

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜÇ BOYUTLU BİR YUMUŞAK DOKU REJENERASYON
MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Birtan Tolga YILMAZ
ORCID:0000-0003-4558-0611

DENTAL BİYOMALZEMELER ANABİLİM DALI

Dental Biyomalzemeler Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
OCAK (2025)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2021970183

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜÇ BOYUTLU BİR YUMUŞAK DOKU REJENERASYON
MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Birtan Tolga YILMAZ
ORCID:0000-0003-4558-0611

DENTAL BİYOMALZEMELER ANABİLİM DALI

Dental Biyomalzemeler Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aliye AKCALI
ORCID:0000-0001-9811-0627

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TYL-2023-3102 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
OCAK (2025)

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dental Biyomalzemeler Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Birtan Tolga Yılmaz tarafından hazırlanan “Üç Boyutlu Bir Yumuşak Doku Rejenerasyon Modelinin Geliştirilmesi” başlıklı tez çalışması 15/01/2025 günü, 14.00-16.00 saatleri arasında yapılan tez savuna sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Yasemin BAŞBINAR,
Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü
Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0001-9439-2217

İmza

Üye: Prof. Dr. Aliye AKCALI
Dokuz Eylül Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0001-9811-0627

İmza

Üye: Prof. Dr. Gencay KEÇELİ
Hacettepe Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0001-6695-2133

İmza

Tez Hakkında alinin jüri Kararsa Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “Üç Boyutlu Bir Yumuşak Doku Rejenerasyon Modelinin Geliştirilmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım esere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Birtan Tolga YILMAZ

29.12.2024

TEŞEKKÜR

Kariyer planlamamda her zaman desteğini esirgemeyen, Dental Biyomalzemeler Yüksek Lisans eğitimim boyunca tez çalışmalarımındaki katkılarından dolayı çok kıymetli danışmanım Prof. Dr. Aliye AKCALI'ya;

Tez projemize mali destek sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne;

Tez projemize mali destek sağlayan Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na;

Eğitimime katkıları ve desteğinden dolayı Prof. Dr. Yasemin Başbınar'a, Prof. Dr. Hülya Ellidokuz'a, Doç. Dr. Gizem Çalıbaşı Koçal'a.

Tez projemizin hazırlanmasında katkılarından dolayı Prof. Dr. Olivier Huck'e.

Tez projesinin hazırlanması ve deneylerin yürütülmesinde katkılarından dolayı Caner KARACA'ya; Özge BAYRAK'a.

Desteğini her an yanımda hissettiğim değerli eşim Nil YAKAR'a.

Beni yetiştiren, her projede emeği olan; annem Ferihan YILMAZ ve babam Arif YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
GRAFİKLER DİZİNİ	iii
KISALTMALAR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sferoid Oluşturma Yöntemleri	5
2.2. Sferoid Oluşumunun Hüresel Mekanizması.....	7
2.3. Sferoid Hücre Kültürünün Kullanım Alanları	9
2.4. Fibroblast Sferoidlerinin Yapısal ve Biyolojik Özellikleri	10
2.5. L929 Hücrelerinin Doku Modelleme Alanında Kullanımı	12
2.6. Sferoid Kültürlerinde L929 Hücrelerinin Kullanımı	13
2.7. L929 Hücrelerinin Sferoid Kültürlerde Sağladığı Avantajlar	13
2.7.1. Doğal Doku Mikro Çevresini Taklit Etme	13
2.7.2. Hücre-Hücre ve Hücre-ECM Etkileşimlerinin İncelenmesi	14
2.7.3. Sitotoksosite ve İlaç Testlerinde Kullanım	14
2.8. Doku Modellemede Kolajen ve HA Hidrojellerin Kullanımı	14
2.9. ECM Proteinlerinin Sentezi ve Yapısal Modifikasyonlar	15
2.10. Kolajen ve HA Hidrojellerin Kullanımı	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Araştırmanın Tipi	18
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı	18
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme	19
3.3.1. Dahil Edilme Kriterleri	19
3.3.2. Dışlama Kriterleri	19
3.4. Çalışma Materyali	20
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	20
3.5.1. Bağımsız Değişkenler	20
3.5.2. Bağımlı Değişkenler	20
3.6. İnsan Diş eti Fibroblastlarının İzole Edilmesi ve İdamesi	21

3.7. L929 Hücre Hattının Kültüre Edilmesi	22
3.8. Sferoidlerin Oluşturulması ve Optimizasyon Testleri.....	23
3.9. Hidrojellerin Hazırlanması.....	23
3.9.1. Sferoidlerin Hidrojel İçine Gömülmesi	24
3.9.2. Üç Boyutlu Hidrojellere Gömülü Sferoidlerin Yapısal Değişikliklerinin ve Davranışlarının İncelenmesi	24
3.9.3. İnvazyon Analizi.....	25
3.9.4. Araştırmacı Kalibrasyonu	26
3.9.5. Hücre Canlılık Testi.....	26
3.9.6. Yara İyileşmesi Deneyi.....	26
3.10. Veri Toplama Araçları	27
3.11. Verilerin Değerlendirilmesi	30
3.12. Araştırmanın Sınırlılıkları	30
3.13. Etik Kurul Onayı	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Yara İyileşme Testi Analizi	31
4.2. İnsan Diş Eti Dokularından Diş eti Fibroblast Eldesi	32
4.3. Optimizasyon Testi	33
4.4. Metabolik Aktivite ve Proliferasyonun Değerlendirilmesi.....	34
4.5. Hazırlanan Üç Boyutlu Modellerdeki Sferoidlerin Yapısal Değişikliklerinin ve Davranışlarının Değerlendirilmesi	36
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
7. KAYNAKLAR	53
8. EKLER.....	63

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Araştırma Planı	18
Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Cihazlar	27
Tablo 3: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	28
Tablo 4: Canlılık testi verileri	35
Tablo 5: L929 sferoidlerinin hidrojel içerisinde zamana bağlı değişimine bağlı “p” değerleri.....	38
Tablo 6: L929 sferoidlerinin hidrojel içerisinde zamana bağlı değişimine bağlı “p” değerleri.....	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: İnsan diş eti dokusunun ağız içinden elde edilmesi	21
Şekil 2: Hastalardan alınan dokulardan kollajenaz I enzimi kullanılarak hücrelerin izole edilmesi	22
Şekil 3: Hidrofobik 96 kuyucuklar kullanılarak sferoid oluşturulması	23
Şekil 4: Elde edilen sferoid kümesinin hidrojel içerisine ekilerek oluşturulan üç boyutlu yapı.....	24
Şekil 5: Hücre uzantılarının hesaplanması	25
Şekil 6: Yara iyileşmesi deneylerinin illüstrasyonu	27
Şekil 7: Akış şeması	29
Şekil 8: Farklı hidrojeller içinde hidrojellerin başlangıç ve 3 günlük görüntüleri	32
Şekil 9: İnsandan elde edilen diş eti fibroblast hücrelerinin 10x büyütmede mikroskop altındaki görüntüsü.....	33
Şekil 10: L929 hücre sferoidlerinin farklı hidrojel yapıları içindeki görünümü.....	36
Şekil 11: HGF hücre sferoidlerinin farklı hidrojel yapıları içindeki görünümü.....	39
Şekil 12: 10.000 ve üzeri hücre ekiminde tek kuyucukta çoklu ve farklı boylarda sferoid yapılarının tespiti.....	44

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa No
Grafik 1: Yara kenarları arasındaki mesafenin başlangıç ve 3. günler arasındaki değişimi gösteren grafik.....	31
Grafik 2: L929 hücre hattı ve HGF hücrelerinin kuyucuklara ekildikten sonra 10 gün boyunca hacimsel değişimlerini gösteren grafik.....	34
Grafik 3: Presto mavisi kullanılarak 4. ve 8. günlerde gerçekleştirilen metabolik aktivite analizleri.....	35
Grafik 4: L929 sferoidlerinin farklı hidrojelde içinde 8 gün boyunca hacim değişimi.....	38
Grafik 5: HGF sferoidlerinin farklı hidrojelde içinde 8 gün boyunca hacim değişimi.....	40
Grafik 6: Zamana bağlı sferoid invazyonu grafiği.....	41

KISALTMALAR

ATCC	Amerikan Tıp Kùltür Koleksiyonu
ECM	Ekstraselùler Matriks
HA	Hiyalùronik Asit
HGF	Human Gingival Fibroblast
BGOF	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
KVKK	Kişisel Verileri Koruma Kanunu
RPMI	Roswell Park Memorial Enstitüsü
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Ortam
EDTA	Ethylenediamine Tetraasetik Asit

ÜÇ BOYUTLU BİR YUMUŞAK DOKU REJENERASYON MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Birtan Tolga YILMAZ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Dental Biyomalzemeler Ana Bilim Dalı

ÖZET

Bu yüksek lisans tezinin amacı, insan diş eti fibroblast (HGF) hücreleri ve fare fibroblast hücre hattı (L929) kullanılarak farklı oranlarda kolajen ve hiyalüronik asit (HA) içeren hidrojeller ile geliştirilen üç boyutlu yumuşak doku modelinde hücre-matriks etkileşimlerinin incelenmesidir. Bu çalışma ile, yumuşak doku rejenerasyonu ve yeni biyomalzemeler için potansiyel bir model geliştirilmesi hedeflendi.

Bireylerden izole edilmiş insan diş eti fibroblastları ve ticari L929 hücre hattı kullanılarak farklı hücre yoğunluğunda sferoidler oluşturuldu. Bu sferoidler, hücre-matriks etkileşiminin incelenmesi için farklı oranlarda kolajen ve HA içeren hidrojellerle gömüldü. Sferoid büyüme dinamikleri mikroskop görüntüleme ve görüntü analizi (ImageJ programı) ile değerlendirildi, metabolik aktiviteleri Presto mavisi testi ile ölçüldü ve hücre invazyonu ise; matriks içindeki uzantılar aracılığıyla analiz edildi.

İnsan diş etinden ve L929 hücre hattından izole edilen fibroblastlardan elde edilen sferoidlerin, stabil bir yapı sergilediği gözlemlendi. L929 sferoidleri, kolajen ve HA bazlı hidrojellerde belirgin invaziv özellikler göstermişlerdir. İnsan diş etinden izole edilen fibroblast sferoidleri ise daha az invaziv davranış sergilemişlerdir. 3:2 kolajen/HA oranına sahip hidrojeller, her iki hücre tipi için en büyük sferoid hacmini sağlamıştır.

Geliştirilen yeni yumuşak doku rejenerasyon modelinin, yumuşak doku rejenerasyonu ve biyomühendislik uygulamaları için elverişli olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışması hücre-matriks etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasında ve translasyonel modellerin kullanımı açısından literatüre katkı sağlamaktadır. İlerleyen çalışmalarda farklı hücre tipleri ve matriks bileşenleriyle modelin geliştirilmesi planlanmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Üç boyutlu doku modeli, Diş eti fibroblastı, Hidrojel, Hiyalüronik Asit, Kolajen, Sferoid formasyonu, Translasyonel araştırma

Tezin sayfa sayısı: 52

Danışman: Prof. Dr. Aliye AKCALI



DEVELOPMENT OF A THREE-DIMENSIONAL SOFT TISSUE REGENERATION MODEL

Master's Thesis

Birtan Tolga YILMAZ

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Department of Dental Biomaterials

ABSTRACT

The aim of the present master's thesis is to investigate cell-matrix interactions in three-dimensional soft tissue model developed with hydrogels containing varying ratios of collagen and hyaluronic acid (HA), using human gingival fibroblast (HGF) cells and the rat fibroblast cell line (L929). This study aims to establish a potential soft tissue regeneration model and biomaterial development.

Spheroids were formed utilising human gingival fibroblasts isolated from individuals and the commercially purchased L929 cell line at different cell densities. These spheroids were embedded in hydrogels containing varying ratios of collagen and HA to evaluate cell-matrix interactions. Spheroid growth dynamics were assessed through microscopic imaging and ImageJ analysis, metabolic activity was measured using the PrestoBlue assay, and cell invasion was analyzed via extensions within the matrix.

Spheroids formed with human gingival fibroblasts and the L929 cell line exhibited stable structures. L929 spheroids displayed significant invasive properties in collagen- and HA-based hydrogels. In contrast, spheroids derived from human gingival fibroblasts demonstrated less invasive behavior. Hydrogels with a 3:2 collagen/HA ratio provided the largest spheroid volume for both cell types.

The newly developed soft tissue regeneration model has been demonstrated to be suitable for applications in soft tissue regeneration and bioengineering. This thesis contributes to a better understanding of cell-matrix interactions and provides translational insights into the literature. Future studies aim to further develop the model with different cell types and matrix components.

Keywords: 3D tissue model, gingival fibroblast, L929 cell line, hyaluronic acid, collagen, cell-matrix interaction, soft tissue regeneration, spheroid formation, biomaterial testing, cell invasion.

Page number: 52

Advisor: Prof. Dr. Aliye AKCALI

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yumuşak doku rejenerasyonu, diş hekimliği ve biyomedikal bilimler açısından önemli bir araştırma alanıdır. Periodontal ve peri-implant hastalıklar ve neticesinde meydana gelen doku kayıpları, yalnızca fonksiyonel bozukluklara neden olmakla kalmayıp estetik sorunları da beraberinde getirmektedir (1). Çeşitli yumuşak doku rejenerasyonu uygulamaları, bu kayıpların tedavisinde kullanılan en umut verici yaklaşımlar arasında yer almaktadır (2).

Gelişen teknolojiyle birlikte, üç boyutlu doku iskeleleri ve doku mühendisliği gibi yenilikçi yaklaşımlar sayesinde oral dokuların rejenerasyonu için pek çok materyal ve büyüme faktörü geliştirilmiştir (3). Laboratuvar koşullarında test edilen materyallerin klinik uygulamalara geçebilmesi için hayvan deneyleri ve faz çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmesi gerekmektedir. Bu süreç hem zaman hem maliyet açısından oldukça zorlayıcıdır. Dahası, hayvan deneylerinin artışı, bilimsel etik tartışmalarını beraberinde getirmektedir (4).

Materyallerin biyo-uyumluluğunun ve etkinliğinin test edilmesinde en çok kullanılan *in-vitro* modeller, geleneksel iki boyutlu hücre kültürü sistemleridir. Ancak bu sistemler, hücrelerin doğal mikro çevresini yansıtamaması gibi bazı sınırlamalara sahiptir. Hücrelerin üç boyutlu yapısından yoksun kültüre edilmesi, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerinin doğal ortamdan farklılaşmasına yol açmakta, bu da biyolojik süreçlerin fizyolojik olmayan şekilde incelenmesine neden olabilmektedir. Bu sınırlamaları aşmak için son yıllarda üç boyutlu hücre kültürü sistemleri geliştirilmiştir (5). Sferoidler, hücrelerin üç boyutlu bir yapı içinde organize olmasını sağlayarak, doğal doku fizyolojisine daha yakın bir mikro çevre sunar. Bu özellikleri sayesinde, sferoidler ilaç testlerinden rejeneratif tıp çalışmalarına kadar geniş bir uygulama alanı bulmuş ve hücre davranışlarının daha hedefli bir şekilde incelenmesine olanak tanımıştır (6).

Diş eti dokusunun temel hücresi olan fibroblastlar, oral yumuşak dokuların rejeneratif süreçlerinin ana bileşenlerinden birisidir; yara iyileşmesi ve inflamasyon gibi süreçlerde düzenleyici rol üstlenirler (7). Geleneksel iki boyutlu hücre kültürü yöntemlerinin fibroblastların doğal ortamını yeterince taklit edememesi, üç boyutlu modellerle yapılan çalışmaları daha değerli kılmaktadır. Bununla birlikte, literatürde üç boyutlu yumuşak doku rejenerasyon modellerine yönelik yapılan çalışmalar

ekstraselüler matriks-hücre ilişkilerinin değerlendirilmesi bakımından kısıtlı olup, ideal bir yumuşak doku modeli henüz tanımlanamamıştır. Bu bağlamda, dış eti fibroblastlarının üç boyutlu sferoid istemlerinde incelenmesi, yumuşak doku rejenerasyonu potansiyelinin daha iyi anlaşılmasına yönelik önemli bir adım olacaktır.

Bu tezin amacı, dış eti fibroblastları kullanılarak üç boyutlu bir yumuşak doku rejenerasyon modeli geliştirmektir. Bu modelin, hücresele proliferasyon, metabolik aktivite ve rejeneratif potansiyeli değerlendirilerek, ilaç ve biyouyumlu rejeneratif malzemelerin geliştirilmesi süreçlerinde fizyolojik koşulları daha iyi modelleyecek bir yöntem olarak tanımlanması amaçlanmaktadır. Ayrıca, bu modelin yara iyileşmesinde ve yumuşak doku rejenerasyonunda kullanılabilirliğinin araştırılması ve bu alandaki literatürdeki eksikliklerin giderilmesi amaçlanmaktadır (8, 9).

2. GENEL BİLGİLER

Günümüzde oral yumuşak doku defektlerinin başarılı bir şekilde tedavi edilmesi için geliştirilen mevcut yöntemler, sıklıkla otojen greftlerin kullanılmasına dayanmaktadır. Ancak, uygulanan cerrahi işlemler donör bölgeden doku eldesini gerektirdiği için komplikasyon riski taşır ve hastalarda ek morbidite yaratabilmektedir (10, 11). Yumuşak doku cerrahilerinde otojen diş eti grefti genellikle palatinal bölgedeki keratinize yumuşak dokudan elde edilir. Bununla birlikte, tuber maksilla bölgesinde, yirmi yaş dişlerinin posteriorundaki alan da greft için tercih edilebilecek bir alternatiftir (12). Greft eldesi için *trap door*, tek kesi ve çift kesi gibi primer kapanmayı hedefleyen tekniklerin yanı sıra, serbest dişeti grefti gibi sekonder iyileşme beklenen yöntemler de kullanılabilir. Ancak hem primer hem de sekonder iyileşme ile sonuçlanan yöntemlerde, postoperatif ağrı, sekonder kanama, enfeksiyon riskinin artışı ve ikinci bir cerrahi alan gereksinimi, hastanın konforunu olumsuz etkileyen faktörlerdir. Ayrıca, greft alma sırasında sıkça karşılaşılan bir durum olan palatinal arterden kaynaklanan kanama, bu yöntemin klinisyenler tarafından daha az tercih edilmesine neden olan önemli bir etkidir (13). Bunun yanı sıra, elde edilen dokunun kalınlığı ve genişliği hastadan hastaya farklılık göstermektedir ve bu durum, bazı olgularda hedeflenen miktarda doku elde edilmesini zorlaştırmaktadır(14).

Bu sorunların üstesinden gelebilmek için, *in-vitro* ortamda geliştirilecek üç boyutlu yumuşak doku modelleri, daha güvenli ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin önünü açabilir. Özellikle diş eti fibroblastların üç boyutlu ortamda kültürlenmesi, hücrelerin doğal mikro çevresini yansıtarak oral yumuşak doku rejenerasyonunun mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Biyomedikal araştırmalarda kullanılan iki boyutlu hücre kültürü modelleri, hücrelerin *in-vivo* ortamda sergiledikleri kompleks davranışları yansıtmakta yetersiz kalmaktadır. Bu durum, hücrelerin birbirleriyle ve çevresindeki biyolojik yapılarla olan etkileşimleri, hücresel farklılaşma ve doku homeostazı gibi süreçlerin yeterince incelenememesine neden olmaktadır. İki boyutlu modellerin sınırlamaları, özellikle hücrelerin düz bir yüzeyde büyümesi nedeniyle, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks (ECM) etkileşimlerini yetersiz yansıtır (15). Bunun sonucunda, bu tip kültürlerde hücresel davranışlar, doğal dokulardaki ortamlardan farklılık gösterebilir

(16). Bu bağlamda, hücre kültürü çalışmalarında üç boyutlu modellerin kullanımı giderek önem kazanmaktadır.

