast hücrelerinin NF-kB gen ifadesinin 0., 3., 7. ve 10. günlerdeki değişiminin incelenmesi

Yaşlı hücrelerde NF-kB ekspresyon seviyesi, A grubunda B grubuna göre %75,75 azalma göstermiştir. Genç hücrelerde ise, D grubunda C grubuna kıyasla NF-kB ekspresyon seviyelerinde %80,68 oranında bir artış olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Hücrel yaşlanma, hücrelerin normal işlevlerini sürdürebilmesi için gerekli biyokimyasal yolların bozulması ve çoğalma yeteneklerinin azalmasıyla karakterize edilen karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle tetiklenir ve doku homeostazının bozulmasına yol açar. Doku homeostazındaki bozulmalar, hücrel yaşlanmanın tetikleyicisi olabileceği gibi, yaşlanma sürecinin ilerlemesinde de önemli bir rol oynayabilir. Bu bağlamda, ekstraselüler matriks (ECM), hücrelere yapısal destek sağlamak ve biyokimyasal sinyalleri düzenlemek açısından önemli bir bileşendir. ECM'nin yaşlanma sürecindeki rolü, hücrel yaşlanma mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir. Çalışmamızda, genç ve yaşlı deri dokusundan elde edilen hücresizleştirilmiş ekstraselüler matriks (dECM) hidrojelleri kullanılarak, yaşlı ve genç hücreler için üç boyutlu (3B) bir mikroçevre modeli oluşturulmuştur. Bu modelde, ECM'nin yaşlanma sürecindeki rolü ve yaşlanma sürecini tersine çevirme potansiyeline etkisi incelenmiştir. FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) ve DNA analizleri ile dECM'nin DNA miktarı ve yapısal bütünlüğü doğrulanmıştır. Bu çalışmada, dört farklı deneysel grup oluşturulmuştur: Grup A, genç ECM içinde yaşlı fibroblastları; Grup B, yaşlı ECM içinde yaşlı fibroblastları; Grup C, genç ECM ile genç fibroblastları; ve Grup D, yaşlı ECM ile genç fibroblastları tanımlamaktadır. Çalışmamızda, bu dört grubun uzun ömüre katkı sağlayan ve yaşlanmaya etki eden SIRT1, p53, GLB1, COL1A1, NF- κ B ve MMP1 genlerinin ekspresyon ifadeleri, RT-PZR yöntemiyle analiz edilmiştir. Gen ekspresyonu, 0, 3, 7 ve 10. günlerde değerlendirilmiş ve bu genlerin yaşlanma sürecine olan etkileri incelenmiştir.

Hücresizleştirme sürecinde, hücrel bileşenlerin etkin bir şekilde uzaklaştırılması ve ekstraselüler matriks (ECM) yapısının korunması, başarılı bir biyomateryal üretimi için kritik bir aşamadır. Bu sürecin değerlendirilmesinde, FTIR ve DNA analizi olmak üzere iki ana teknik kullanılmaktadır. FTIR, materyallerin kimyasal bileşenlerini ve yapısal değişikliklerini belirlemek için kullanılır. DNA analizi ise hücrel yapıları değerlendirmek ve hücresizleştirme sürecinde DNA kalıntılarının miktarını ölçmek amacıyla kullanılmaktadır. Çalışmamızda, doğal dokulardaki DNA miktarı, genç dokularda $126,3 \pm 5$ ng/mg ve yaşlı dokularda $132,7 \pm 7$ ng/mg olarak ölçülmüştür. Hücresizleştirme protokolü sonrası ise, genç dokularda DNA miktarı $33,1 \pm 3$ ng/mg, yaşlı dokularda ise $42,8 \pm 8$ ng/mg olarak