Üç boyutlu hücre kültürü modelleri, hücrelerin doğal doku mikro çevresine daha uygun koşullarda büyümesini sağlayarak, *in-vivo* koşullara daha benzer fizyolojik yanıtlar elde edilmesine yardımcı olur (17). Örneğin, hücrelerin üç boyutlu ortamda büyümesi, hücre polarizasyonu, mekanik stres yanıtlarını ve ECM üretimini daha gerçekçi bir şekilde taklit eder (18). Bunun sonucunda, hücrelerin farklılaşma ve proliferasyon süreçleri, iki boyutlu kültürlerle kıyasla daha doğru bir şekilde analiz edilebilir (19).

Özellikle sferoid hücre kültürü modelleri, bu alanda yaygın bir kullanım alanı bulmaktadır. Sferoidler, hücrelerin bir arada toplanarak üç boyutlu bir yapı oluşturduğu hücre kümeleridir ve hücre-hücre etkileşimlerinin yanı sıra hücre-ECM etkileşimlerini de etkin bir şekilde inceleme imkânı sağlar (20). Sferoidler, kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılmıştır ve bu modeller, *in-vivo* tümör ortamına benzer yapılar sergilediğinden, tümör biyolojisinin anlaşılmasına büyük katkılar sağlamıştır (21). Sferoid hücre kültürleri, hücre proliferasyonunun ve ilaçlara olan yanıtın incelenmesinde de önemli avantajlar sunmaktadır (22).

Sferoid kültür yöntemlerinden biri olan "asılı damla" (*hanging drop*) yöntemi, hücrelerin yer çekimi etkisiyle bir damla ortamı içinde bir araya gelmesini sağlar. Bu yöntem, hücrelerin katı bir yüzeye yapışmasını engelleyerek doğal bir şekilde üç boyutlu bir yapı oluşturmalarını teşvik eder (23). Diğer bir yöntem olan ultra-düşük yapışma yüzeyli kültür plakaları ise, hücrelerin yüzeye yapışmalarını engeller ve bir araya gelerek sferoid yapılarını oluşturmalarına olanak tanır. Bu yöntemler, hücrelerin daha homojen bir şekilde büyümesini sağlayarak, asılı damla yöntemine kıyasla deneysel tutarlılığı artırır (24).

Üç boyutlu kültürlerin biyomühendislik alanındaki önemi, bu modellerin doku mühendisliği, rejeneratif tıp ve ilaç geliştirme gibi alanlarda kullanılma potansiyelinden kaynaklanmaktadır (17). Örneğin, üç boyutlu kültürler, kök hücre biyolojisi ve rejeneratif tıpta hücre farklılaşmasının incelenmesi için ideal ortamlar sunar. Pluripotent kök hücrelerin üç boyutlu ortamda kültüre edilmesi, embriyonik gelişim süreçlerini taklit ederek hücrelerin diferansiyasyonunu ve doku oluşumunu anlamada kritik rol oynar (25). Ayrıca, sinir ve kas hücreleri gibi farklı hücre tiplerinin

üç boyutlu kültürlerde doğal çevrelerine benzer davranış sergilediği gösterilmiştir (26).

Bu teknolojik gelişmeler, yalnızca hücre davranışlarının daha gerçekçi bir şekilde incelenmesine olanak tanımakla kalmaz, aynı zamanda hayvan deneylerine olan gereksinimi azaltarak etik sorunların da önüne geçer. Hayvan modelleri, biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakta olsa da üç boyutlu hücre kültürleri bu alanda önemli bir alternatif sunmaktadır (27). Üç boyutlu kültür sistemleri, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerini gerçekçi bir şekilde inceleyerek, araştırmalarda hayvan kullanımını azaltma potansiyeli taşımaktadır (28).

Dolayısıyla, üç boyutlu hücre kültürü modelleri, genel biyomedikal araştırmalar ve doku mühendisliği alanında büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, özellikle oral yumuşak dokuların rejenerasyonu üzerine yapılan araştırmalar sınırlıdır ve bu alan, periodontal hastalıklar, travmatik doku kayıpları ve diş çekimi sonrası doku iyileşmesi gibi klinik problemleri doğala yakın bir biçimde çözme potansiyeli taşımaktadır (29).

Bu tez çalışması, *in-vitro* ortamda diş eti fibroblastlarının üç boyutlu kültürü ile oral yumuşak doku rejenerasyonunu inceleyerek hem bilimsel hem de klinik pratik açısından önemli katkılar sağlamayı hedeflemektedir. Geliştirilecek olan model, yalnızca periodontal/peri-implant hastalıkların tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar sunmakla kalmayacak, aynı zamanda hayvan deneylerine olan gereksinimi de azaltarak yeni bir model geliştirilmesini sağlayacaktır.

2.1. Sferoid Oluşturma Yöntemleri

Geleneksel hücre kültürü yöntemlerinde hücreler genellikle plastik bir yüzey üzerine yer çekiminin etkisiyle ECM proteinlerine tutunarak yayılım gösterirler. Bu süreç, hücrelerin yüzeylerinde bulunan integrin adı verilen proteinler aracılığıyla gerçekleşir. İntegrinler, hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunmasını sağlayan fibronektin gibi ECM proteinlerine bağlanırlar (30). Ancak, üç boyutlu hücre kültürü modelleri oluşturmak için, hücrelerin katı yüzeylere tutunmasının engellenmesi gerekmektedir. Bunun için, hücrelerin sadece birbirlerine tutunmasına olanak tanıyan yüzeyler veya ortamlar kullanılmaktadır.

Tarihsel olarak, hücrelerin birbirine tutunarak sferoid yapılar oluşturmasını sağlayan "*spinner flask*" ve "sıvı örtüleme" teknikleri olmak üzere iki ana yöntem geliştirilmiştir. *Spinner flask* yöntemi, yüksek yoğunlukta hücre süspansiyonunun sürekli olarak çalkalanmasıyla hücrelerin katı yüzeylere yapışmasını engeller ve hücrelerin birbiri ile etkileşimini artırır. Bu yöntem, hücrelerin birbirine tutunarak sferoid yapılar oluşturmasını teşvik eder (31). Diğer yandan, sıvı örtüleme yöntemi hücrelerin yüzeye yapışmasını önlemek amacıyla agar gibi bir jel kullanır. Bu yöntemle hücrelerin, katı yüzeylere temas etmeden sferoid yapılar oluşturması sağlanır (32). Ancak bu iki yöntemin kullanımı genellikle heterojen sferoid popülasyonlarının oluşmasına yol açar, bu da sferoidlerin boyut ve morfolojisinde değişkenliğe neden olabilir.

Spinner flask ve sıvı örtüleme tekniklerinin geliştirilmesiyle, daha homojen sferoid kümeleri elde edilmesi mümkün olmuştur. Günümüzde, hücrelerin yapışmasına izin vermeyen yüzeylere sahip 96 kuyucuklu plakalar, her bir kuyucukta bir sferoid oluşturulması için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (33). Örneğin, çok düşük yapışma potansiyelli sferoid plakalar (Corning, NY) ve 3B-kültür plakaları (Scivax, Tokyo) gibi plakalar, hücrelerin yüzeye tutunmasını engeller ve sferoid oluşumunu teşvik eder. Bu plakalar, hücrelerin birbirine tutunarak kompakt yapılar oluşturmasına olanak tanır. Sferoid boyutu, genellikle her bir kuyucuğa ekilen hücre sayısı ile kontrol edilir (34).

Asılı damla tekniğinde ise hücre süspansiyonu küçük damlalar şeklinde bir ortamın içine yerleştirilir. Damlanın yer çekimine maruz kalan yüzeyinde hücre agregatları oluşur ve hücrelerin katı bir yüzeye yapışması engellenir (23). Asılı damla tekniği, hücrelerin yüzeye tutunma eğilimini ortadan kaldırarak, hücrelerin birbiriyle temas kurarak kompakt sferoidler oluşturmasına imkân tanır. Bu yöntem, özellikle kök hücre biyolojisinde ve doku mühendisliği çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Damlaların hacmi ve damla başına ekilen hücre sayısı, sferoidlerin büyüklüğünü belirlemede kritik rol oynar.

Bir diğer yenilikçi sferoid oluşturma yöntemi, kitosan membranların kullanımınıdır. Kitosan, doğal bir polisakkarit olan kitinin deasetile edilmiş türevidir ve hücre göçü, proliferasyonu ve ECM sekresyonu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (35). Kitosan membranları, hücrelerin iki boyutlu kültürden üç boyutlu ortama geçişini

sağlamak için kullanılır. Bu membranlar, hücrelerin birbirine tutunarak üç boyutlu yapılar oluşturmalarına olanak tanır ve özellikle hücre-matriks etkileşimlerini incelemek için ideal bir ortam sağlar. Kitosan genellikle hücrelerin biyolojik aktivitelerini teşvik eden başka bir glikozaminoglikan olan hyalüronan ile birleştirilir (36).

2.2. Sferoid Oluşumunun Hücresel Mekanizması

Sferoid oluşumu, hücrelerin düşük yapışma koşullarında bir araya gelerek üç boyutlu küresel yapılar oluşturduğu bir süreçtir. Bu süreç, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerinin belirleyici olduğu bir dizi biyolojik mekanizmaya dayanır. Hücreler, iki boyutlu kültürlerde genellikle yüzeye tutunarak yayılırken, üç boyutlu sferoid yapılarında yalnızca birbirlerine tutunarak kompakt bir yapı oluştururlar (37). Bu yapıların oluşumu sırasında bir dizi moleküler yolak devreye girer.

Sferoid oluşumunun başlangıcında, hücreler arasındaki ilk temas, yüzeylerindeki integrin proteinleri aracılığıyla gerçekleşir. Integrinler, hücrelerin ECM proteinlerine bağlanmasını sağlar ve hücrelerin birbirine tutunarak üç boyutlu bir yapı oluşturmalarına aracılık eder (38). Özellikle, integrin-fibronektin ve integrin-laminin etkileşimleri, hücrelerin birbirine bağlanmasında ve sferoidlerin kompakt hale gelmesinde kritik bir rol oynar (39). Bu etkileşim, hücrelerin mekanik kuvvetlere karşı direnç göstermesine ve yapısal bütünlüğü korumasına olanak tanır.

Sferoid oluşumunun ilerleyen aşamalarında, hücreler arası bağlanma kaderin adı verilen transmembran proteinleri aracılığıyla gerçekleşir. Kaderinler, hücre-hücre bağlantılarının oluşumunda rol oynayan kalsiyum bağımlı proteinlerdir ve hücreler arasındaki homofilik bağlanmayı sağlarlar (40). Kaderinler, özellikle E-kaderin ve N-kaderin gibi tipleri, hücrelerin birbirine sıkıca bağlanmasını ve sferoid formasyonunun stabilitesini sağlar (41). Kaderinler, hücreler arasında sinyallerin iletilmesinde ve hücre polaritesinin korunmasında da önemli bir rol oynar.

Kaderinlerin bağlanmasıyla başlayan hücre içi sinyaller, aktin filamentlerinin reorganizasyonunu tetikler. Bu reorganizasyon, hücrelerin şekil değiştirmesine ve sıkı bir sferoid yapısı oluşturmalarına olanak tanır. Kaderinler ayrıca, hücreler arası mekanik kuvvetlerin algılanmasına yardımcı olur ve hücrelerin konumlarını stabilize eder (42).

Sferoidlerin oluşumunda hücre iskeleti proteinleri de büyük bir öneme sahiptir. Hücrelerin birbirine bağlanması sırasında, miyozin-II ve aktin filamentleri, hücrelerin

çekirdekleri çevresinde yeniden düzenlenir ve hücrelerin birbirine daha sıkı bir şekilde tutunmasına yardımcı olur (43). Hücre iskeleti, hücre şeklinin korunmasını ve hücreler arası gerilimin düzenlenmesini sağlar. Özellikle miyozin II'nin hücre iskeleti üzerindeki etkisi, sferoidlerin kompakt hale gelmesinde kritik bir rol oynar. Miyozin-aktin kompleksi, hücrelerin birbirine uyguladığı mekanik kuvvetleri düzenler ve hücreler arası bağların güçlenmesini sağlar.

Bu mekanizmada, hücre içi RhoA, Rac1 ve CDC42 gibi küçük GTPazlar devreye girer. Bu moleküller, hücre iskeletinin düzenlenmesinde ve hücrelerin yapısal bütünlüğünün korunmasında görev alır (44). Aktin filamentlerinin dinamik reorganizasyonu, hücrelerin morfolojisini ve hücre-hücre etkileşimlerini modüle ederek sferoidlerin boyutunu ve şeklini belirler.

Sferoidler, gelişimlerinin belirli bir aşamasına geldiklerinde, çevrelerindeki ECM proteinlerini sentezlemeye başlarlar. ECM sentezi, hücrelerin etrafında koruyucu bir yapı oluşturur ve hücrelerin birbirine daha iyi tutunmasına yardımcı olur (45). Bu süreçte, hücreler fibronektin, kolajen ve laminin gibi ECM proteinlerini sentezleyerek, çevresel bir matris oluştururlar. ECM, hücrelerin mekanik destek almasını sağlarken aynı zamanda hücre sinyalleşmesinde de rol oynar. Bu sayede, hücreler arası sinyallerin iletimi ve doku homeostazı korunmuş olur.

Sferoid yapısının oluşumunun ardından, hücreler arasında bir polarizasyon süreci başlar. Bu süreç, hücrelerin iç ve dış yüzeylerinin farklılaşmasıyla gerçekleşir. Sferoidlerin dış yüzeyinde bulunan hücreler genellikle daha fazla ECM sentezlerken, iç kısımda yer alan hücreler hipoksik koşullarda daha az metabolik aktivite gösterirler (16). Bu polarizasyon, hücrelerin farklı işlevler üstlenmesini sağlar ve sferoidlerin fonksiyonel bir yapı haline gelmesine olanak tanır.

Polarizasyon süreci, aynı zamanda sferoidlerin olgunlaşmasına da katkıda bulunur. Sferoid olgunlaşması, hücrelerin farklılaşmasını ve spesifik fonksiyonları yerine getirmesini sağlar. Özellikle kök hücre kaynaklı sferoidler, olgunlaşma sürecinde belirli hücre tiplerine farklılaşarak organoid yapıların oluşmasına katkıda bulunabilir (25). Bu süreç, sferoidlerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıp gibi alanlarda kullanılmasına olanak tanır.

2.3. Sferoid Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

Sferoid hücre kültürü, onkoloji alanında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Özellikle, sferoidlerin solid tümörlere benzeyen yapıları sayesinde, tümör biyolojisinin incelenmesi için ideal bir model sunmaktadır (24). Sferoid yapılar, hücrelerin yoğun bir şekilde organize olduğu ve ECM proteinlerinin sentezlendiği ortamları taklit eder. Böylece, iki boyutlu kültürlerle kıyasla sferoid modelleri, tümörlerin büyüme kinetiği ve uzamsal heterojenliğini daha gerçekçi bir şekilde yansıtır (21).

Tümör sferoidleri, ECM sentezi ve hücre-hücre etkileşimleri bakımından orijinal tümörlere benzer özellikler gösterir. Sferoid modellerinde, tümör hücreleri arasında oluşan *mikromilieu*, *in-vivo* koşullardaki gibi hücresel davranışları yansıtarak, hücre çoğalması ve invazyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına olanak tanır (46). Ayrıca, bu modeller, kanser terapötiklerinin etkinliğini değerlendirmek için de kullanılmaktadır. Sferoidler, iki boyutlu hücre kültürlerine kıyasla kemoterapiye ve radyoterapiye karşı daha dirençli olabilir, bu da ilaç testlerinde daha gerçekçi sonuçlar elde edilmesini sağlar (47).

Sferoid hücre kültürleri, kök hücre biyolojisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Pluripotent kök hücreler kullanılarak oluşturulan sferoidler, embriyogenez sırasında hücrelerin birbirleriyle nasıl etkileştiğini incelemek için bir model olarak hizmet eder. Bu süreç, hücrelerin üç boyutlu bir ortamda nasıl organize olduklarını ve farklı hücre tiplerine nasıl farklılaştıklarını anlamak açısından önemlidir (25). Sferoid modelleri, bu nedenle, embriyogenez sırasında hücre yaşam süreçleri ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler sağlar. Nöral tüp kaynaklı kök hücreler de sferoid kültürlerinde yaygın olarak kullanılır. Bu modeller, nöral kök hücrelerin *in-vitro* olarak nöronlara, oligodendrositlere ve astrositlere nasıl farklılaştığını incelemek için kullanılır (48). Üç boyutlu ortamda, kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli iki boyutlu kültürlerle göre genellikle daha yüksektir. Örneğin, tükürük bezi kaynaklı öncü hücreler, hepatositlere ve pankreatik adacık hücrelerine üç boyutlu ortamda daha etkin bir şekilde farklılaşabilir. Bu durum, hücrelerin doğal mikro çevrelerini taklit eden üç boyutlu kültürlerde daha gerçekçi sonuçlar elde edilmesini sağlar (49). Buna ek olarak, sferoid kültürleri, organoid yapılarının oluşturulmasında da önemli bir rol oynar. Optik çanak gibi karmaşık organ mimarilerinin *in-vitro* olarak üretimi, yalnızca hücrelerin

doğal organizasyon yeteneğinin çok yüksek olduğu üç boyutlu kültür ortamlarında mümkündür (50). Bu tip yapılar, organ gelişimi, doku homeostazı ve rejeneratif süreçlerin incelenmesi için önemli bir model sunar. Dolayısıyla; sferoid yapılar, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerini incelemek için ideal bir model sağlar. Bu yapılar, doğal hücrel mikroy çevreyi taklit ettikleri için hücrel etkileşimlerin ve doku homeostazının nasıl sağlandığını anlamak açısından önemlidir (51). Örneğin, sferoid kültürleri, iskelet sistemi gelişiminde önemli rol oynayan kadherin-7 ekspresyonunun hücre göçü sırasında nasıl düzenlendiğini incelemek için kullanılmıştır (52). Kadherin-7'nin ekspresyonu, hücrelerin birbirine tutunmasını ve migrasyon süreçlerinin koordinasyonunu sağlar, bu da embriyonik gelişim sırasında iskelet sistemi formasyonunda kritik bir rol oynar.

Sferoidler ayrıca, immün aktivasyon fenomenlerini incelemek için de kullanılmıştır. Özellikle nemozis, fibroblast sferoidlerinin immünolojik tepkilerinin incelenmesinde kilit bir rol oynamıştır. Nemozis, apoptotik belirteçler olmaksızın başlayan hücre ölümü olarak tanımlanır ve bu süreç, sferoidler içerisinde *Prostaglandin Endoperoksit Sentaz (COX2)*, *Matriks-Metalloproteinazlar (MMP)* ve proinflamatuvar sitokinler gibi enflamatuvar moleküllerin üretilmesi ile ilişkilidir. Bu süreç, fibroblastların immün yanıtlarını düzenlerken aynı zamanda hücre-hücre etkileşimlerinin önemini ortaya koyar. Nemozis fenomeni, hücrelerin bir araya gelerek oluşturdukları kompakt yapının, hücre ölümü ve immün yanıtlar üzerinde nasıl etkili olduğunu anlamada önemli bilgiler sunar (54).

Sferoidler, doku içi etkileşimleri modüle etmek ve tedavi süreçlerinde hücrelerin verdiği yanıtları anlamak için ideal bir model sunar. Örneğin, fibronektin-integrin etkileşiminin sferoid formasyonu üzerindeki etkileri, sferoidlerin kompakt yapılar oluşturmasını ve immünolojik süreçlerin düzenlenmesini sağlamaktadır. Bu bağlamda, sferoid kültürleri, hücrel dinamiklerin ve immün yanıtların daha derinlemesine anlaşılmasına olanak tanır (54).

2.4. Fibroblast Sferoidlerinin Yapısal ve Biyolojik Özellikleri

Fibroblast sferoidleri, hücrelerin yoğun bir şekilde organize olduğu üç boyutlu küresel yapılardır. Bu yapıların oluşumu sırasında hücreler arasında kaderin-medyatörlü hücre-hücre bağlantıları gelişir ve hücreler kendi ECM proteinlerini

sentezlemeye başlar. Fibroblastlar, sferoid oluşumu sırasında kolajen, fibronektin, laminin gibi önemli ECM bileşenlerini sentezleyerek, hücreler arasında yapısal ve fonksiyonel bütünlük sağlarlar (45). Bu ECM bileşenleri, fibroblast sferoidlerinin uzamsal organizasyonunu ve mekanik stabilitesini güçlendirir.

Fibroblast sferoidlerinin bir diğer biyolojik özelliği, hücrelerin mekanik stres ve hipoksi koşullarına gösterdikleri yanıttır. Sferoidin dış tabakasında bulunan hücreler, genellikle oksijen ve besin maddelerine daha fazla erişim sağlar ve metabolik olarak daha aktiftir. İç tabakadaki hücreler ise düşük oksijen koşullarında (hipoksi) bulunur ve daha az proliferatif olabilir (16). Bu heterojen yapı, fibroblastların *in-vivo* doku onarımı süreçlerinde organizasyonlarını ve rejeneratif yanıtlarını anlamak için önemli bir model sunar.

Fibroblastlar, yara iyileşmesi sırasında aktif rol oynayan ana hücrelerden biridir. Fibroblast sferoid kültürleri, doku hasarı durumlarında fibroblastların davranışını ve ECM üretim süreçlerini anlamak için önemli bir model sağlar (55). Sferoid kültürleri, özellikle yara iyileşmesi sırasında fibroblastların göç, proliferasyon ve ECM sentezini nasıl koordine ettiğini incelemek için kullanılır. Bu sferoid modelleri, yara iyileşmesini hızlandıran veya geciktiren faktörlerin incelenmesine ve potansiyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanır.

Yara iyileşmesi araştırmalarında, fibroblast sferoidlerinin ECM üretimi ve reorganizasyonu, hücre hareketliliği ve yara bölgesine göç süreçleri incelenir. Sferoid kültürleri, ayrıca yeni ilaçların yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için de kullanılmaktadır. Örneğin, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi biyolojik moleküllerin fibroblast sferoidleri üzerindeki etkileri test edilerek, yeni terapötik stratejiler geliştirilebilir (56).

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta fibroblast sferoidleri, üç boyutlu doku modelleri geliştirmek için kullanılmaktadır. Fibroblastlar, dokuların yapısal destek elemanları olan ECM bileşenlerini sentezleyerek, doku mühendisliği iskelelerinin biyomekanik özelliklerini geliştirirler (57). Fibroblast sferoid kültürleri, çeşitli biyomateryallerle birleştirilerek üç boyutlu doku iskelelerinin oluşturulmasına olanak tanır. Bu iskeleler, doku onarımını teşvik etmek için hücrelerin organize bir şekilde büyümesini ve fonksiyonel doku yapılarına farklılaşmasını sağlar.

Fibroblast sferoidlerinin doku mühendisliğinde kullanılması, özellikle deri, diş eti, tendon ve diğer bağ dokularının rejenerasyonuna yönelik araştırmalarda önemli bir model sunar. Sferoid kültürleri, fibroblastların biyomateryal yüzeylerine tutunmasını ve ECM sentezini artırarak, rejeneratif potansiyelin artmasına katkı sağlar (58).

Fibroblastlar, fibrozis gibi patolojik durumların gelişiminde de önemli bir rol oynarlar. Fibroblast sferoid kültürleri, bu tip patolojik süreçlerin nasıl geliştiğini anlamak ve fibrozis tedavisinde kullanılabilecek potansiyel stratejileri değerlendirmek için kullanılmaktadır (59). Fibrozis, aşırı ECM üretimi ve dokuların sertleşmesi ile karakterizedir ve fibroblastların anormal proliferasyonu ile ilişkilidir. Fibroblast sferoidleri, bu sürecin biyolojik mekanizmalarını ve olası terapötik müdahalelerin etkilerini anlamada önemli bir model sağlar.

Fibrozis araştırmalarında, fibroblast sferoidlerinin ECM üretimi, TGF- β gibi fibrotik sinyallerin etkisi altında nasıl değiştiği incelenir. Bu modeller, antifibrotik tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Özellikle, fibrozis gelişiminin erken evrelerinde fibroblast davranışlarını kontrol etmeye yönelik stratejiler, bu sferoid modelleri kullanılarak geliştirilebilir (60).

2.5. L929 Hücrelerinin Doku Modelleme Alanında Kullanımı

L929 hücre hattı, biyomedikal araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir fibroblast hücre hattıdır ve orijinal olarak fare (Mus-musculus) bağ dokusundan türetilmiştir. İlk olarak Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC) tarafından tanımlanmış olan bu hücre hattı, biyomateryallerin sitotoksikite testlerinde ve biyouyumluluk çalışmalarında standart bir model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. L929 hücreleri, yüksek proliferasyon yetenekleri ve kültür koşullarına karşı gösterdikleri dayanıklılık özellikleri ile tercih edilir. Bu hücre hattı, özellikle yumuşak doku rejenerasyonu ve inflamasyon süreçlerini inceleyen çalışmalar için temel bir model olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, biyomalzemelerin sitotoksikitesini test etmek için kullanılan standart hücre hattıdır (61) Hücrelerin biyomateryal yüzeylerine tutunma, çoğalma ve ECM üretim kapasiteleri, bu materyallerin biyolojik ortamlarda nasıl tepki vereceğini anlamak için önemli bir göstergedir. L929 hücreleri, kararlı büyüme paterni ve tekrar çalışmalarının birbiriyle tutarlılığı gibi özellikleri göz önünde

bulundurulduğunda biyomateryallerin biyoyumluluğunun ve doku mühendisliği iskelelerinin test edilmesinde kritik rol oynar (62).

2.6. Sferoid Kültürlerinde L929 Hücrelerinin Kullanımı

L929 hücre hattı, sferoid kültür sistemleri içinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Sferoidler, hücrelerin üç boyutlu bir ortamda organize olduğu ve *in-vivo* mikro çevreye daha yakın koşullarda büyüdüğü hücre topluluklarıdır. L929 hücreleri, davranışsal özellikleri nedeniyle, üç boyutlu sferoid yapılar oluşturarak hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerini incelemek için değerli bir model sağlar (63).

Fibroblastlar, sferoid kültürlerinde ekstraselüler matriks bileşenlerini sentezleyerek hücreler arası etkileşimlerin organizasyonunu sağlarlar. L929 hücrelerinden oluşturulan sferoidler, fibroblastların bağ dokusu organizasyonundaki davranışlarını incelemek için kullanılır. Bu hücre hattı, sferoid yapıları içinde kompakt bir organizasyon sergiler ve hücrelerin doğal mikro çevrelerinde sergiledikleri davranışları taklit eder (63, 64).

Sferoid kültür sistemlerinde L929 hücrelerinin kullanımı, özellikle doku mühendisliği ve ilaç testleri için önemlidir ve hücrelerin kimyasal maddelere, ilaçlara ve biyomalzemelere nasıl tepki verdiğini değerlendirmek için tercih edilirler. Hücrelerin sferoid yapı içinde organize olması, fizyolojik koşulların *in-vitro* olarak taklit edilmesini sağlar. Bu nedenle, L929 sferoid kültürleri, yeni terapötik yaklaşımların ve biyomalzemelerin test edilmesinde önemli bir araçtır (65).

2.7. L929 Hücrelerinin Sferoid Kültürlerde Sağladığı Avantajlar

2.7.1. Doğal Doku Mikro Çevresini Taklit Etme

L929 hücrelerinden elde edilen sferoidler, fibroblastların doğal ortamına daha yakın hücreler arası davranışlar sergilemesini sağlar. Bu hücre hattı, hücrelerin üç boyutlu bir yapı içinde ECM bileşenlerini sentezlemesini ve hücre-hücre etkileşimlerini geliştirmesini teşvik eder. Bu özellikler, özellikle bağ dokusu modellenmesi ve doku rejenerasyonu çalışmalarında büyük avantaj sağlar (66).

2.7.2. Hücre-Hücre ve Hücre-ECM Etkileşimlerinin İncelenmesi

L929 sferoid kültürleri, fibroblastların ECM üretimini ve hücre-hücre etkileşimlerini incelemek için ideal bir platform sunar. Hücrelerin üç boyutlu bir ortamda nasıl organize olduklarını ve ECM bileşenlerini nasıl ürettiklerini anlamak, doku mühendisliği ve yara iyileşmesi araştırmaları için kritik öneme sahiptir (67).

2.7.3. Sitotoksosite ve İlaç Testlerinde Kullanım

L929 sferoid kültürleri, hücrelerin ilaçlara ve kimyasal maddelere karşı verdiği tepkileri incelemek için yaygın olarak kullanılır. Sferoid modelleri, iki boyutlu kültürlerle kıyasla fizyolojik koşullar sunarak, ilaçların etkilerinin doğru bir şekilde değerlendirilmesine olanak tanır. Bu kültürler, özellikle yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve ilaçların toksisite profillerinin belirlenmesinde kullanılır. Moreno ve arkadaşları L929 hücrelerinin sferoid kültürlerinin iki boyutlu kültürlerine kıyasla sitotoksosite testlerinde daha etkin olduğunu göstermişlerdir (66).

2.8. Doku Modellemede Kolajen ve HA Hidrojellerin Kullanımı

ECM, hücrel dokuları çevreleyen ve yapılarını destekleyen karmaşık bir üç boyutlu ağdır. ECM, sadece hücrel kompartmanları bir arada tutmakla kalmaz, aynı zamanda hücreler için mekanik destek sağlayarak doku homeostazını ve fonksiyonel bütünlüğünü korur (68). ECM, hücre adezyonunu, göçünü, proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenleyen anahtar rol oynayan bir yapı olması nedeniyle, biyomedikal ve doku mühendisliği araştırmalarında büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, ECM bileşenlerinin *in-vitro* kültür modellerine dahil edilmesi, hücrelerin doğal mikro çevresini daha iyi taklit ederek *in-vivo* koşulları daha yakından yansıtır (69).

ECM'nin dört temel bileşeni vardır: kolajen, elastin, glikoprotein ve proteoglikan. Bu bileşenler hücrelerin fonksiyonlarını düzenlerken, aynı zamanda doku esnekliği ve dayanıklılığı sağlar. Kolajen dokuların dayanıklılığını ve gerilme kuvvetlerine karşı direncini artırırken, elastin doku esnekliği sağlar. HA gibi proteoglikanlar ise ECM'de suyu tutarak besinlerin ve metabolitlerin hücreler arasında taşınmasına yardımcı olur. Fibronektin ve laminin gibi glikoproteinler ise hücrelerin

ECM'ye tutunmasını sağlar ve hücre hareketliliğini düzenler. Bu yapısal unsurlar, hücrelerin *in-vivo* ortamda nasıl işlev göreceğini belirleyen en önemli faktörlerdendir (70).

ECM, dokuların gelişimi ve morfogenez sırasında iskele görevi görür. Hücrelerin doku içinde konumlanması, organizasyonu ve işlevlerini yerine getirmesi için gerekli olan bu yapı, hücrelerin adezyon, proliferasyon ve farklılaşmasını düzenleyen sinyallerin iletilmesinde önemli bir rol oynar. ECM bileşenlerinin sentezindeki bozukluklar ya da yapısal anomaliler, pek çok patolojik duruma neden olabilir (70). Bu nedenle ECM'nin biyomimetik bir yaklaşımla *in-vitro* modellerde taklit edilmesi, hücre fonksiyonlarının doğru bir şekilde modellenmesi için büyük öneme sahiptir. ECM'nin sentezinin ve modifikasyonlarının eksik olduğu *in-vitro* modeller, hücrelerin doğal davranışlarını tam anlamıyla taklit edemez ve bu da elde edilen verilerin fizyolojik gerçekliğini yansıtmamasını engelleyebilir (71-73).

2.9. ECM Proteinlerinin Sentezi ve Yapısal Modifikasyonlar

Ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezi, hücre içinde kompleks post-translasyonel modifikasyonlar gerektiren bir süreçtir. Hücre içinde sentezlenen ECM proteinleri, dışarıya çıktıktan sonra proteolitik işlemlerden geçerek doğru yapısal formlarını kazanır. Bu süreçler, ECM bileşenlerinin üç boyutlu yapısal bütünlüğünü sağlamak için kritik öneme sahiptir. Özellikle kolajen gibi büyük yapısal proteinler, lizil oksidaz enzimlerinin katalizlediği çapraz bağlanma süreçleri ile mekanik dayanıklılığını kazanırlar. Bu çapraz bağlar, doku homeostazını sağlamada ve mekanik gerilimlere karşı direnç göstermede hayati bir rol oynar (70).

Bu bağlamda kolajen, dokuların yapısal bütünlüğünü koruyan temel ECM proteindir. Kolajen tip I, en yaygın bulunan kolajen türüdür ve bağ dokularında yüksek oranda bulunur. Kolajen fibrilleri, hücreler arası boşlukları doldurarak, doku yapısını koruyan ve hücrelere mekanik destek sağlayan bir matris oluşturur. Kolajenin yüksek biyoyumluluğu ve biyolojik fonksiyonları, onu doku mühendisliğinde kullanılan en popüler materyallerden biri haline getirmiştir (70).

2.10. Kolajen ve HA Hidrojellerin Kullanımı

Hidrojeller, üç boyutlu hücre kültürü ve doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan biyomimetik iskele materyalleridir. Kolajen ve HA gibi doğal bileşenlerden oluşturulan hidrojeller, hücrelerin büyümesi, çoğalması ve fonksiyonel doku yapılarına farklılaşması için ideal bir ortam sağlar (74, 75). Kolajen, doğal ECM'nin temel bileşeni olarak, hücreler için doğal bir iskele görevi görürken, HA hücre hareketliliğini ve doku onarımını teşvik eden önemli bir proteoglikandır (76). Bu iki bileşenin kombinasyonu, hücreler için ideal bir mikro çevre sağlayarak, hücre işlevlerinin daha iyi taklit edilmesine olanak tanır (77).

Kolajen hidrojeller, biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmakta olup, bağ dokusu mühendisliği, yara onarımı ve doku rejenerasyonu araştırmalarında önemli bir yer tutar. Bu hidrojeller, fibroblast hücrelerinin üç boyutlu bir ortamda organize olmasına ve ECM üretmelerine olanak tanır. Hücrelerin kolajen içindeki proliferasyon kapasitesi, ECM üretimi ve mekanik streslere yanıtları, doku mühendisliği çalışmalarında değerlendirilen başlıca parametrelerdir (78).

HA, özellikle doku esnekliği ve su tutma kapasitesi ile tanınır. Bu nedenle, HA bazlı hidrojeller, hücrelerin hareket kabiliyetini artırmak ve doku rejenerasyonunu teşvik etmek için kullanılır (74, 79). HA yüksek su tutma kapasitesi, hücrelerin metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli besin ve oksijenin taşınmasına yardımcı olur (80). Ayrıca, yara iyileşmesi ve dokuların onarımı süreçlerinde önemli rol oynayan HA, hücre göçünü ve proliferasyonunu teşvik eder (81).

Tez kapsamında, oluşturulan sferoid hücre kültürleri, farklı oranlarda kolajen ve HA hidrojelleri içerisine gömülerek *in-vivo* koşulların daha iyi taklit edilmesi hedeflenmektedir. Kolajen ve HA, hücrelerin mekanik destek alması ve metabolik aktivitelerinin sürdürülmesi için ideal bir ortam sağlar. Böylece, hücrelerin doğal ortamlarına benzer bir mikro çevrede, hücre proliferasyonu, ECM üretimi ve hücre-hücre etkileşimleri daha yakından incelenebilecektir.

Bu çalışma, sferoid hücre kültürlerinin kolajen ve HA hidrojelleri içerisinde değerlendirilmesiyle, hücrelerin *in-vivo* benzeri koşullarda nasıl davrandığını anlamak ve bu süreçlerde ECM'nin rolünü ortaya koymak açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

Literatürde, oral yumuşak doku rejenerasyonu ve fibroblastların üç boyutlu kültür modellerinde incelenmesine yönelik çalışmalar sınırlı kalmaktadır. Mevcut araştırmalar, genellikle iki boyutlu hücre kültürlerine dayanmakta olup, hücrelerin doğal mikro çevrelerini tam olarak taklit edememektedir. Özellikle, fibroblastların *in-vivo* koşullarda gösterdiği hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri, iki boyutlu sistemlerde yeterince incelenememekte ve ECM bileşenlerinin bu süreçlerdeki etkisi yeterince ortaya konulamamaktadır (5, 82-84). Ayrıca, farklı ECM bileşenlerinin (örneğin, kolajen ve HA) fibroblastların proliferasyon, migrasyon ve ECM üretimi üzerindeki etkileri, literatürde yeterince kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır (71, 85-87).

Bu çalışma, literatürdeki eksiklikleri gidermeyi hedeflemekte ve üç boyutlu sferoid kültürleriyle fibroblastların doğal mikro çevresine daha yakın koşullarda nasıl davrandığını incelemektedir. Özellikle, sferoidlerin farklı oranlarda kolajen ve HA hidrojenleri içerisine gömülerek *in-vivo* koşulların taklit edilmesi, hücrelerin ECM ile olan etkileşimlerini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. Bu çalışma, fibroblastların rejeneratif kapasiteleri, hücre canlılığı ve ECM sentezi üzerindeki etkilerini detaylı bir şekilde inceleyerek, oral yumuşak doku mühendisliği ve rejeneratif klinik uygulamalara yönelik yeni biyomalzemelerin üretilmesi ve test edilmesi süreçlerinde katkılar sağlayabilir.

Çalışmanın temel amacı, *in-vitro* ortamda farklı hidrojenler ile insan kaynaklı diş eti fibroblast sferoidleri (otojen kaynaklı) kombine edilerek oluşturulan üç boyutlu bir *in-vitro* model oluşturulmasına katkı sağlamaktır. Bu kapsamda, sferoidlerin kolajen ve HA hidrojenleri içinde büyüme ve rejeneratif potansiyelleri değerlendirilecek, hücrelerin ECM üretimi, metabolik aktiviteleri ve proliferasyon kapasiteleri test edildi. Modelin başarısı, oral yumuşak doku mühendisliği, yara iyileşmesi ve bağ dokusu rejenerasyonu gibi alanlarda uygulanabilir yeni yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Bu modelin gelişme süreci, hücrelerin doğal mikro çevrelerinin mimarisini taklit eden biyomimetik hidrojenlerin kullanılması ve bu hücrelerin ECM bileşenleriyle etkileşimlerinin optimize edilmesine dayanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu çalışma, *in-vitro* bir doku modeli elde edilmesi amacıyla, insan kaynaklı fibroblast hücrelerin (otojen) ve ticari fare fibroblast hücreleri (L929) sferoidlerinin (zenojen) *in-vitro* ortamda kolajen ve HA hidrojelere içerisinde büyüme ve rejeneratif kapasitelerinin değerlendirilmesine dayanan deneysel translasyonel bir araştırmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Çalışmanın klinik örnekleri Dokuz Eylül Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı Kliniğinde çalışmaya dahil etme kriterlerini karşılayan ve bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayan hastalardan elde edildi. *İn-vitro* deneyler Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütüldü. Bu tez çalışması, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2023-3102 numaralı proje ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından 32492 numaralı proje ile desteklenmiştir. Araştırma planı tablo 1’de sunulmaktadır.