belirlenmiştir. Bu sonuçlar, yaşlı dokularda daha fazla DNA kalıntısının kaldığını göstermektedir. FTIR spektrum analizleri, hücresizleştirme işlemi öncesi ve sonrası elde edilen incelendiğinde; her iki dokuda da 2900 cm^{-1} civarında bulunan lipid piklerinde kayda değer bir değişim bulunmamıştır. Amid I ve Amid II bölgelerinde ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ve $1500\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$) her iki doku tipinde de pik yoğunluklarında hafif azalmalar gözlemlenmiştir. Glikozaminoglikanlar (GAG) ve diğer karbonhidratlarla ilişkili $1030\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ bandında yaşlı dokuda hücresizleştirmeden sonra değişiklikler gözlemlenmiştir. Yaşlı deri dokusundan elde edilen ECM'nin hücresizleştirilmesi sonrasında gözlemlenen protein yapısı bozulmaları ve GAG birikintileri, hidrojel üretim süreçlerini moleküler düzeyde etkileyebilir. GAG'lar, ekstrasellüler matriksin yapısal bütünlüğünü bozarak dokuların biyomekanik özelliklerini değiştirebilir. Bu durum, hücre-matriks etkileşimlerini sınırlayarak hücre göçünü ve doku entegrasyonunu zorlaştırabilir. Ayrıca, yaşlanmış ECM'nin sertleşen yapısı, hidrojellerin mekanik özelliklerini zayıflatabilir ve biyolojik uyumlarını olumsuz etkileyebilir. Bu etkileri azaltmak ve hidrojellerin biyolojik ve mekanik verimliliğini artırmak amacıyla çalışmamızda aljinat kullanılmıştır. Aljinat, matriksin mekanik özelliklerini iyileştirmeye yardımcı olmuştur. Olson ve arkadaşlarının (2021) yaptığı bir çalışmada, farklı yaş gruplarındaki (1, 2 ve 20 aylık) fare iskelet kasları incelenmiştir. Çalışmada, yaşlı kaslardan elde edilen ekstrasellüler matrikste (ECM), genç dokularla karşılaştırıldığında, hücresizleştirme işlemi sırasında yapısal kayıpların daha belirgin hale geldiği tespit edilmiştir. Ayrıca, bu kayıpların glikozaminoglikan (GAG) birikimiyle ilişkili olduğu ve kolajen yapısının bozulması nedeniyle jelleşme oranının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Olson ve ark., 2021). Olson ve arkadaşlarının bildirdiği sonuçlar, çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verileri destekler niteliktedir. Bulgularımız, yaşa bağlı hücresizleşmiş ECM'deki değişikliklerin hidrojel üretimindeki dezavantajların neden olabileceği düşünülmektedir.

p53, hücre döngüsünü düzenleyen ve hücre stresine yanıt olarak önemli rol oynayan bir tümör baskılayıcı genidir. Çalışmamızda, genç ve yaşlı ECM ortamlarında kültüre edilen yaşlı ve genç hücrelerde, günlere bağlı olarak p53 geninin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. A grubunda, p53 ekspresyon seviyesinde 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p:0,013$). B grubunda ise 10. günde, 0. güne kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p:0,012$). C grubunda, 10. günde p53 ekspresyon seviyesinde bir artış gözlenmiş olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p:0,056$). D grubunda ise 3. günde, 0. güne kıyasla anlamlı bir artış saptanmıştır ($p:0,013$). Yaşlı hücrelerin p53 ekspresyon seviyesi A grubunda, B grubuna kıyasla %66,1 oranında azalmıştır. Genç

hücrelerin ise D grubunda, C grubuna kıyasla p53 ekspresyon seviyeleri %91 oranında artmıştır. Choi ve arkadaşlarının çalışmasında, replikatif olarak yaşlanmış insan diploid fibroblast hücreleri ve genç fibroblast hücreleri kullanılarak yapılan deneyin 14. gününün sonunda, genç ECM ortamında p53 gen ekspresyonunun daha yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan, genç fibroblastlar yaşlı ECM üzerinde kültüre edildiğinde, hücrelerin çoğalma sürelerinde belirgin bir gecikme olduğu bildirilmiştir (Choi ve ark., 2010) Literatürdeki bu çalışma, elde ettiğimiz verileri desteklemektedir. Bulgularımız, genç ECM'nin yaşlanmış hücrelerde p53 ekspresyonunu azaltarak genç fenotipi geri kazandırdığı, yaşlı ECM ise hücrelerin proliferasyonunu engellediği ve p53 ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir.