Tablo 1: Araştırma planı

Haziran- Aralık 2022	Etik kurul onayı
	Tez önerisi sunumu ve kabulü
Ocak- Mart 2023	Proje başvurusu (BAP/TÜSEB)
	Örneklem oluşturulması
Mart- Haziran 2023	Projenin kabulü
	Gerekli malzemelerin tedariki
Haziran- Eylül 2023	Diş eti fibroblastlarının izolasyonu
	Diş eti fibroblastlarının validasyonu
Eylül- Aralık 2023	Ekstraselüler matriks bileşenlerinin optimum oranlarının belirlenmesi
	Sferoid optimizasyonu
Ocak- Haziran 2024	Diş eti ve L929 fibroblast sferoidlerinin oluşturulması ve takip edilmesi
	Sferoidlerin farklı oranlardaki ekstraselüler matriks bileşenleri ile etkileşiminin incelenmesi
Haziran-Aralık 2024	Örneklerin analiz edilmesi ve istatistiksel analizler
	Tez yazım aşaması

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu tezde primer izole insan diş eti fibroblast hücresi ve L929 hücre hattı olmak üzere iki farklı fibroblast hücresi araştırmaya dahil edildi. İnsan-kaynaklı primer hücrelerinin değerlendirilmesi için ticari hücre hattının kontrol grubu olarak kullanılması amaçlandı.

Bu tez çalışmasında, diş eti fibroblastı sferoidi-hidrojel ilişkisinin değerlendirilmesi için insan-kaynaklı diş eti fibroblast hücrelerinin kullanılması planlandı. Diş eti fibroblast hücrelerinin elde edilmesi için Dokuz Eylül Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne başvuran gönüllüler çalışmanın örneklem havuzu olarak seçildi. Periodontoloji kliniğinde gingivektomi ve/veya kuron boyu yükseltme ve/veya diş çekimi gibi cerrahi operasyonlarda rutin olarak rezeke edilen periodontal olarak sağlıklı diş eti dokuları toplandı.

3.3.1. Dahil Edilme Kriterleri

- 18-80 yaş aralığında olmak
- Gingivektomi/ kuron boyu yükseltme/ diş çekimi operasyonlarından en az biri için kliniğe başvurmuş olmak
- Cerrahi edilecek bölgede periodontal inflamasyon olmaması (Plak ve kanama değerinin %10'un altında olması ve cep derinliğinin <4 mm olması, klinik ataşman kaybının bulunmaması)
- Sistemik olarak sağlıklı olmak
- Çalışmaya dahil olmaya gönüllü olmak

3.3.2. Dışlama Kriterleri

- 18 yaşından küçük, 80 yaşından büyük olmak
- Sigara kullanıyor olmak
- Son 6 ay içinde antibiyotik/steroid kullanmış olmak
- İmmün baskılayıcı tedavi altında olmak
- Çalışmaya gönüllü olmamak
- Çıkarılacak dokunun 1 mm³'ten küçük olması

Bu çalışma dahilinde hasta ile yapılacak tüm adımlar için bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (BGOF) hastaya detaylıca açıklandıktan sonra onam alınarak gerçekleştirilmiştir. Hastanın kimliğine, kişisel bilgilerine ait hiçbir bilgi üçüncü kişiler ile paylaşılmamış, hasta dokuları numaralandırılarak belirlenmiş ve bilgileri KVKK'ya uygun olacak şekilde gizli tutulmuştur.

3.4. Çalışma Materyali

Bu araştırmada kullanılan çalışma materyali, insan kaynaklı diş eti doku örnekleri ve L929 hücre hattıdır. İnsan kaynaklı doku örnekleri, Dokuz Eylül Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Kliniği'nden temin edilen ve gönüllü hastalardan alınan diş eti dokularıdır. Doku örnekleri, gingivektomi veya kuron boyu yükseltme gibi cerrahi işlemler sırasında elde edilmiştir. Çalışma materyali olarak kullanılan ticari hücre hattı ise ATCC kaynaklı L929 fare fibroblast hücre hattıdır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

3.5.1. Bağımsız Değişkenler

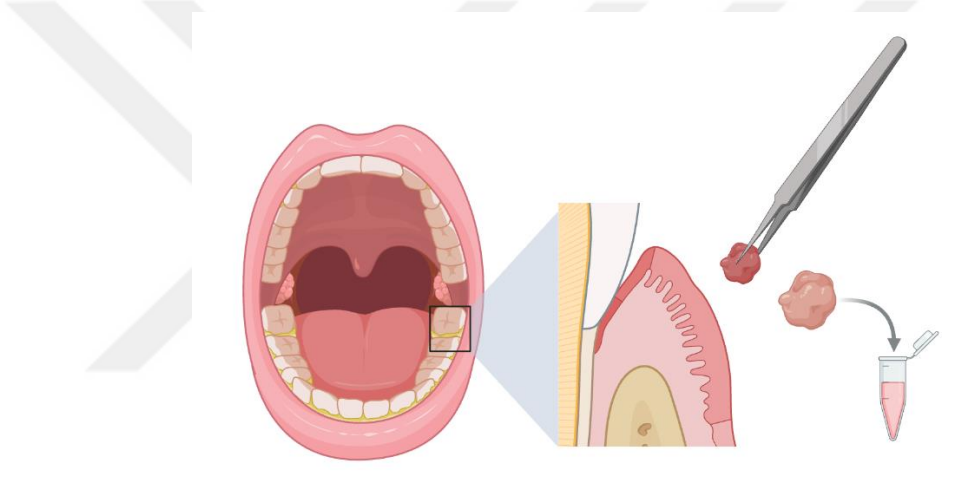
- Hidrojel türü (Tip 1 Kolajen Hidrojel, HA Hidrojel)
- Hücre türü (İnsan kaynaklı diş eti fibroblastları, L929 fare fibroblast hücre hattı)
- Hidrojel oranları (%100 Kolajen Hidrojel, %100 HA Hidrojel, 1:1 Kolajen/HA, 2:3 Kolajen/HA, 3:2 Kolajen/HA)

3.5.2. Bağımlı Değişkenler

- Sferoid hacmi (sferoidlerin inkübasyon süresi boyunca hacmindeki değişim)
- Hücresel proliferasyon indeksi
- Metabolik aktivite düzeyi (resazurin bazlı testle ölçülen mitokondriyal aktivite)
- Yara kapanma hızı (hidrojel türüne göre hücre migrasyon hızının değerlendirilmesi)

3.6. İnsan Dişeti Fibroblastlarının İzole Edilmesi ve İdamesi

BGOF'u imzalayarak katılmayı kabul edip, çalışmaya dahil edilen altı sistemik ve periodontal olarak sağlıklı bireye uygulanan cerrahi prosedürler sonrası elde edilen dişeti doku parçaları, ivedilikle +4°C'de, 1 ml'lik santrifüj tüplerinde bulunan hücre kültürü ortamı (%20 FBS + %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş RPMI-1640) içerisine aktarılarak en fazla 12 saat içinde soğuk zincirde taşınarak laboratuvara iletildi. Hasta mahremiyetinin korunması amacıyla santrifüj tüpleri numaralandırıldı. Altı hastadan toplanan dokulardan 1, 2 ve 3 numaralı dişeti örnekleri, fibroblast izolasyon yönteminin optimizasyonu için kullanıldı. 4, 5 ve 6 numaralı hastalardan elde edilen fibroblastlar ise deneylerde kullanılmak ve saklanmak üzere ayrıldı.

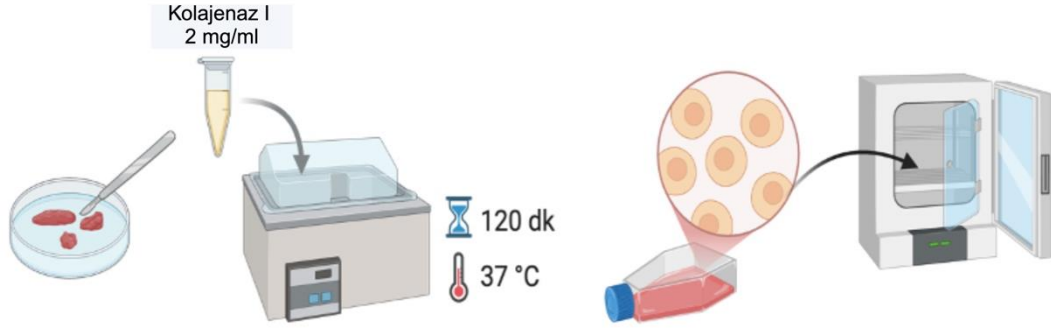


Şekil 1: İnsan diş eti dokusunun ağız içinden elde edilmesi

Rezeke edilen dokular (Şekil 1), fibroblast izolasyonu prosedürüne tabi tutuldu. İlk olarak, klinikten elde edilen dokular kontaminasyon riskine karşı 1x PBS ile 5 kez yıkandı. Ardından, 11 numaralı cerrahi bistüri kullanılarak mekanik parçalama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında dokular, son konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde Kolajenaz I enzimi (17018029, Thermofisher Scientific, ABD) içinde inkübasyona alındı ve hareketli su banyosunda 37°C'de iki saat boyunca inkübe edildi (Şekil 2).

İnkübasyonun ardından, hücre sayımı tripan mavisi kullanılarak yapıldı ve elde edilen hücre sayısı kaydedildi. Yeterli hücre sayısına ulaşıldığında ($2,5 \times 10^6$), hücrelerin doku artıklarından ayrıştırılması için örnekler 100 µm'lik naylon filtreden (Falcon, BD Bioscience, NJ, ABD) geçirildi ve ardından 10 dakika boyunca 1500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant alındıktan sonra hücreler, taze hücre kültür

ortamında yeniden süspansiyon edilerek, 10^5 hücre/cm² yoğunluğunda olacak şekilde 25 cm²'lik polistiren flaklara (Corning, Corning, NY, ABD) ekildi. Hücrelerin gelişimi, ters ışık mikroskobu ile günlük olarak görüntülendi ve görüntüler kaydedildi.



Şekil 2: Hastalardan alınan dokulardan kollajenaz I enzimi kullanılarak hücrelerin izole edilmesi

Hücre kültür ortamı olarak Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) yüksek glukoz ortamına (Thermo Fisher, (10569010) ABD) ek olarak %20 v/v FBS, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD), ve 50 µg/ml Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) (Perpotech recombinant human FGF-Basic (100.18B.50UG) Gibco, ABD) eklendi. Hücreler %70 konfluense ulaştığında, 0.05% w/v Trypsin/EDTA (Invitrogen, Almanya) kullanılarak flaklardan pasajlandı ve hemositometri lamında sayıldı. 4. pasajda hücreler dondurma solüsyonu (%90 FBS, %10 DMSO) içinde -80°C'de depolanmak üzere donduruldu. Deneylerde kullanılacak hücreler ise 4. pasajdan sonra deney gruplarına alındı. Hücreler polistiren flakta %70 yoğunluğa ulaştıkça pasajlanarak deneyler ve depolamak amacıyla biriktirildi.

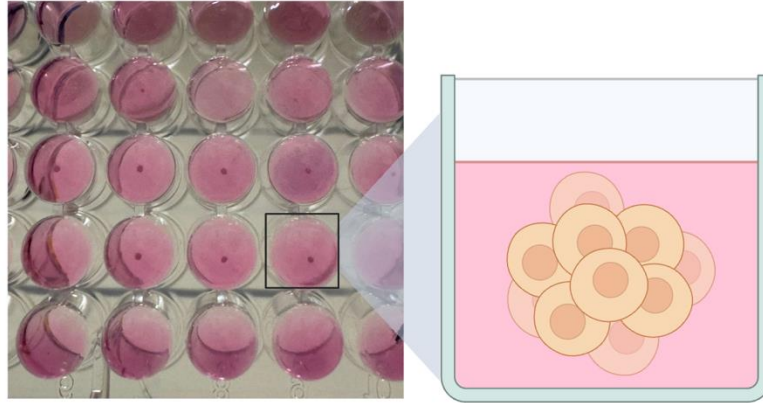
3.7. L929 Hücre Hattının Kültüre Edilmesi

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Translasyonel Onkoloji Ana bilim Dalı envanterinde bulunan L929 hücreleri bu çalışmada insan dış eti fibroblast hücrelerinin davranışlarının ve hücre matris ilişkilerinin değerlendirilmesinde referans olarak kullanıldı. L929 (ATCC, CCL-1) fare fibroblast hücresi DMEM içinde kültüre edilmiş ek olarak %10 FBS ve 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin eklenmiş 37 derecede %5 CO₂ 'de cm²'ye 50.000 hücre düşecek şekilde ekildi (88).

3.8. Sferoidlerin Oluşturulması ve Optimizasyon Testleri

Diş eti fibroblastlardan üç boyutlu sferoid yapılar oluşturmak amacıyla, hücrelerin yüzeye yapışmasını engelleyen özel modifiye yüzeyli 96 kuyucuklu hücre kültürü plakları (Cellstar®, Cell-Repellent Surface, U Bottom) kullanıldı. Deneyler hem L929 fibroblast hücre hattı hem de insan kaynaklı diş eti fibroblastlar üzerinde eş zamanlı olarak yürütüldü.

Geleneksel iki boyutlu kültür yöntemiyle büyütülen hücreler, optimal sferoid için gereken hücre miktarının belirlenmesi için, her bir kuyucuğa sırasıyla 2.000, 5.000 ve 10.000 hücre ekilerek gerçekleştirildi. Hücreler 11 gün boyunca günlük olarak ters ışık mikroskopunda fotoğraflanarak takip edildi ve büyüme davranışları ImageJ programı kullanılarak yapılan ölçümler ile yaşam eğrileri oluşturularak değerlendirildi.



Şekil 3: Hidrofobik 96 kuyucuklar kullanılarak sferoid oluşturulması

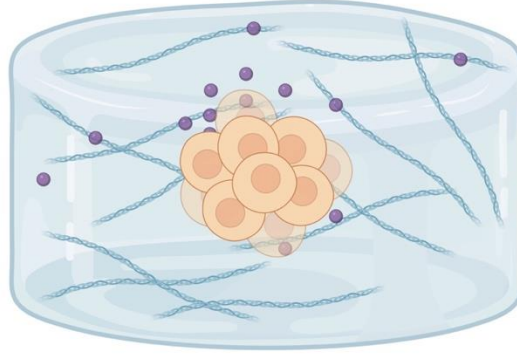
Her kuyucuğa 5.000 hücre ekilerek deneyler yürütüldü (Şekil 3). Hücreler, 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilerek üç boyutlu sferoid ko-kültür sentezi tamamlanana kadar inkübasyon devam ettirildi. Hücre kümelenmeleri, hücre kontraksiyonu ve büyüme eğrisi sekiz gün boyunca takip edildi.

3.9. Hidrojellerin Hazırlanması

Hidrojeller için *Rat Tail Collagen* (5153, Advanced Biomatrix) ve *Thiol-Modified Hyaluronan Hydrogel Kit* (GS310, Advanced Biomatrix) kullanıldı. 4 mg/ml kolajen, hücre kültürü ortamı ile son konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde

seyreltildi. Bu süspansiyonun pH'ı 3,5 olarak ölçüldü, jelleşmeyi sağlaması ve hücre kültüründe kullanılabilir olması için 1M NaOH ile pH'ı 7,3'e ulaşana kadar titre edildi.

HA hidrojel hazırlanırken, kit içeriğindeki glikozil ve *extralink-Lite* sırasıyla 1ml ve 0.5 ml olacak şekilde kit içeriğindeki distile su ile çözdürüldü. Şeffaf ve visköz yapıda homojen hale gelene kadar vortekslendi. Daha sonra 1:4 oranında *extralink-Lite*/ glikozil eklenip pipetleme yöntemiyle karıştırıldı.



Şekil 4: Elde edilen sferoid kümesinin hidrojel içerisine ekilerek oluşturulan üç boyutlu yapı.

3.9.1. Sferoidlerin Hidrojel İçine Gömülmesi

96 kuyucuk içerisinde en az 3 tekrarlı olacak şekilde hidrojel grupları (%100 Kolajen, 3:2 Kolajen/HA, 1:1 Kolajen/HA, 2:3 Kolajen/HA ve %100 HA) oluşturuldu. Her bir sferoid BSA ile kaplanmış pipet ucu ile tek tek alınıp, 100 µL hidrojel ile birlikte 96-kuyucuklu plağa buz üzerinde ekildi (89). Ekim işlemi tamamlandıktan sonra plaka ters çevrilip 37°C karbondioksit inkübatöründe jel formunu alması için inkübe edildi (Şekil 4). 90 dakika sonra jelleşen hidrojellerin üzerine hücre kültürü ortamı eklendi.

3.9.2. Üç Boyutlu Hidrojellere Gömülü Sferoidlerin Yapısal Değişikliklerinin ve Davranışlarının İncelenmesi

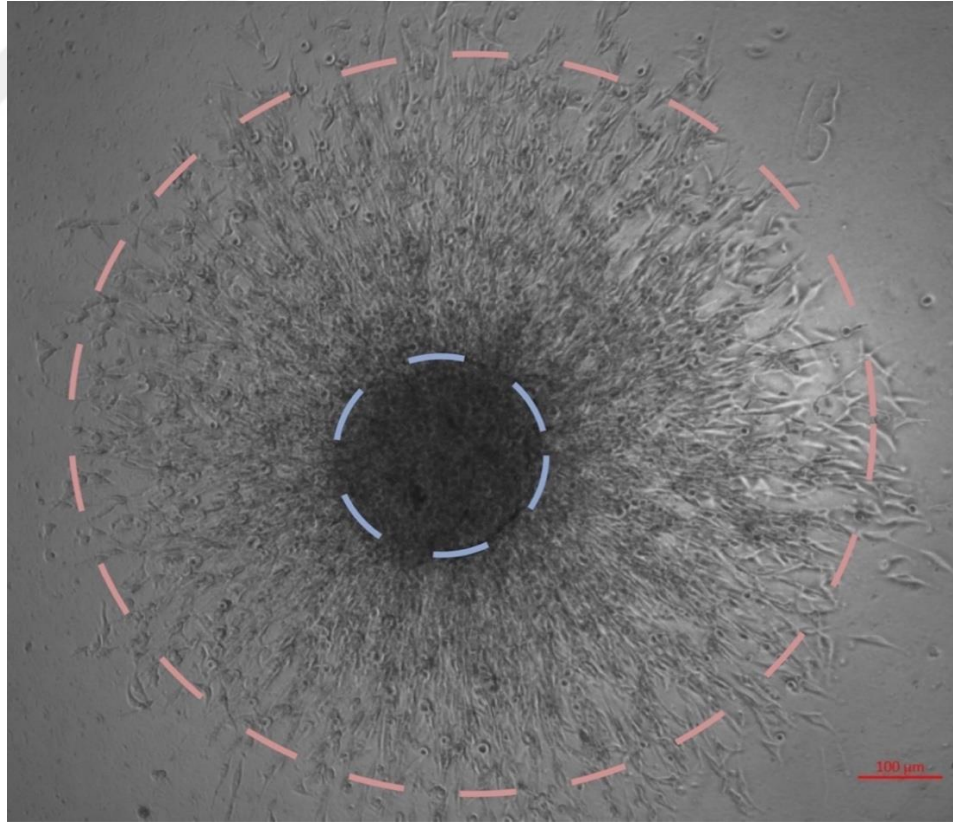
Sferoidlerin büyüme dinamikleri, her 24 saatte bir 8 gün boyunca görüntülendi. Sferoidlerin görüntülenmesi, ters ışık mikroskobunda gerçekleştirildi. Elde edilen görüntüler, ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edildi. Sferoidlerin en ve yükseklik ölçümleri yapılarak bu veriler “x” ve “y” değerleri olarak kaydedildi. Daha sonra

sferoid hacminin hesaplanması için yarıçap (r) değeri $\sqrt{x.y}$ formülüyle hesaplandı. Hesaplanan r değeri, küre formülüne ($V = 4/3.\pi.r^3$) uyarlanarak sferoid hacim değeri elde edildi. Sferoid çevresinde oluşan uzantılar yarıçap ölçümüne dahil edilmedi.