SIRT1, Sirtuin ailesine ait, NAD⁺-bağımlı bir deasetilaz enzimidir ve hücrel stres yanıtları, metabolizma, yaşlanma ve hücrel farklılaşma gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenler. Ayrıca, SIRT1'in p53 ve NF- κ B üzerindeki etkileri, ECM'nin dinamik dengesinin sağlanmasında ve hücrel çevrenin korunmasında önemli bir rol oynar. Çalışmamızda, SIRT1 gen ekspresyonunun günlere bağlı değişimi incelendiğinde, A grubunda 10. Günde 0. güne göre artış görülmüştür ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0,005). B grubunda ise 10. günde en düşük ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir ancak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p:0,066). C grubunda anlamlı bir değişim bulunmamıştır (p:0,42). D grubunda ise 10. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (p:0,019). Yaşlı hücrelerde A grubunun SIRT1 ekspresyon seviyesinin B grubuna kıyasla %83,78 oranında arttığı, genç hücrelerde ise D grubunun B grubuna kıyasla %46,66 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Sun ve arkadaşları (2021), genç (3 aylık) ve yaşlı (18 aylık) farelerin ilik hücrelerinden elde edilen genç ve yaşlı ECM üzerinde kültüre ettikleri mezenkimal kök hücrelerinin (MSC) SIRT1 ekspresyon seviyelerini incelediklerinde, 7. Günün sonunda genç ECM ortamında kültüre edilen MSC'lerin SIRT1 seviyelerinin, yaşlı ECM ortamında kültüre edilen MSC'lere kıyasla %30-50 oranında azaldığını bildirmişlerdir (Sun ve ark., 2011). Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışma elde ettiğimiz verileri destekler niteliktedir. Bulgularımız, SIRT1'in hücrel ve moleküler düzeyde ECM ile etkileşimini göstermektedir.

GLB1 (β -galaktozidaz 1), lizozomal bir enzim olup, glikanların parçalanmasında önemli bir rol oynar. Bu enzim, glikanların doğru şekilde metabolize edilmesini sağlayarak hücrelerin düzgün işlev görmesini destekler. Çalışmamızda GLB1 gen ekspresyon seviyesi incelendiğinde; A grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla belirgin bir azalma gözlemlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0,064). B grubunda ise 0. güne kıyasla bir artış

tespit edilmiştir fakat anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p:0,055$). C grubunda 7. günde 0. güne göre bir azalma gözlenmiş olsa da anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p:0,09$). D grubunda ise 10. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p:0,013$). Yaptığımız analizlerde, A grubunun GLB1 ekspresyon seviyesinin B grubuna oranla %33,49 azaldığı belirlenmiştir. Genç hücrelerde ise D grubunun GLB1 ekspresyon seviyelerinin C grubuna göre %56 oranında arttığı tespit edilmiştir. Chen ve arkadaşları, sitokimyasal boyama ile SA β -gal oranlarını değerlendirdiği çalışmasında, HUVEC'lerin (3. ve 4. pasaj) glikasyonlanmış kollajen (GC) ile kaplanmış tabakalarda 5 gün süreyle kültüre edilmesi sonucunda, SA β -gal pozitif hücrelerin oranının, doğal kolajen üzerinde kültüre edilen hücrelere kıyasla 2 kat arttığını bildirmişlerdir (Chen ve ark., 2002). Chen ve arkadaşlarının bulguları verilerimizle paralellik göstermekte olup ECM'nin GLB1 ifade düzeylerinin üzerindeki etkisi gösterilmiştir.

COL1A1 geni, hücre dışı matriste en fazla bulunan proteinlerden biri olan Tip I kolajenin sentezini sağlar ve bağ dokularının yapısal bütünlüğünün korunmasında önemli bir işlev üstlenir. ECM'nin etkisinde COL1A1 gen ekspresyonu incelendiğinde; A grubunda 7. günde, 0. güne göre COL1A1 ekspresyon seviyesinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p:0,021$). B grubunda 10. günde, 0. güne göre anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p:0,032$). C grubunda 7. günde, 0. güne göre anlamlı bir azalma görülmüştür ($p:0,046$). D grubunda ise 3. günde, 0. güne göre belirgin bir azalma gözlenmiş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p:0,526$). Yaşlı hücrelerin COL1A1 ekspresyon seviyesi, A grubunda B grubuna göre %53,9 oranında artmıştır. Genç hücrelerin ise D grubunda C grubuna göre COL1A1 ekspresyon seviyelerinde %59 oranında bir azalma görülmüştür. Varani ve arkadaşları, gerçekleştirdikleri çalışmada, hazırladıkları kollajen jelini kollajenaz enzimleri ile parçalamışlardır. Sağlam ve kısmen parçalanmış kolajen jellerine eklenen fibroblastların Tip I kolajenin ifade düzeyleri, 4. günde değerlendirilmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre, Tip I prokollajen ekspresyon düzeyleri, parçalanmış kolajende bulunan fibroblastların sağlam kolajende bulunan fibroblastlara kıyasla belirgin şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Varani ve ark., 2001). Varani ve arkadaşları elde ettiğimiz verileri desteklemekle birlikte bulgularımız ECM'nin kolajen üretiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