3.9.3. İnvazyon Analizi

Sferoidler çeşitli hidrojeller içerisine gömüldüğünde matriks içerisine uzantılar gerçekleştirebilir. Bu uzantıların ölçülmesi için hidrojellerin içine gömülen sferoidlerin uzantılarının hacimlerine oranı ölçülerek invazyon miktarı değerlendirildi. Günlük olarak 8 gün boyunca alınan fotoğraflar incelenerek her bir sferoidin matriks içerisine invazyon mesafesi ImageJ programı yardımıyla ölçüldü.

Likit ortam içinde hazırlanan sferoidlerin aksine, hidrojel içine gömülen sferoidlerin etrafında hücrelerin tutunabileceği bir matriks yapısı sağlanmış olur. Hücreler çevresel sinyalleri algılamak ve bunlara yanıt verebilmek için matriks içine uzantılar yaparlar. Uzantı gözlenen örneklerde uzantı çapı (kırmızı çember) ölçülerek sferoid çapına (mavi çember) oranlanarak hesaplandı (Şekil 5).



Şekil 5: Hücre uzantılarının hesaplanması

3.9.4. Araştırmacı Kalibrasyonu

Ölçümler gruplara kör araştırmacı (BTY) tarafından yapıldı. Araştırmacı kalibrasyonu, seçilen 15 örnek üzerinde, tek araştırmacı tarafından 2 gün arayla yapılan tekrarlayan ölçümlerle değerlendirildi. Ölçümler arasındaki uyumu analiz etmek için çift yönlü rastgele etki modeli (*two-way random effects model*) kullanılarak araştırmacının korelasyon katsayısı SPSS programı ile hesaplandı. Bu değer 0,92 olarak bulundu ve ölçümlerin yüksek düzeyde güvenilir olduğu doğrulandı.

3.9.5. Hücre Canlılık Testi

Metabolik aktivite ölçümleri, resazurin bazlı bir sitotoksisite tespit yöntemi olan Presto Mavisi testi kullanılarak beş tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Weselsky tarafından keşfedilen resazurin, hücre metabolik aktivitenin bir göstergesidir. Jel içerisinde gömülü sferoidlerin metabolik aktivite tayini için resazurin tabanlı presto mavisi (A13261, ThermoFisher Scientific) ajanı ile ölçüldü. 4. ve 8. günlerde, gömülü sferoidlerin hücre kültürü ortamları aspire edildi. 1:10 oranında presto mavisi içeren 100 µl hücre kültürü ortamı ile 3 saat boyunca 37°C hücre kültürü inkübatöründe muamele edildi. Daha sonra presto mavisi içeren ortamlar 96 kuyucuklu plakalarda toplandı ve sferoidler taze ortam ile değiştirildi. Presto mavisi içeren plaka okuyucu (VarioSkan Lux, ThermoFisher Scientific) ile 590 emisyon 560 eksitasyon dalga boyunda absorbans ölçümü alındı. DMEM içinde bulunan hidrojel içerisine gömülmemiş sferoidler kontrol grubu olarak kullanıldı (90).

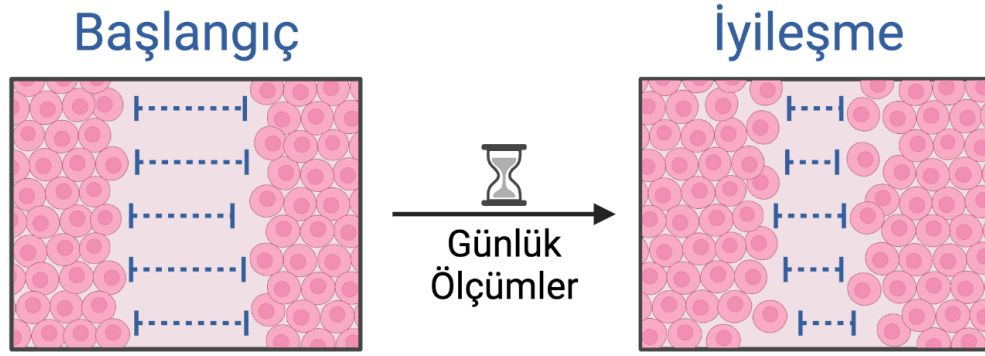
3.9.6. Yara İyileşmesi Deneyi

Kolajen ve HA kullanılarak hazırlanan 5 farklı hidrojin hücre migrasyonuna etkisinin değerlendirilmesi için L929 hücreleri kullanılarak flask üzerinde yara iyileşmesi deneyi yapıldı (Şekil 6) (91). Hücreler, 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 50.000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler zemini %80 oranında kaplayıncaya kadar inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 100 µL pipet ucu kullanılarak tek bir çizgi halinde yaralar çizildi ve farklı oranlardaki hidrojel (Kolajen, 3:2 Kolajen/HA, 1:1 Kolajen/HA, 2:3 Kolajen/HA ve HA) ile kaplandı. Pozitif kontrol olarak 1 adet matriks içermeyen kuyu ortam ile izlendi. Yaranın kapanma hızı 72 saat boyunca her 24 saatte

bir ters mikroskopi (Zeiss, Axio Vert-A1) yöntemi ile görüntülendi. Yara açıklığı çekilen fotoğrafın üst, orta ve alt 1/3'lük bölümündeki mesafelerin ImageJ yazılımı kullanılarak gruplara kör araştırmacı tarafından ölçüldü ve hesaplandı. Yara kapanma hızı, yara açıklığı formülü ile hesaplandı (Formül 3.1).

$$\left[\frac{(T \text{ zamanındaki yaranın genişliği} - 0 \text{ zamanındaki yaranın genişliği})}{T \text{ zamanındaki yara genişliği}} \times 100 \right] \quad (3.1.)$$

(0 zamanı, yaranın çizildiği ilk anı, T zamanı, inkübasyonun sonundaki anı temsil etmektedir.)



Şekil 7: Yara iyileşmesi deneylerinin illüstrasyonu

3.10. Veri Toplama Araçları

Veri toplama amacıyla kullanılan cihazlar Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan cihazlar

Malzeme Adı	Kullanım Amacı
ESCO, Sınıf 2 biyogüvenlik kabini, Lab. culture plus	Hücre kültürü için steril ortam sağlar
ESCO, Sınıf 2 biyogüvenlik kabini, AC2-4E8	Hücre kültürü için steril ortam sağlar
Hettich Eppendorf, Santrifuj cihazı, D-78532	Hücre kültürü
Beckman Coulter, Minispın, C3486	Hücre kültürü
ESCO, Hücre kültürü CO2 İnkübatörü, CCL-170T-8	Hücre hatlarına yaşam ortamı sağlanması
Thermo Scientific, Hücre kültürü CO2 İnkübatörü, Steri-cycle 371	Hücre hatlarına yaşam ortamı sağlanması
Thermo Scientific, Su banyosu, TSSWB1	Malzemelerin çözdürülmesi, denatüre edilmesi veya ısıtılması
Zeiss, Ters Mikroskop, Axio Vert-A1	Rutin hücre kültürü çalışmaları
Zeiss, Konfokal Mikroskop, LSM 800	Yüksek kalitede 3B görüntüleme
Shimadzu Corp, Analitik Tartı, AP225WD	Kimyasalların hassas tartımı

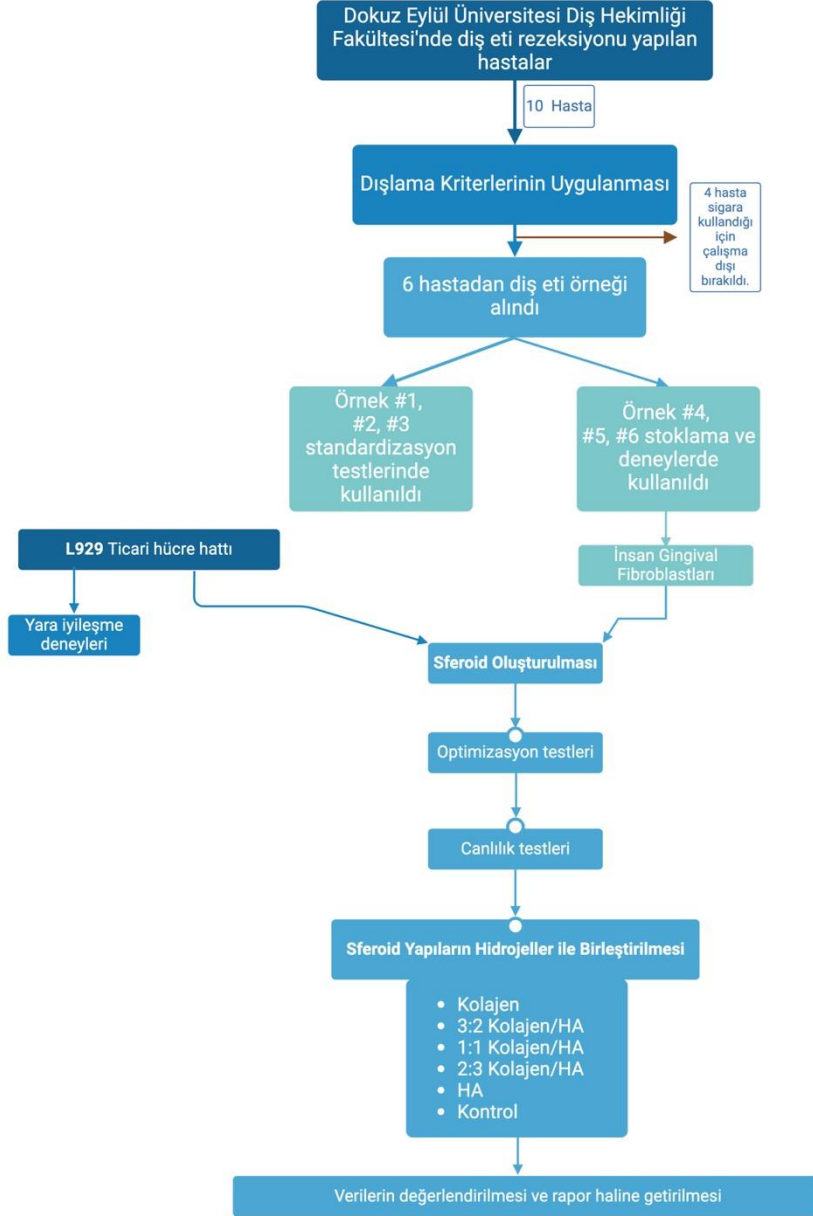
Thermo Scientific, pH ölçer, Orion Star A111	Tampon asitliğinin ayarlanması
Nuve, Otoklav, NC 40M	Hücre kültürü çalışmaları için malzemelerin sterilizasyonunda kullanılır
ITV, Buz Yapıcı, Ice Queen 50	Hücre kültürü ortamında soğuk çalışabilmesi için buz sağlanması
StakPure, Ultra Saf Su Sistemi, Omnia Tap 6 UV	Deneyler için ultra saf su alınacaktır.
MVE, Sıvı Nitrojen Tank, Cryosystem 750	Hücrelerin uzun süreli saklanmasında kullanılacaktır
Thermo Scientific, Sandık Dondurucu (-150 °C), ULT-7150- 9V	Hücre saklanmasında kullanılacaktır
Vestel, Derin Dondurucu, (-80 °C)	Dondurma işleminden sonra hücre pasajlarının saklanması
Derin Dondurucu (-20 °C) (Bosch, Vestel, Arçelik)	Malzemelerin soğuk koşullarda saklanması
Soğutucu (+4 °C) (Bosch, Vestel)	Malzemelerin soğuk koşullarda saklanması

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
DMEM	Cegrogen / e0500-160	Hücre kültürü için ortam
NCTC clone 929	ATCC	Çalışmalarda kullanılan ticari hücre hattı
Fetal bovine serum	Cegrogen / a0500-3030	Büyüme ortamına eklenen serum
Fare Kuyruğu Kolajeni	Advanced biomatrix/ #5153	Hidrojel malzemesi
Thiol-modified hiyalüronat hidrojel	Advanced biomatrix/ gs310f	Hidrojel malzemesi
Prestoblue	A13261	Hücre canlılığı testi
Cell-repellent yüzey, U taban	Greiner / 651970	Sferoid oluşturmada kullanılan 96 kuyucuklu plaka
RPMI 1640	Cegrogen/ e0500-360	Hücre kültürü için ortam
L-glutamine	Cegrogen/ k0100-670	Büyüme ortamına eklenen protein
Penicillin/streptomycin	Cegrogen/ p0100-790	Büyüme ortamına eklenen antibiyotik
Trypsin-EDTA (0.05 %) in PBS	Cegrogen/ N0100-720	Hücre pasajlanması
Flask 25cm ²	Biofil/ tcf011050	Hücre kültürü sarf malzemesi
6 well plate	Biofil/ tcp011006	Hücre kültürü sarf malzemesi
Serolojik pipet 5 ml	Biofil/ GSP010005	Hücre kültürü sarf malzemesi
Serolojik pipet 10 ml	Biofil /GSP010010	Hücre kültürü sarf malzemesi

Santrifüj tüpü 15 ml	Biofil/ CFT011150	Hücre kültürü sarf malzemesi
Fgf-basic 50 ug	Perpotech/100.18b.50ug	Büyüme ortamına eklenen protein



Şekil 8: Akış şeması

3.11. Verilerin Değerlendirilmesi

In-vitro deneylerden elde edilen veriler GraphPad-Prism 10.4.1 (Kalifornia, ABD) program kullanılarak değerlendirildi. Ölçümlerde belirtilen değişkenler standart sapma, medyan (ortanca) ve minimum-maksimum değerleri gösterildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testine göre değerlendirildi. Değerler normal dağılım gösteriyorsa varyansın homojen olup olmadığı Barlett testiyle kontrol edildi. Normal dağılım göstermeyen gruplarda Kruskal Wallis testi ve ek olarak post analiz olarak Dunn testi gerçekleştirildi. Normal dağılım gösteren gruplar için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. İstatistik anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak tanımlandı. Verilerin güvenilirliğini ve geçerliliğini artırmak amacıyla, kullanılan analizlerin doğruluğu için ilgili literatürden referanslar eklendi ve anlamlı bulunan sonuçlar tablolar halinde sunuldu.

3.12. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu araştırma kapsamında, hidrojeller içerisine gömülen sferoid yapıların rejeneratif potansiyelini değerlendirmek amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yapılması planlanmıştır. Ancak, hidrojel içindeki sferoid yapılardan elde edilen hücre sayısı grup başına yaklaşık olarak 50.000 hücre ile sınırlı kalmıştır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için minimum 500.000 hücre gerekliliği nedeniyle, bu analiz gerçekleştirilememiştir.

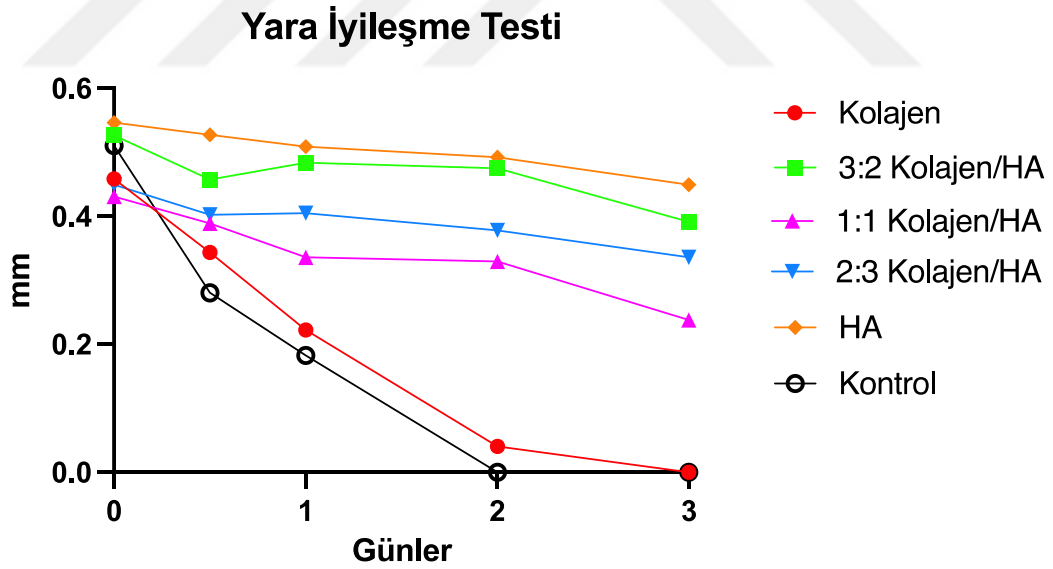
3.13. Etik Kurul Onayı

Bu çalışmaya ilişkin Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 12.10.2022 tarih, 7525-GOA dosya numaralı etik kurul onayı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Ağız ve Diş Sağlığı ve Uygulama ve Araştırma Hastanesi Müdürlüğü'nden gerekli uygulama izinleri alınmıştır.