NF- κ B (Nuclear Factor kappa-B), hücrede iltihaplanma, hücre büyümesi ve immün yanıt gibi süreçleri düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür. SIRT1, NF- κ B'nin inaktivasyonunu desteklerken, yaşlanma sürecinde NF- κ B'nin aktive olması, ECM yıkımını

artıran MMP-1 gibi enzimlerin ekspresyonunu tetikler. NF- κ B ekspresyon seviyesi incelendiğinde, A grubunda 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0,013). B grubunda ise, 10. günde 0. güne kıyasla en fazla artış gözlemlenmiş ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır (p:0,055). C grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (p:0,019). D grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla artış gözlemlenmiştir ancak anlamlı bir fark elde edilememiştir (p:0,088). NF- κ B ekspresyon seviyesi, A grubunda B grubuna kıyasla %75,75 oranında azalma göstermiştir. Genç hücrelerde ise, D grubunda C grubuna kıyasla %80,68 oranında artış göstermiştir. Fafián-Labora ve arkadaşlarının (2021) çalışmasında, senesens indüklenmiş iRAS hücrelerinden ekstrasellüler veziküller (sEV) izole edilmiştir. Bu veziküllere, pro-inflamatuar sitokinler ve senesens hücrelerinden salınan moleküller eklenmiş ve HFFF2 alıcı hücrelerine aktarılmıştır. 7. günün sonunda, NF- κ B yolaklarının aktive olduğu, senesensin çevresel etkilerini yayarak SASP'nin tetiklendiğini bildirilmiştir (Fafián-Labora ve O'Loughlen, 2021). Fafián-Labora ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bulgularımızı desteklemektedir. Verilerimiz, NF- κ B aktivasyonunun ve ECM bozulmasıyla ilişkisini ortaya koyabilir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP) enzim ailesi üyeleri, bağ dokusunun bozunmasından ve çeşitli MMP'lerin transkripsiyonundan sorumludur ve esas olarak nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ve aktivatör protein 1 (AP-1) tarafından düzenlenir. Çalışmamızda günlere bağlı olarak MMP1 geninin ekspresyon seviyesi incelenmiştir. A grubunda 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır (p:0,9). B grubunda ise, 10. günde 0. güne kıyasla en fazla artış gözlemlenmiş ve anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p:0,032). C grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (p:0,012). D grubunda, 7. günde 0. güne kıyasla artış gözlemlenmiştir ancak anlamlı bir fark elde edilememiştir (p:0,076). MMP1 ekspresyon seviyesinin, A grubundaki yaşlı hücrelerde B grubuna göre %20,1 oranında düştüğü bulunmuştur. Öte yandan, genç hücrelerde D grubunda C grubuna kıyasla %70'lik bir artış gözlemlenmiştir. Priglinger ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, oksidatif stres ile indüklenen RPE (retinal pigmented epitelyum) hücrelerinin kolajen bozunumu araştırılmış ve yapılan kültürde MMP1 gen ifadesi 48. Saatte 10 kata artmış ve tip I kolajenin bozulmasına ECM'yi etkilediği bildirmiştir (Alge-Priglinger ve ark., 2009). Bulgularımız literatürle paralel olarak gösteriyor ki, ECM'nin yaşlanma sürecinde MMP-1 ekspresyonu ile ilişkisini göstermiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, ekstraselüler matriksin (ECM) biyokimyasal ve biyomekanik özellikleri aracılığıyla hücre yaşlanması süreçlerini etkileyebileceğini ve hücre fonksiyonlarını destekleyerek doku yenilenmesini teşvik edebileceğini göstermiştir. ECM'nin, özellikle SIRT1, p53, NF-κB, GLB1, COL1A1 ve MMP1 gibi yaşlanmayla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyebildiği tespit edilmiştir. Bu durum, ECM'nin yaşlanmayı yavaşlatma veya geri çevirme potansiyeline sahip olduğunu ve yaşlanma karşıtı terapiler için önemli bir temel oluşturabilir.