4. BULGULAR

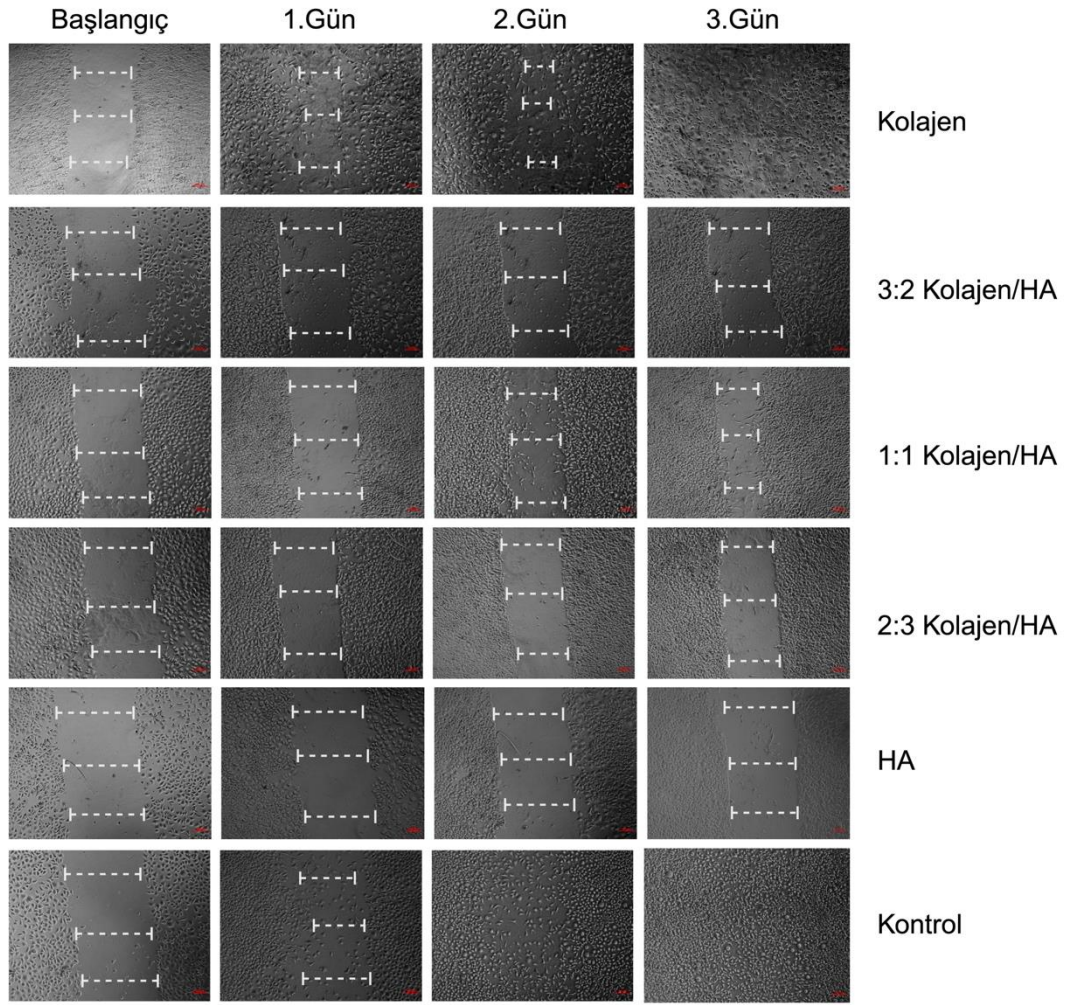
4.1. Yara İyileşme Testi Analizi

Farklı kombinasyonda hazırlanmış hidrojellerin hücre göçü üzerine etkisini değerlendirmek için iki boyutlu L929 hücre kültürlerine yara iyileşmesi testi üç tekrarlı olmak üzere uygulandı. Kontrol grubunda ise hidrojel yerine DMEM ortam kullanıldı. Tüm gruplarda yara kenarlarının 3 günlük takip süresi içinde giderek birbirine yaklaştığı izlendi (Grafik 1). Kolajen hidrojel haricinde diğer hidrojel kombinasyonlarında 3. günün sonunda yara kenarları arasındaki değişim anlamlı bulunmadı. Hidrojel kullanılmayan kontrol grubunda 2. günde ve kolajen hidrojel grubunda 3. günde hücre migrasyonu ile oluşturulan boşluğun tamamen kapandığı görülmektedir (Şekil 8). Başlangıç yara kenarları ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.999$). Gruplar arası fark değerlendirildiğinde 2. ve 3. günde Kolajen grubunda yara kenarları arasında mesafe diğer gruplara göre anlamlı derecede azalmış bulundu ($p=0.0427$).



Grafik 1: Yara kenarları arasındaki mesafenin başlangıç ve 3. günler arasındaki değişimi gösteren grafik.

(3/2 CH: 3:2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)

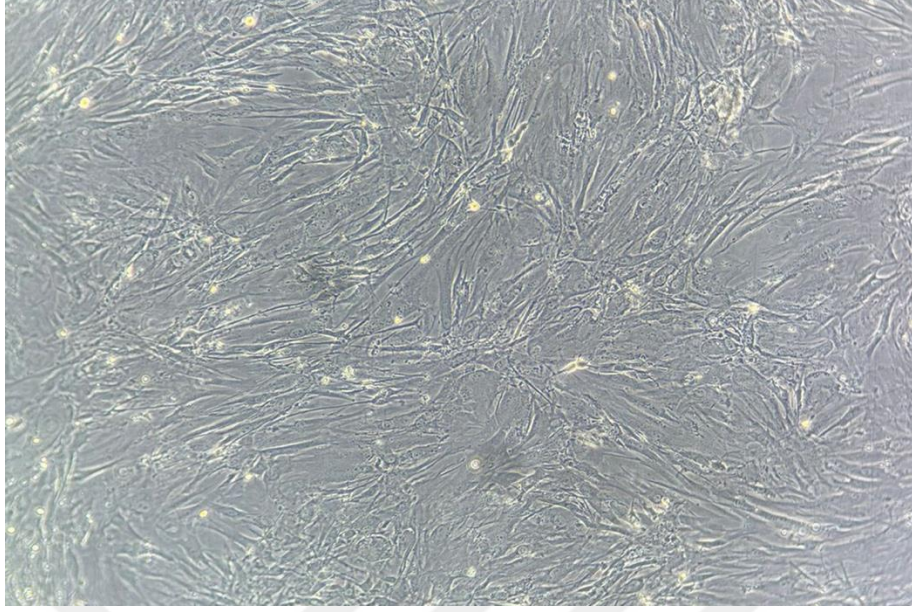


Şekil 9: Farklı hidrojeller içinde hidrojellerin başlangıç ve 3 günlük görüntüleri

(3/2 CH: 3:2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)

4.2. İnsan Diş Eti Dokularından Diş Eti Fibroblast Eldesi

Mekanik ve enzimatik disosiyasyonun ardından elde edilen insan diş eti fibroblastlarının ters mikroskop kullanılarak 10x büyütmede alınan görüntülerinde uygun morfoloji gösterdikleri gözlemlendi.



Şekil 10: İnsandan elde edilen diş eti fibroblast hücrelerinin 10x büyütmede mikroskop altındaki görüntüsü

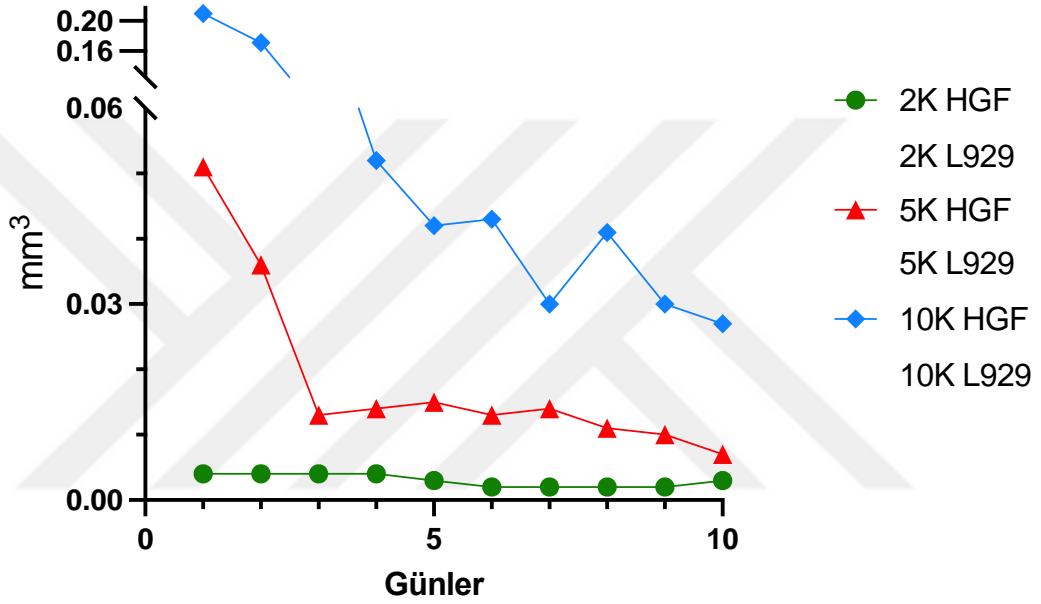
4.3. Optimizasyon Testi

Deney planına göre sferoid yapılar insan dişeti fibroblast hücreleri ve ticari L929 hücreleri sferoid oluşturmak amacıyla 2.000 5.000 ve 10.000 hücre miktarında ekilerek 11 gün boyunca takip edildi. Her bir grup için eğrinin eğimi dikkatle değerlendirildi. Hücre sayısının arttığı ardından plato oluşturduğu günler sferoid oluşumu açısından uygun olarak yorumlandı (Grafik 2). Benzer şekilde sferoid hacminin kontraksiyona uğrayarak hücre kümelenmesini tamamlayıp plato görüntüsü verdiği dönemler de deneylerin gerçekleştirilmesi için yoğun dönemler olarak değerlendirildi. Hücre hacminin plato ardından keskin düşüş gösterdiği durumlar hücre ölümüne işaret edebileceği olarak yorumlandı. Deney planına göre sferoid yapılar insan dişeti fibroblast hücreleri 5.000 ve 10.000 hücre miktarında ekildiğinde, hücre kümelenmeleri ilk 3 ile 5 gün içinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kontraksiyon göstermiştir. Sonrasında, 5.000 hücre içeren insan diş eti fibroblastlarında 3. günden, 10.000 hücre içeren grupta ise 5. günden itibaren plato fazına geçiş gözlemlenmiştir.

2.000 HGF hücresi ile oluşturulan sferoidlerde ise 11 günlük takip süresince hücre kümesi hacminde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim ya da grafikte fark edilen bir eğilim gözlemlenmemiştir.

L929 hücrelerinde hızlı bir hacim artış evresinden sonra 3. günde sferoid formasyonu oluşumu izlenmiştir. L929 ticari hücre hattı ve insan diş eti fibroblast hücrelerinin her ikisinin de 3. günden itibaren plato evresine girdiği ve benzer hacimlerde sferoidler oluşturduğu göz önüne alındığında, hidrojel ile kombine edilen deneylerin her iki gruptan da 5.000'er hücre kullanılarak gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. (Şekil 9)

Optimizasyon Testleri



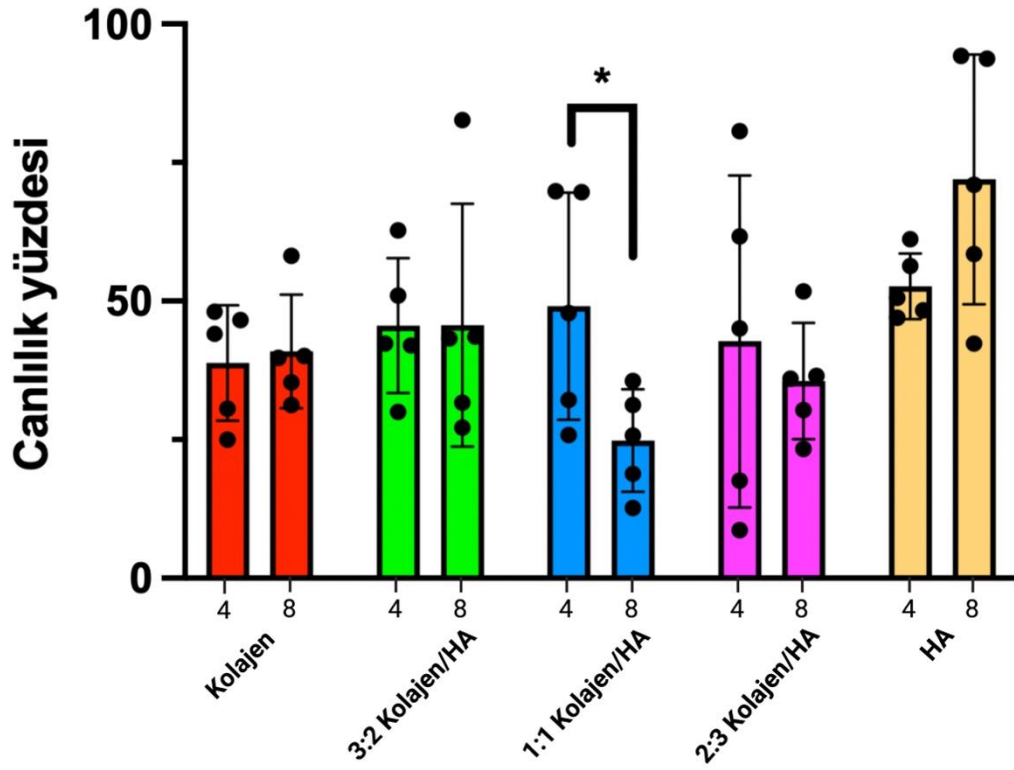
Grafik 2: L929 hücre hattı ve HGF hücrelerin kuyucuklara ekildikten sonra 10 gün boyunca hacimsel değişimlerini gösteren grafik.

(2K HGF: 2.000 insan dişeti fibroblastı, 2K L929: 2.000 L929 hücresi, 5K HGF: 5.000 insan dişeti fibroblastı, 5K L929: 5.000 L929 hücresi, 10K HGF: 10.000 insan dişeti fibroblastı, 10K L929: 10.000 L929 hücresi)

4.4. Metabolik Aktivite ve Proliferasyonun Değerlendirilmesi

Farklı hidrojel kombinasyonlarının sferoidlerin metabolik aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla Kruskal-Wallis testi uygulandı ve kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel farklılık olup olmadığı incelendi (Grafik 3). Bu analiz sonucunda, yalnızca 1:1 Kolajen/HA grubunda toplam canlı hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p=0.0152$). Sonuçlar, farklı hidrojel bileşenlerinin sferoidlerin metabolik aktivitesi üzerinde belirgin bir değişiklik yaratmadığını göstermektedir (Tablo 3).

Canlılık Testi



Grafik 3: Presto mavisi kullanılarak 4. ve 8. günlerde gerçekleştirilen metabolik aktivite analizleri

(3/2 CH: 3:2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit) *: 0.0152

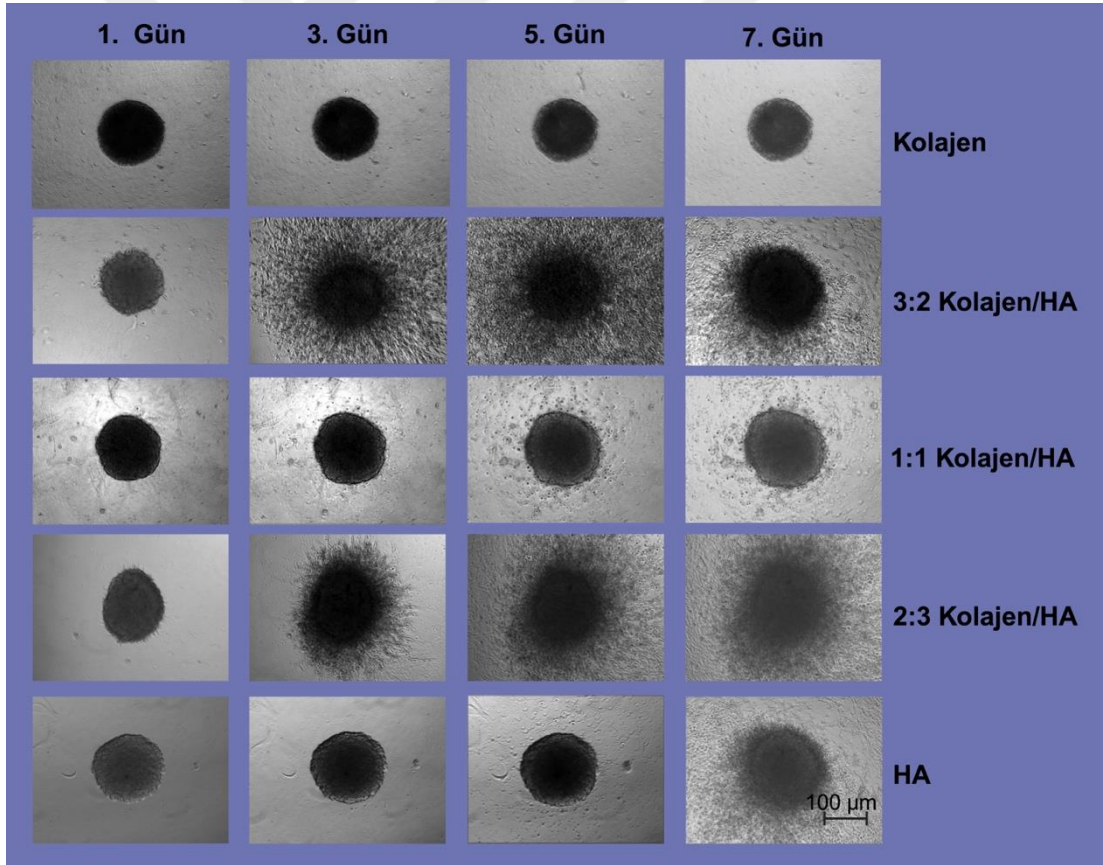
Tablo 4: Canlılık testi verileri

Dunn çoklu karşılaştırma	Ortalama değer farkı	Ortalama 1	Ortalama 2	P değeri
Kontrol veya Kolajen	8	11,50	3,5	0,1312
Kontrol veya 3:2 Kolajen/HA	5	11,50	6,5	0,8239
Kontrol veya 1:1 Kolajen/HA	7	11,50	4,5	0,2590
Kontrol veya 2:3 Kolajen/HA	8	11,50	3,5	0,1312
Kontrol veya HA	2	11,50	9,5	>0,9999

(3/2 CH: 3:2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)

4.5. Hazırlanan Üç Boyutlu Modellerdeki Sferoidlerin Yapısal Değişikliklerinin ve Davranışlarının Değerlendirilmesi

L929 sferoidleri farklı hidrojeller içinde 7 gün boyunca görüntülenmiştir (Şekil 10). Oluşturulan sferoidlerin istatistiksel analizi için, non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi uygulanmış ve post hoc analiz olarak Dunn testi kullanılmıştır. Alfa değeri 0,05 olarak belirlendi. HGF sferoidlerinin hidrojel içerisinde zamana bağlı değişiminin istatistiksel analizlerinden elde edilen p değerleri Tablo 6'da, L929 sferoidlerinin hidrojel içerisinde zamana bağlı değişiminin istatistiksel analiz sonuçları ise Tablo 4'te sunulmuştur. Grupların ortalama hacim değerleri HGF hücreleri için Tablo 7'de, L929 hücreleri için ise Tablo 5'te gösterilmektedir.



Şekil 11: L929 hücre sferoidlerinin farklı hidrojel yapıları içindeki görünümü

(Lejant: 3/2 CH: 3;2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)

Kolajen içerisine gömülen L929 hücre sferoidleri, yapısal olarak minimal bir büzülme göstermesine rağmen 8 gün boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir yapısal değişim tespit edilmedi (Grafik 4). Kolajen hidrojel grubu ile 2:3 Kolajen/HA, 3:2 Kolajen/HA ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.0023$, $p=0.025$, $p=0.0224$).

3:2 Kolajen/HA hidrojel grubu ile kolajen hidrojel grubu arasında istatistiksel anlamlı bir fark olmasına karşın, diğer gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. 2:3 Kolajen/HA ve 3:2 Kolajen/HA gruplarında, sferoidlerin çeperinden zamanla genişleyen invazyon uzantıları gözlemlenirken, 3:2 Kolajen/HA grubunun ortalama sferoid büyüklüğü ölçüldü.

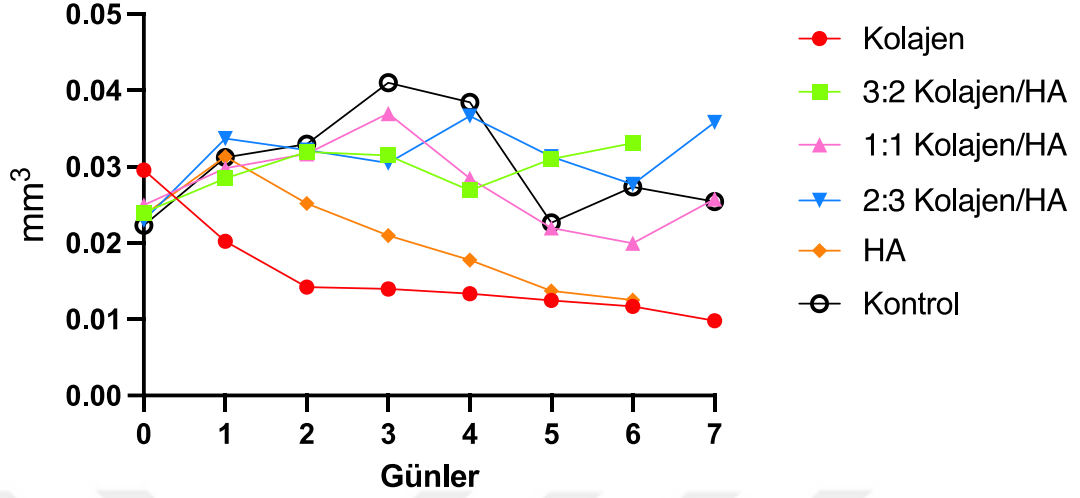
Kolajen ve HA eşit oranlarda karıştırıldığı 1:1 Kolajen/HA grubu ise diğer gruplarla kıyaslandığında sferoid büyüklüğü açısından ortalama bir değer almış ve diğer gruplarla arasında istatistiksel bir fark bulunamadı.