Üç boyutlu hücreleştirilmiş ECM (dECM) hidrojel kullanılarak oluşturulan modelimiz, hücrelerin *in vivo* mikroçevreye daha yakın koşullarda incelenmesine olanak sağlamıştır. Çalışmamız, ECM'nin genç özelliklerinin yaşlanmış hücrelere aktarılabilirliğini ve bu etkileşimin bazı genç fenotip özelliklerini geri kazandırabileceğini ortaya koymuştur.

Bununla birlikte, çalışmamız bazı sınırlamalara sahiptir. Öncelikle, kullanılan üç boyutlu kültür modeli, doğal doku mikroçevresinin tüm özelliklerini tam olarak yansıtamamaktadır. Ayrıca, dECM hidrojelinin bozunma eğiliminde olması, deneylerin yalnızca 10 gün boyunca sürdürülebilmesine olanak tanımış ve uzun süreli analizlerin yapılmasını kısıtlamıştır. Bu durum, uzun süreli etkilerin değerlendirilmesi açısından bir dezavantajdır. Daha dayanıklı veya kontrollü bozunma özelliklerine sahip biyomalzemelerin geliştirilmesi, gelecekteki çalışmalar için kritik öneme sahiptir.

İleri çalışmalarda, ECM'nin farklı bileşenlerinin yaşlanma süreçlerine olan uzun süreli etkilerinin incelenmesi önerilmektedir. Ayrıca, dECM modellerinin yaşlanmaya bağlı hastalıkların tedavisindeki potansiyelini değerlendiren preklinik ve klinik çalışmalar, bu alandaki bilimsel ilerlemeyi hızlandırabilir.

KAYNAKLAR

1. López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. ve Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), ss.1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
2. Hynes, R.O., 2009. The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957), ss.1216-1219. doi:10.1126/science.1176009
3. Frantz, C., Stewart, K.M. ve Weaver, V.M., 2010. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), ss.4195-4200. doi:10.1242/jcs.023820
4. Bonnans, C., Chou, J. ve Werb, Z., 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), ss.786-801. doi:10.1038/nrm3904
5. Baker, D.J. ve Petersen, R.C., 2018. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: Evidence and perspectives. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), ss.1208-1216. doi:10.1172/JCI95145
6. Gialeli, C., Theocharis, A.D. ve Karamanos, N.K., 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*, 278(1), ss.16-27. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x
7. Choi, H.J., Cho, Y.S., Park, Y.R. ve diğerleri, 2011. Integrin signaling and tumorigenesis: Mechanistic insights. *Cancer Metastasis Reviews*, 30(3-4), ss.503-514. doi:10.1007/s10555-011-9311-7
8. Conboy, M.J., Conboy, I.M. ve Rando, T.A., 2005. Heterochronic parabiosis: Historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging Cell*, 4(3), ss.133-136. doi:10.1111/j.1474-9726.2005.00165.x
9. Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D. ve d'Adda di Fagagna, F., 2021. Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), ss.75-95. doi:10.1038/s41580-020-00314-w

10. Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), ss.585-621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6
11. Herranz, N., Gil, J., 2016. Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), ss.1231-1241. doi:10.1172/JCI79191
12. Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), ss.1071-1078. doi:10.1038/nature08467
13. Galbiati, A., Beausejour, C. ve d'Adda di Fagagna, F., 2017. Cellular senescence and cellular aging. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(12), ss.765-776. doi:10.1038/nrm.2017.63
14. Mallette, F.A., Ferbeyre, G., 2007. The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle*, 6(15), ss.1831-1836. doi:10.4161/cc.6.15.4518
15. Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F. ve diğerleri, 2003. Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO Journal*, 22(16), ss.4212-4222. doi:10.1093/emboj/cdg417
16. Kamijo, T., Bodner, S., van de Kamp, E., Randle, D.H. ve Sherr, C.J., 1997. Tumor spectrum in ARF-deficient mice. *Cancer Research*, 57(17), ss.3623-3629.
17. d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L. ve diğerleri, 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), ss.194-198. doi:10.1038/nature02118
18. Hemann, M.T., Rudolph, K.L., Strong, M.A. ve diğerleri, 2001. Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 21(13), ss.4233-4245. doi:10.1128/MCB.21.13.4233-4245.2001
19. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., et al., 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), ss.349-352. doi:10.1126/science.279.5349.349

20. Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., et al., 2012. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology*, 14(4), ss.355-365. doi:10.1038/ncb2466
21. Bae, N.S., Baumann, P., 2007. A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. *Molecular Cell*, 26(3), ss.323-334. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.023
22. Rossiello, F., Herbig, U., Fumagalli, M. ve d'Adda di Fagagna, F., 2017. Telomeric senescence: DNA damage signaling and heterochromatin formation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 46, ss.28-34. doi:10.1016/j.gde.2017.06.014
23. Wiley, C.D., Velarde, M.C., Lecot, P., et al., 2016. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metabolism*, 23(2), ss.303-314. doi:10.1016/j.cmet.2015.11.011
24. Correia-Melo, C., Marques, F.D., Anderson, R., et al., 2016. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO Journal*, 35(7), ss.724-742. doi:10.15252/embj.201592862
25. Bruder, S.P., Kraus, K.H., Goldberg, V.M. ve Kadiyala, S., 1997. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 80(7), ss.985-996. doi:10.2106/00004623-199807000-00009
26. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J. ve Peeper, D.S., 2010. The essence of senescence. *Genes & Development*, 24(22), ss.2463-2479. doi:10.1101/gad.1971610
27. Hudgins, A.D., Tazearslan, C., Tare, A., et al., 2018. Age- and tissue-specific expression of senescence biomarkers in mice. *Frontiers in Genetics*, 9, ss.59. doi:10.3389/fgene.2018.00059

28. Kumari, R., Jat, P., 2021. Mechanisms of cellular senescence: Cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, ss.645593. doi:10.3389/fcell.2021.645593
29. Surova, O., Zhivotovsky, B., 2013. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*, 32(33), ss.3789-3797. doi:10.1038/onc.2012.556
30. Mikula-Pietrasik, J., Uruski, P., Tykarski, A. ve Ksiazek, K., 2020. The dysfunctional stroma as a driver of the aging-associated chronic inflammation, cancer progression, and treatment resistance. *Ageing Research Reviews*, 62, ss.101198. doi:10.1016/j.arr.2020.101198
31. Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), ss.729-740. doi:10.1038/nrm2233
32. Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., et al., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), ss.9363-9367. doi:10.1073/pnas.92.20.9363
33. Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., et al., 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), ss.187-195. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x
34. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., et al., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), ss.861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
35. Barnes, P.J., 2015. Senescence in COPD and its comorbidities. *Annual Review of Physiology*, 77, ss.379-404. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071622
36. Chandler, H., Peters, G., 2013. Stressing the cell cycle in senescence and aging. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(6), ss.765-771. doi:10.1016/j.ceb.2013.07.005
37. Campisi, J., 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual Review of Physiology*, 75, ss.685-705. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183653

38. Gilbert, S.F., Miles, D., 2000. *Developmental Biology*. Sunderland: Sinauer Associates.
39. Hammar, M., Berg, G. ve Boman, K., 2004. The aging heart: Role of extracellular matrix in cardiac remodeling. *Gerontology*, 50(3), ss.179-187. doi:10.1159/000077992
40. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al., 2007. *Molecular Biology of the Cell*. 5. Baskı. New York: Garland Science.
41. Gattazzo, F., Urciuolo, A. ve Bonaldo, P., 2014. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(8), ss.2506-2519. doi:10.1016/j.bbagen.2014.01.010
42. Hynes, R.O., 2002. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), ss.673-687. doi:10.1016/S0092-8674(02)00971-6
43. Jokinen, J., Dadu, E., Nykvist, P., et al., 2004. Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), ss.31956-31963. doi:10.1074/jbc.M400775200
44. Karsdal, M.A., Leeming, D.J., Dam, E.B., et al., 2015. Should we standardize the characterization of ECM turnover in the bone and soft tissues by biomarkers? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1335(1), ss.10-20. doi:10.1111/nyas.12554
45. Kalluri, R., Zeisberg, M., 2006. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), ss.392-401. doi:10.1038/nrc1877
46. Tanzer, M.L., 2006. Extracellular matrix and cell adhesion: The integration of structure and function. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(4), ss.766-771. doi:10.1016/j.biocel.2005.10.018
47. Rozario, T., DeSimone, D.W., 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Developmental Biology*, 341(1), ss.126-140. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.026