2:3 Kolajen/HA grubu ile kolajen hidrojel grubu karşılaştırıldığında, 6. günde 2:3 Kolajen/HA grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Bu grupta, çeperden hidrojel içerisine doğru uzanan invazyon uzantılarının en yüksek değere ulaştığı gözlemlenmiştir. Uzantı uzunlukları dahil edilmeden yapılan ölçümlerde, en büyük sferoid hacmine sahip grup 2:3 Kolajen/HA hidrojel grubu olarak tespit edildi.

HA hidrojel içerisine ekilen L929 sferoidlerinde, zamanla tutarlı bir hacimsel küçülme görülmesine rağmen, 7. günde izlenen değer ile başlangıç sferoid hacimleri arasında hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

HA hidrojel içerisindeki ortalama sferoid hacmi, ortalama bir değer olarak kaydedildi.

L929 Sferoid Hacmi



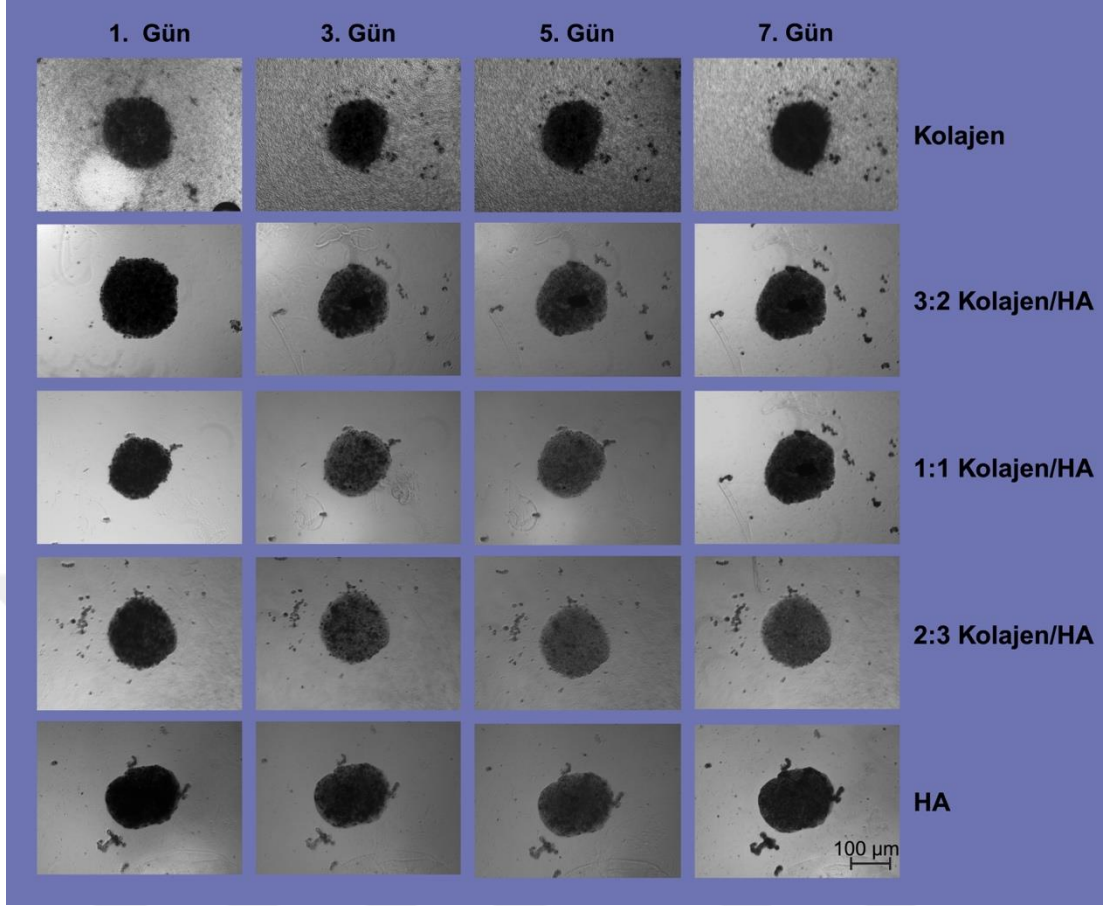
Grafik 4: L929 sferoidlerinin farklı hidrojeller içinde 8 gün boyunca hacim değişimi

(3/2 CH; 3:2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)

Tablo 5: L929 sferoidlerinin hidrojel içerisinde zamana bağlı değişimine bağlı “p” değerleri

Hidrojel Tipi	Kolajen	3:2 Kolajen/HA	1:1 Kolajen/HA	2:3 Kolajen/HA	HA	Kontrol
Kolajen	X	0,0253*	0,1835	0,0023*	>0,9999	0,0224*
3:2 Kolajen/HA	0,0253*	X	>0,9999	>0,9999	0,4496	>0,9999
1:1 Kolajen/HA	0,1835	>0,9999	X	>0,9999	>0,9999	>0,9999
2:3 Kolajen/HA	0,0023*	>0,9999	>0,9999	X	0,0882	>0,9999
HA	>0,9999	0,4496	>0,9999	0,0882	X	0,4505
Kontrol	0,0224*	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4505	X

(3/2 CH: 3:2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)

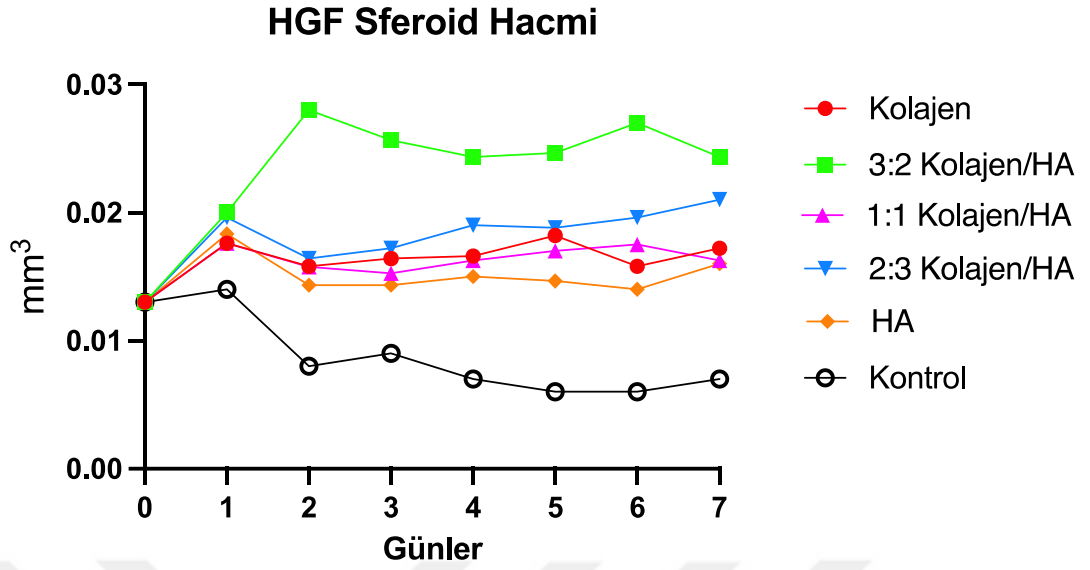


Şekil 12: HGF hücre sferoidlerinin farklı hidrojel yapıları içindeki görünümü

(3/2 CH: 3;2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)

HGF hücreleri kullanılarak oluşturulan sferoidler, farklı kombinasyonlardaki hidrojeller içerisinde incelendiğinde, insan kaynaklı fibroblastların L929 hücre hattından farklı olarak hiçbir grupta sferoid çeperinde uzamsal invazyon yapıları gözlenmedi (Şekil 10). Hacim açısından en büyük ortalamaya ulaşan sferoid yapısı, 3:2 Kolajen/HA hidrojel grubuna gömülerek oluşturulan sferoid olmasına rağmen, yalnızca HA hidrojel ($p=0.0082$) ve kontrol grubu ($p<0.0001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi.

Kolajen ve 1:1 Kolajen/HA grupları incelendiğinde, sferoidlerin gömüldükleri hidrojellerde hacimlerini korudukları ve birbirine benzer hacimlerde sferoid yapıları sergiledikleri belirlendi (Grafik 5).

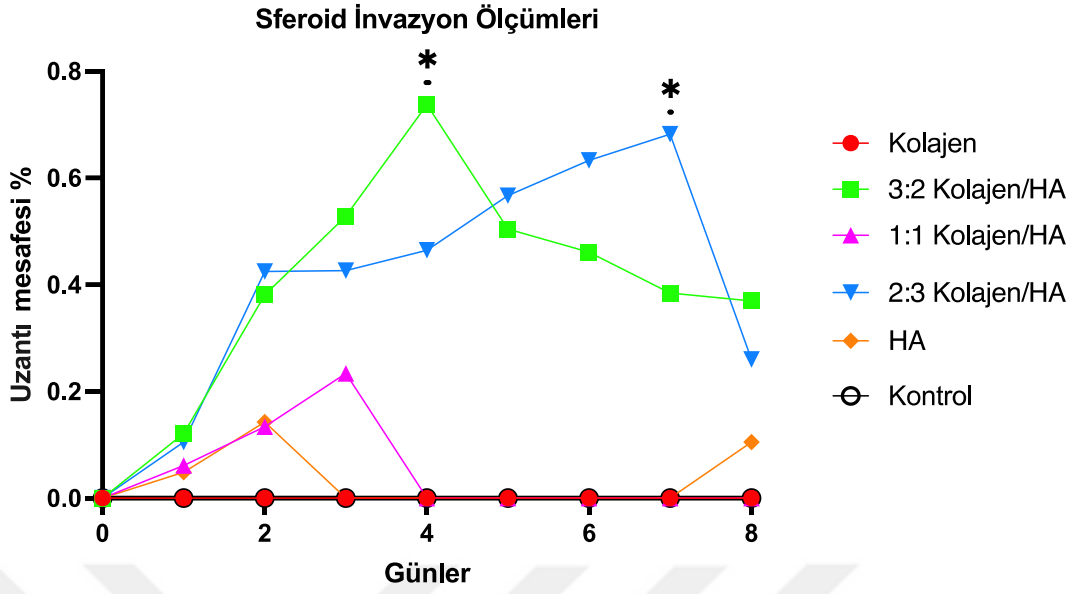


Grafik 5: HGF sferoidlerinin farklı hidrojeller içinde 8 gün boyunca hacim değişimi
(3/2 CH: 3;2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)

Tablo 6: L929 sferoidlerinin hidrojel içerisinde zamana bağlı değişimine bağlı “p” değerleri

Hidrojel	Kolajen	3:2 Kolajen/HA	1:1 Kolajen/HA	2:3 Kolajen/HA	HA	Kontrol
Kolajen	X	0.527	>0.9999	>0.9999	>0.9999	0.0154*
3:2 Kolajen/HA	0.527	X	0.1066	>0.9999	0.0082*	<0.0001*
1:1 Kolajen/HA	>0.9999	0.1066	X	>0.9999	>0.9999	0.1043
2:3 Kolajen/HA	>0.9999	>0.9999	>0.9999	X	0.3603	0.0004*
HA	>0.9999	0.0082*	>0.9999	0.3603	X	0.796
Kontrol	0.0154*	<0.0001*	0.1043	0.0004*	0.796	X

(3/2 CH: 3;2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)



Grafik 6: Zamana bağlı sferoid invazyonu grafiği

(3/2 CH: 3:2 Kolajen / Hiyalüronik asit, 1/1C/H:1:1 Kolajen / Hiyalüronik asit, 2/3 C/H: 2:3 Kolajen / Hiyalüronik asit, HA: Hiyalüronik asit)

Yapılan deneylerde, HGF hücrelerinden elde edilen sferoidlerin hidrojeller içerisine gömüldükten sonra 7 günlük takip boyunca hücre uzantıları oluşturmadığı gözlemlendi. Bu nedenle, HGF grubu için invazyon hesaplamaları yapılmadı. Ancak L929 sferoidleri incelendiğinde, kolajen hidrojel ve kontrol grubu haricindeki gruplarda çeşitli zamanlarda invazyon uzantıları tespit edildi (Grafik 6).

2:3 Kolajen/HA ve 3:2 Kolajen/HA grupları, diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla invazyon gösterdi. 4. günde, 3:2 Kolajen/HA grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı seviyede bulundu ($p=0.036$). 7. günde ise 2:3 Kolajen/HA grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0.0427$) (Grafik 6).

5. TARTIŞMA

Hücre ve doku modelleri, ilaçların ve biyomalzemelerin klinik uygulamaya geçmeden önce etkinliklerinin test edilmesinde kullanılmaktadır. Ancak, iki boyutlu geleneksel hücre kültür teknikleri, klinik koşulların modellenmesinde yetersiz kalabilmektedir. Sferoid hücre kültürünün, klinik koşulların taklit edilmesinde geleneksel hücre kültürü modellerine göre daha avantajlı olduğu bilinmektedir. *İn-vitro* bir diş eti modeli geliştirilmesi ise epitel ve bağ dokusu gibi farklı niteliklere sahip dokuların bir arada bulunması, farklı hücre gruplarının birlikte çalışması ve oral mikrobiyal çevrenin etkisi gibi nedenlerle oldukça karmaşık hale gelmektedir (92, 93).

Günümüzde popüler hale gelen *organ-on-a-chip* ve organoid doku modelleri, farklı yapıya sahip hücrelerin bir arada ikame edilebilmesi, ekstraselüler matriks bileşenlerinin doğru oranda elde edilmesi ve vasküler yapıların yeterince taklit edilememesi gibi sınırlamalar nedeniyle, diş etinin üç boyutlu, gerçeğe uygun bir modelini ve hayvan deneylerine alternatif oluşturabilecek bir yapısını geliştirmek zorlaşmaktadır (94-96). Bu nedenle, periodonsiyumun laboratuvarında modellenebilmesi, biyomalzemelerin *in-vitro* koşullarda değerlendirilebilmesi ve kliniğe hızlı bir şekilde uyarlanabilmesi, önemli bir araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır (97-99).

Sferoid hücre modellerinin, hücrelerin birbiriyle olan üç boyutlu ilişkisini taklit etmedeki en önemli avantajı, hücre-hücre etkileşimlerinin *in-vivo* koşullardaki gibi çoklu yüzey temaslarıyla sağlanması ve hücrelerin polistren flask yüzeyi yerine birbirleriyle daha fazla etkileşime girerek metabolik süreçlerini doğala yakın bir şekilde gerçekleştirebilmesidir (100).

Bu çalışmada, hücrelerin buldukları ortam ile ilişkisini yansıtmak amacıyla ekstraselüler matriks elemanları kullanılarak elde edilmiş hidrojel yapıları ile fibroblast kaynaklı sferoid hücre kültürlerinin kombinasyonu hedeflendi. Tip 1 kolajen ve HA, farklı kombinasyonlarda kullanılarak bu kombinasyonların sferoid hücre kültürlerinin idamesi ve davranışlarına olan etkileri incelendi.

Tip 1 kolajen ve HA, diş eti bağ dokusunda en çok bulunan ve matriksin fiziksel özelliklerini kazanmasını sağlayan temel ekstraselüler matriks elemanları olduğu için tercih edildi (68). Henüz standardize bir diş eti modeli ortaya konulmamış olması

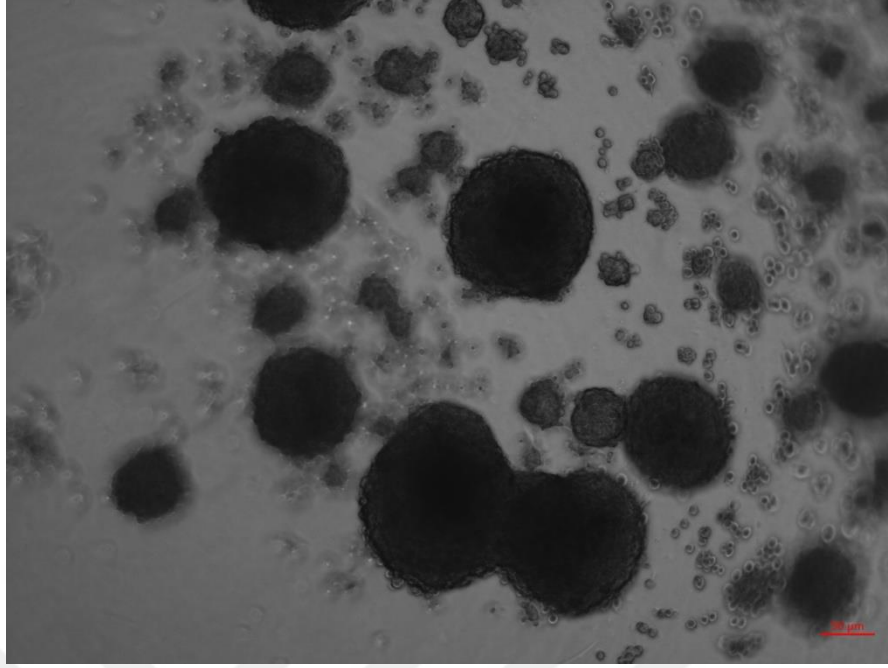
gerekçesi ile, bu iki matriks yapısı farklı oranlarda kombine edilerek hücrelerle birlikte test edildi.

İn-vivo koşulları optimum düzeyde yansıtabilmek için gönüllü bireylerden alınan diş eti fibroblast hücreleri sferoid kaynağı olarak kullanıldı. Bunun yanında, sferoid modellerde etkinliği bilinen fare kaynaklı L929 hücre hattı da insan diş eti fibroblast hücre davranışlarını değerlendirmede bir referans noktası olarak ve farklı hidrojel kombinasyonları ile kombine edildiğinde ortaya koyduğu davranışsal değişimlerin anlaşılması amacıyla deneylere dahil edildi.

Sferoid optimizasyon deneylerinde optimal sferoid için gerekli en uygun hücre sayısının 5.000 belirlenmesi literatür ile uyumluydu (66). Bu da optimizasyon testlerinde gözlemlediğimiz tutarlı sferoid sayısının başka araştırmacılar tarafından da saptandığını göstermektedir (66).

Oberoi ve arkadaşları tarafından L929 hücre hattı ve HGF hücrelerinin beraber kullanıldığı bir başka çalışmada farklı 3 boyutlu biyo-basım materyallerinin hücre materyal etkileşimi değerlendirilmiştir. L929 ve HGF sferoidlerinin materyale verdikleri yanıt birbirine benzer olarak raporlanmıştır (88). Bir başka çalışmada da sterotopografi yöntemiyle üç boyutlu basım işlemiyle üretilmiş cerrahi rehberlerin oral dokularla olan ilişkisinin test edilmesinde L929 ve HGF sferoid kültürleri *in-vitro* bir test modeli olarak kullanılmıştır. İlk çalışmada olduğu gibi yine farklı materyaller karşısında verdikleri hücresel yanıtlar birbirine benzerdir (63). Bu nedenle bu iki hücre yapısının farklı hidrojel kombinasyonları ile etkileşime girdiklerinde verdikleri yanıtları değerlendirmek önemlidir.