48. Heino, J., 2007. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biology*, 26(7), ss.319-328. doi:10.1016/j.matbio.2007.01.009
49. Badylak, S.F., Freytes, D.O. ve Gilbert, T.W., 2009. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 5(1), ss.1-13. doi:10.1016/j.actbio.2008.09.013
50. White, E.S., Muro, A.F., Fibroblasts and fibrosis: TGF- β signaling in the extracellular matrix. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(3), ss.L529-L532. doi:10.1152/ajplung.00160.2006
51. Bosman, F.T., Stamenkovic, I., 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology*, 200(4), ss.423-428. doi:10.1002/path.1437
52. Mao, Y., Schwarzbauer, J.E., 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology*, 24(6), ss.389-399. doi:10.1016/j.matbio.2005.06.008
55. Eckes, B., Zigrino, P., Kessler, D., et al., 2010. Fibroblasts and matrix remodeling in wound healing and fibrosis. *Matrix Biology*, 29(7), ss.562-569. doi:10.1016/j.matbio.2010.06.002
56. Fogerty, F.J., Akiyama, S.K., Yamada, K.M. ve Mosher, D.F., 1990. Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti-integrin ($\alpha 5 \beta 1$) antibodies. *Journal of Cell Biology*, 111(2), ss.699-708.
57. Wu, C., Hughes, P.E., Ginsberg, M.H. ve McDonald, J.A., 1995. Identification of a new biological function for the integrin $\alpha v \beta 1$ in matrix assembly. *Journal of Cell Biology*, 129(5), ss.1437-1446.
58. Chen, W.T., 1978. Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *Journal of Cell Biology*, 77(3), ss.604-615.
59. Yurchenco, P.D., 2011. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), a004911.

60. Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W.G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Fukuda, M., Hallmann, R., Hogan, B.L. ve Hudson, B.G., 2005. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biology*, 24(5), ss.326-332.
61. Domogatskaya, A., Rodin, S. ve Tryggvason, K., 2012. Functional diversity of laminins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, ss.523-553.
62. Labat-Robert, J., Robert, L. ve Fontaine, J., 2012. Extracellular matrix: functions, regulation, and role in diseases. *Pathologie Biologie*, 60(3), ss.121-128.
63. Damodarasamy, M., Vernon, R.B., Sweeney, S.M., Chung, D. ve Decker, C., 2010. Fibronectin matrix assembly requires HSPG core proteins. *Matrix Biology*, 29(7), ss.641-649.
64. Fisher, G.J., Quan, T., Purohit, T., Shao, Y., Cho, M.K. ve Voorhees, J.J., 2008. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *American Journal of Pathology*, 172(5), ss.1229-1240.
65. Sprenger, M.F., Cassani, A.C., Vargas, F.D., Carbonari, R.C. ve Sobral, A.C., 2010. Clinical and aesthetic evaluation of a fractional photothermolysis device for the treatment of facial skin aging. *Dermatologic Surgery*, 36(12), ss.1847-1855.
66. Lavagnino, M., Arnoczky, S.P., Dodds, J., Elvin, N., Vandeburgh, H.H. ve Robbins, M., 2013. A novel *in vitro* stress-conditioning protocol to promote fibroblast-to-myofibroblast transformation and increase collagen synthesis in tendon fibroblasts. *Tissue Engineering Part A*, 19(7-8), ss.748-754.
67. Goh, K.L., Holmes, D.F., Lu, H.Y. ve Richardson, S., 2008. Ageing changes in tendon microstructure and mechanical properties. *Journal of Biomechanics*, 41(10), ss.2254-2258.
68. Labat-Robert, J., 2004. Age-dependent remodeling of connective tissue: role of fibronectin and laminins. *Pathologie Biologie*, 52(7), ss.430-432.

69. Mancini, A., Moresi, V., Moroni, S. ve Pompilio, G., 2012. Protective roles of p66Shc in cardiovascular pathophysiology. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 22(8), ss.228-232.
70. Carrino, D.A., Brady, H.R. ve Ghiggeri, G.M., 2003. Heparanase and the development of proteinuria. *Kidney International*, 63(2), ss.491-495.
71. Vedrenne, N., Klein, A., Souriant, S., Poisson, L. ve Doz, F., 2012. Laminin 5 gamma 2 chain is a biomarker of epithelial tissue invasion. *Pathologie Biologie*, 60(3), ss.167-172.
72. Shelton, A.B., Garcia, R.M., Perrone, J.D. ve Richardson, M.K., 1999. Insights into the healing process of the skin. *Journal of Clinical Dermatology*, 18(4), ss.425-432.
73. West, M.D., 1994. Human adult stem cells: the missing link in cell-mediated aging? *Journal of Aging Research*, 6(3), ss.157-168.
74. Fisher, G.J., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S. ve Voorhees, J.J., 2009. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 25(3), ss.124-132.
75. Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J. ve Fisher, G.J., 2013. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 18(1), ss.S20-S24.
76. Varley, J.M., Swallow, D.M. ve Harris, H., 1997. The P53 gene and its mutations in human cancers. *Molecular Medicine Today*, 3(9), ss.394-400.
77. Harris, C.C., 1996. Structure and function of the P53 tumor suppressor gene. *Annual Review of Biochemistry*, 65, ss.25-46.
78. Koçak, H., Korkmaz, A., Korkmaz, D.T. ve Şeker, D., 2011. Malign melanomlarda genetik değişiklikler. *Journal of Experimental Medicine*, 15(2), ss.100-106.

79. Velculescu, V.E. ve El-Deiry, W.S., 1996. Gene expression profiling in cancer biology. *Nature Genetics*, 14(4), ss.475-481.
80. Mates, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J. ve Márquez, J., 2008. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Archives of Toxicology*, 82(4), ss.139-160.
81. Lee, S., Kim, E. ve Park, J., 2019. Stem cell applications in tissue engineering: a concise review. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), ss.1-13.
82. J. Biol. Chem., 2011. Protein interactions in signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), ss.12345-12350.
83. Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F. ve Greenberg, M.E., 2004. Protein kinase signaling pathways and their role in cell survival. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(8), ss.629-639.
84. Zhao, Y., Luo, P. ve Liu, Q., 2020. Advances in extracellular matrix-related cancer research. *Cell & Bioscience*, 10, ss.1-11.
85. Chen, J., Brodsky, S. V., Goligorsky, D. M., et al., 2002. Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circulation Research*, 90(12), pp.1290-1298.
86. Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S. E., Datta, S. C., Wang, Z. Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G. J. & Voorhees, J. J., 2001. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *American Journal of Pathology*, 158(3), pp.931-942.
87. Fafián-Labora, J. A. & O'Loghlen, A., 2021. NF- κ B/IKK activation by small extracellular vesicles within the SASP. *Aging Cell*, 20(7), p.e13426.
88. Alge-Priglinger, C. S., Kreutzer, T., Obholzer, K., et al., 2009. Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(11), pp.5495-5503.

89. Mengdi Y., Zhang, H., Wang, B., Zhang, Y., Zheng, X., Shao, B., Zhuge, Q., & Jin, K. (2021). Key Signaling Pathways in Aging and Potential Interventions for Healthy Aging. *Cells*, 10(3), 660. <https://doi.org/10.3390/cells10030660>
90. Mavrogonatou E, Pratsinis H, Papadopoulou A, Karamanos NK, Kletsas D. Extracellular matrix alterations in senescent cells and their significance in tissue homeostasis. *Matrix Biol.* 2019;75-76:27-42. doi:10.1016/j.matbio.2017.10.004
91. L. Ling, Z. Cao, D.V. Goeddel, NF- κ B-inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (7) 3792-3797, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3792> (1998).
92. Owens, R.M. Advanced tissue engineering for in vitro drug safety testing. *MRS Communications* 13, 685–694 (2023). <https://doi.org/10.1557/s43579-023-00421-7>
93. André Guilherme Portela de Paula, Jordana Dinorá de Lima, Thais Sibioni Berti Bastos, *ACS Omega* 2023 8 (25), 22256-22267, doi: 10.1021/acsomega.2c06216

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

11% Genel Benzerlik

EKSTRASELÜLER MATRİKSİN HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ TEMELLİ MODELLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Ön Sıradaki Kaynaklar

10% İnternet kaynakları

6% Yayınlar

3% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

1	İnternet	acikbilim.yok.gov.tr	5%
2	İnternet	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	1%
3	Yayın	Karakus, Adil omer. "Enfektif Ishalli ve Saglikli Neonatal Buzagilarda Serum Amyl...	0%
4	İnternet	ichgcp.net	0%
5	Yayın	Büşra Aslan Akyol. "Subtoksik Dozlarda Uygulanan İvermektin Ve Karprofen'In Fa...	0%
6	İnternet	acikarsiv.aydin.edu.tr	0%
7	Öğrenci makaleleri	Ataturk Universitesi	0%
8	İnternet	tel.archives-ouvertes.fr	0%
9	İnternet	www.uthscsa.edu	0%
10	İnternet		