Sferoidler “U” tabanlı plakalar oluşturulduktan sonra hidrojel yapılar içine transfer edilmesi ile her kuyucukta tek ve pipet ucuyla yakalamaya uygun sferoidler oluşturulması amaçlandı. Literatür incelendiğinde 20.000 ve üzeri sayılarda hücre ekiminin çoklu sayıda ve birbirinden farklı boyutlarda sferoidler elde edilmesine ve bu da standart hücre miktarının hidrojele transferini zorlaştırdığı anlaşıldı (101). Biz de benzer sonuçları optimizasyon testlerinde 10.000 hücre ekildiğinde tek kuyucukta çoklu ve birbirinden farklı boyutlarda sferoid formasyonu tespit edildiği için bu hücre miktarı deneyin hidrojel aşamasında kullanılmadı (Şekil 12).



Şekil 13: 10.000 ve üzeri hücre ekiminde tek kuyucukta çoklu ve farklı boylarda sferoid yapılarının tespiti.

Optimizasyon testlerinde L929 hücre hattı ile HGF hücrelerinin aynı sayılarda ekilmelerine rağmen farklı sayıda ve hacimlerde sferoid kümeleri oluşturdukları gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada kolajen ve HA hidrojjellerin kombinasyonu ile HGF hücrelerinin takibiyle, hücre davranışlarının modellenmesi ve biyomateryal-tabanlı doku mühendisliği uygulamalarına yönelik temel gerekliliklere dayanmaktadır. Her iki hidrojel tipi ve hücre modeli, hücre-matriks etkileşimlerini, hücre hareketlerini ve invazyon özelliklerini anlamak için stratejik bir şekilde seçilmiştir.

Kolajen hidrojjeller, hücre kültürlerinde biyomimetik bir mikro çevre sağlama kapasitesi nedeniyle tercih edilmiştir. Kolajen, doğal dokuların ana bileşenlerinden biri olup hücre adezyonunu, proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyen biyokimyasal ve mekanik özelliklere sahiptir. Kolajen hidrojjeller, fibroblastlar için uygun bir üç boyutlu yapı sağlayarak hücrelerin doğal ortamlardaki davranışlarını simüle etme imkânı sunar (102). Kolajen hidrojjellerin kullanımı, hücrelerin matriks içindeki yeniden düzenlenme ve büyüme süreçlerini değerlendirme açısından kritik bir öneme sahiptir. Kolajen bazlı hidrojjeller ayrıca doku mühendisliğinde yaygın bir şekilde kullanılan, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir materyallerdir (103). Bu

nedenle, bu çalışmadaki bulgular hem temel biyolojik süreçlerin anlaşılmasına hem de klinik uygulamalar için translasyonel verilerin elde edilmesine katkı sağlamıştır.

HA hidrojel­leri ise, hücre-matriks etkileşimlerini incelemede önemli bir biyomateryal olarak tercih edilmiştir. HA, hücre proliferasyonu ve göçünü destekleyen, hücre dışı matriksin önemli bir bileşenidir. Özellikle bağ dokusu hücrelerinin doğal ortamlarını taklit etme potansiyeli, HA'nın bu çalışmada kullanımında başlıca nedenlerden biridir (102). HA hidrojellerinin yüksek su tutma kapasitesi ve biyolojik aktiviteleri, hücrelerin metabolik ihtiyaçlarını karşılamada ve uzun süreli kültürlerde hücre canlılığını korumada avantaj sağlamıştır (104). Ancak, HA'nın mekanik özelliklerinin kolajenle kıyaslandığında daha zayıf olması, hücre büyümesi ve invazyon kapasitesi üzerindeki etkilerini sınırlandırmıştır (86, 102). Bu farklılıklar, kolajen ve HA hidrojellerin hücre davranışlarına olan etkilerini karşılaştırmak ve hidrojellerin potansiyel uygulama alanlarını değerlendirmek açısından faydalı veriler sunmuştur.

HGF hücreleri, doğrudan insandan elde edilen hücreler olduğu için biyolojik özelliklerinin *in-vivo* koşulları daha iyi taklit edebileceği için tercih edilmiştir. Diş eti fibroblastları, özellikle oral dokularda yara iyileşme süreçlerine aktif olarak katılan hücrelerdir (7). Doğal ortamlardaki yüksek rejeneratif kapasitesi ve matriks sentezi yetenekleri, bu hücreleri yara iyileşmesi ve doku mühendisliği çalışmalarında model hücreler haline getirmiştir (105, 106). Ayrıca, insan kaynaklı hücrelerin kullanımı, translasyonel araştırmaların sonuçlarının klinik uygulamalara uyarlanabilirliğini artırmaktadır. HGF hücrelerinin doğal biyolojik süreçlere olan uygunluğu, bu çalışmada elde edilen sonuçların insana özgü biyolojik mekanizmalar açısından anlamlılığını artırmıştır.

L929 fibroblast hücre hattı ise, yüksek proliferatif kapasitesi ve deneysel tekrarlanabilirlik sağlaması nedeniyle tercih edilmiştir. Ticari bir hücre hattı olan L929, farklı biyomateryal ve kültür koşullarında standart bir model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (63, 66). Bu çalışmada, L929 hücreleri, insan kaynaklı HGF hücreleriyle karşılaştırma yapmaya olanak tanıyarak hücre tipi kaynaklı farklılıkların incelenmesini sağlamıştır. Ayrıca, bu hücre hattının invazyon ve proliferasyon davranışlarının iyi karakterize edilmiş olması, bulguların literatürle karşılaştırılabilirliğini artırmıştır.

Bu çalışma için HA ve kolajen hidrojellerinin seçimi, hücre-matriks etkileşimlerini daha iyi anlamak ve biyomateryal tasarımına katkıda bulunmak için tercih edildi. HGF ve L929 hücrelerinin kullanımı ise, hem insana özgü biyolojik süreçleri modellemek hem de deneysel tekrarlanabilirliği sağlamak için stratejik bir tercih olmuştur. Bu kombinasyon, üç boyutlu hücre kültürü ve biyomateryal araştırmalarında ileriye dönük çalışmalara ışık tutacak değerli bilgiler sunmuştur.

Literatür incelendiğinde, kolajen ve HA hidrojellerinin *in-vivo* sekonder yaralarda yara iyileşmesini hızlandırdığına dair bulgular mevcuttur (107, 108). *İn-vitro* koşullarda bu hidrojellerin etkilerini değerlendirmek ve hücre migrasyonu hızına etkilerini incelemek amacıyla, iki boyutlu kültürde farklı kolajen ve HA hidrojel kombinasyonları kullanılarak yara iyileşmesi deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak hidrojelsiz DMEM ortamı kullanılmıştır (109).

Bulgular, Tip I kolajen hidrojel ve kontrol grubunda yara alanlarının 2. günde tamamen kapandığını, ancak HA, 2:3 Kolajen/HA, 1:1 Kolajen/HA ve 3:2 Kolajen/HA gruplarında yara kenarlarının birbirine yaklaştığını fakat tam kapanmanın sağlanmadığını göstermiştir. Bu durum, kolajen hidrojellerin hücresel adezyonu ve migrasyonu destekleyen mekanik özelliklere sahip olmasından kaynaklanabilir. Kolajen, hücrelerin bağlanma ve hareketini teşvik eden doğal bir hücre dışı matriks bileşeni olup, yara iyileşme sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu hidrojellerin por yapısı, hücre migrasyonuna elverişli bir ortam sağlamaktadır (110, 111).

Buna karşın, HA hücre migrasyonunu desteklemekle birlikte daha viskoz bir yapı oluşturmaktadır ve bu durum hücre hareketinin hızını ve etkinliğini sınırlandırabilir. Ayrıca, HA yüksek su tutma kapasitesi, mikro çevredeki hücresel davranışı etkileyerek hücre göçü sürecinin tamamlanmasını engellemiş olabilir. Kontrol grubundaki hücreler, mevcut literatürdeki yara iyileşme hızlarıyla benzerlik göstermektedir (112).

Aslında bu bulgular şaşırtıcı değildir. Hücreler hidrojellere ekildiğinde, likit ortama göre daha yoğun bir ortam içerisinde migrasyon göstermeye çalıştıkları için daha yavaş yara kapanması gözlemlenmiştir (102). *İn-vivo* koşullarda da fibroblast hücreleri, fibrin tabaka içerisinde ekstraselüler matriks materyalleri ve plazma gibi yoğunluğu görece kıvamlı bir ortamda migrasyonu gerçekleştirmektedir (113).

Optimizasyon testleri, sferoid formasyonunda kullanılan hücre sayısının etkilerini anlamak ve en uygun koşulları belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir (89). HGF ve L929 hücre hattı, 2.000, 5.000 ve 10.000 hücre kullanılarak değerlendirilmiş ve hücrelerin büyüme dinamikleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar hem hücre yoğunluğunun hem de hücre türünün sferoid oluşum sürecinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

HGF hücreleriyle gerçekleştirilen deneylerde, 5.000 ve 10.000 hücre içeren gruplarda hücre kümelenmesi ilk 3 ile 5 gün içinde belirgin kontraksiyon göstermiştir. Bu durum, hücrelerin sferoid formasyonu için organize olmaya başladığını göstermektedir (114, 115). 5.000 hücrelik grupta 3. gün, 10.000 hücrelik grupta ise 5. gün itibarıyla plato fazına geçiş gözlemlenmiştir. Bu, hücrelerin kümelenme sürecini tamamladığını ve kararlı bir sferoid formasyonu oluşturduğunu işaret etmektedir. 2.000 hücre içeren gruplarda ise takip süresince anlamlı bir hacim değişikliği veya sferoid formasyonu gözlemlenmemiştir. Bu durum, düşük hücre sayısının yeterli hücre-hücre etkileşimi ve kümelenme oluşturamadığını göstermektedir.

L929 hücre hattı ile gerçekleştirilen deneylerde, 3. gün itibarıyla hızlı bir hacim artışı sonrasında sferoid formasyonu gözlemlenmiştir. Bu hücre hattının ticari fare fibroblast hattı olması nedeniyle, doğası gereği daha hızlı bir organize olma yeteneği sergilediği anlaşılmaktadır. Hem HGF hem de L929 hücrelerinin 3. günden itibaren plato fazına ulaştığı ve benzer hacimlerde sferoidler oluşturduğu göz önüne alındığında, deneylerin 5.000 hücre ile gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Bu optimizasyon çalışmaları, insan dişeti fibroblastları ve L929 hücre hattı için sferoid formasyonu ve stabilitesinde kullanılan hücre sayısının önemini ortaya koymuştur. Özellikle, 5.000 hücre içeren grupların hem HGF hem de L929 hücreleri için kararlı ve tekrarlanabilir sferoid yapıları sağladığı belirlenmiştir (88). Bu bulgular, hidrojel kombinasyonları ile yapılacak ileri deneyler için uygun başlangıç koşullarını sağlamış ve standartlaştırılmış bir protokol geliştirilmesine olanak tanımıştır.

Sferoid kültürlerde MTT testi, üç boyutlu delta test ve Presto mavisini gibi farklı ajanlar kullanılmaktadır ve henüz altın standart olarak kabul edilmiş tek bir metot bulunmamaktadır (64). Presto mavisini testi, resazurin bazlı bir renk değişimini prensibine dayanır; hücrelerin metabolik olarak aktif olduğu durumlarda resazurin, metabolitler tarafından indirgenerek floresan ve renk değişikliği oluşturan bir forma dönüşür. Bu

mekanizma, hücrelerin genel metabolik durumunu doğrudan ölçmeye olanak tanır ve geniş bir hücre tipi için uygulanabilir. Presto mavisı yöntemi üretici önerileri doğrultusunda kullanılmıştır (88). Bu çalışmada, farklı hidrojel kombinasyonlarının sferoidlerin metabolik aktivitesi üzerindeki etkisi 4. ve 8. günlerde kontrol grubu referans alınarak değerlendirilmiştir ve yalnızca 1:1 Kolajen/HA grubunda 4. ve 8. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir metabolik aktivite azalması tespit edilmiştir. 1:1 Kolajen/HA hidrojel grubunda metabolik aktivitedeki azalma, matrisin yapısının hücrelerin normal adaptasyon süreçlerini engellemesinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir (116). Bu durum, hücrelerin farklı kombinasyonlardaki biyomalzeme mikro çevrelerine verdikleri tepkilerin çeşitlilik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bunun dışında, diğer hidrojel kombinasyonlarının farklı günlerde ve kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha düşük miktarda canlılık tespit edildi ve bu sonuçlar literatürle de uyumlu bulundu (117). Test gruplarında gözlemlenen daha düşük canlılık oranı, hücrelerin hidrojel ortamına adaptasyon süreçlerinden, matriks yapısının mekanik ve biyokimyasal özelliklerinden veya difüzyon sınırlamalarıyla açıklanabilir. Bu durum, hidrojellerin hücreSEL mikro çevreyi modelleme kapasitesinin biyomalzeme seçimine ve tasarımına bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir (118-120). Hidrojel ortamlarının avantajlarına rağmen, kontrol grubunun (DMEM) basit yapısı ve besin dağılımındaki etkinliği hücre canlılığı açısından daha elverişli bir ortam sunduğu şekilde değerlendirilebilir.

Literatürdeki genel bulguların aksine çalışmada kullanılan hidrojel yapıların sferoidlerin metabolik aktivitesi üzerinde belirgin doğrudan bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, genel olarak hidrojellerin hücreSEL metabolik aktiviteyi sürdürebilecek yeterlilikte bir mikro çevre sağlamasıyla açıklanabilir (121-123).

Çalışmamızın bulguları göstermiştir ki HGF sferoidlerinden farklı olarak L929 sferoidleri belli hidrojel kombinasyonları içerisinde invazyon karakterlerini göstermiştir. Literatür incelendiğinde L929 hücre hattının hücre aktivitesi yaygın kanser türlerinden biri olan karsinomaya invazyon kapasitesi açısından benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu bakımdan HGF sferoidlerinden farklı biçimde invaziv davranış göstermesi şaşırtıcı değildir. Ne var ki laboratuvar koşullarında insan

fibroblast hücrelerinden farklı davranış göstermesi nedeniyle insan *in-vivo* koşullarını taklit etmekte HGF'ye kıyasla dezavantajlı olduğu görülmektedir (101).

L929 hücre sferoidlerinin farklı hidrojel kompozisyonlarındaki davranışları ve hacimsel değişimleri değerlendirildiğinde, hidrojel mikro çevresinin hücrel büyüme ve invazyon üzerindeki etkilerinin belirgin olduğu görülmektedir (124, 125). Kolajen içerisine gömülen sferoidlerde, yapısal olarak küçük bir büzülme gözlemlense de 8 gün boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu durum, kolajen hidrojellerin hücrel stabiliteyi destekleyen bir mikro çevre sunduğunu göstermektedir. Ancak, kolajen ile 2:3 Kolajen/HA, 3:2 Kolajen/HA ve kontrol grupları arasında anlamlı farklar bulunması, bu grupların farklı mekanik ve biyokimyasal özelliklerinin hücreler üzerinde farklı etkiler yarattığını ortaya koymaktadır.

2:3 Kolajen/HA hidrojel grubunda, sferoidlerin çevrelerinden hidrojel içerisine doğru invazyon uzantılarının oluştuğu ve bu uzantıların 6. gün itibarıyla en yüksek değerlere ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, bu grubun hücrel hareketi ve matriks içi invazyonu destekleyen bir çevre sunduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, 2:3 Kolajen/HA grubu, uzantılar hariç sferoid hacmi açısından en yüksek ortalama değeri göstermiştir. Bu bulgu, bu hidrojinin hem hücrel büyümeyi hem de invazyonu teşvik edici bir etkisi olduğunu göstermektedir. L929 hücrelerinde 3:2 Kolajen/HA grubu ise invazyon uzantıları sergilemiş olmasına rağmen, ortalama sferoid hacmi açısından daha sınırlı bir büyüme göstermiştir. Bu bulgular literatür ile uyumlu sonuçlar sergilemektedir (124, 125).

Kolajen ve hiyalüronik asidin eşit oranlarda kullanıldığı 1:1 Kolajen/HA grubu, sferoid hacmi açısından diğer gruplar arasında orta bir değer almıştır. Bu grupta invazyon yapılarının gözlenmemesi ve ortalama hacmin diğer gruplara kıyasla daha düşük kalması, bu kombinasyonun hücrel büyümeyi ve hareketi destekleme açısından yetersiz kalabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, yalnızca hiyalüronik asit içeren hidrojellerde, sferoidlerde zamanla tutarlı bir hacimsel küçülme görülmesine rağmen, bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç HA yüksek su tutma kapasitesi nedeniyle hücrelerin besinlere erişimi kolaylaşmış olsa da mekanik destek eksikliği nedeniyle büyüme yeterince desteklenememiş olmasıyla açıklanabilir (126, 127).

Kontrol grubunda ise, ortalama sferoid hacminin bazı hidrojel gruplarına kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kontrol ortamının hücresel büyüme için uygun koşullar sunduğunu göstermektedir. Ancak, kontrol grubunda invazyon yapılarının gözlemlenmemesi, hücre hareketliliğinin bu ortamda desteklenemediğini ortaya koymaktadır (128).

Sonuç olarak, farklı hidrojel kombinasyonlarının L929 hücre sferoidlerinin büyüme ve invazyon özellikleri üzerinde farklı etkiler yarattığı görülmüştür (129). Özellikle 2:3 Kolajen/HA hidrojel grubu hem invazyon yapıları hem de sferoid büyüklüğü açısından en başarılı grup olarak öne çıkmıştır. Bu bulgular, hidrojel tasarımlarının hücre davranışları yönlendirebileceğini ve farklı hücre türleri için mikro çevrenin dikkatle optimize edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır (130).

Bu çalışmada, farklı hidrojel kombinasyonları içerisinde HGF sferoidlerinin büyüme dinamikleri ve yapısal özellikleri değerlendirilmiştir. Bulgular, HGF sferoidlerinin tüm gruplarda sferoid çeperlerinde uzamsal invazyon yapıları sergilemediğini ortaya koymuştur. Bu durum HGF fibroblastların L929 hücre hattına kıyasla invazyon kapasitesinin daha sınırlı olduğunu göstermektedir. Literatürde de HGF hücrelerinin sferoid formunda bulunduğu ortama invazyonunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Sferoid hacmi açısından en yüksek ortalamaya 3:2 Kolajen/HA hidrojel grubunda ulaşıldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, yalnızca HA hidrojel grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunması, bu grupların diğer kombinasyonlara göre belirgin bir şekilde farklı hücre davranışlarına neden olduğunu göstermektedir bu bulgular mevcut literatür ile uyumlu bulunmuştur (131). HA grubundaki sferoidlerin hacim açısından kontrol grubuna kıyasla daha yüksek değerlere sahip olması, HA'nın hücre proliferasyonu ve hacimsel büyümeyi desteklediği sonucuna varılmıştır. Ancak HA grubunun diğer kombinasyonlara göre daha düşük bir ortalama hacim göstermesi, HA'nın hücre büyüme için yeterli mekanik veya biyokimyasal destek sağlayamadığını da işaret etmektedir.

Kolajen ve 1:1 Kolajen/HA gruplarında ise sferoidlerin gömülü oldukları hidrojellerde hacimlerini korudukları ve birbirine benzer büyüklüklerde yapılar sergiledikleri gözlemlenmiştir. Bu durum, kolajen bazlı hidrojellerin HGF hücrelerinin hacimsel bütünlüğünü koruma açısından stabil bir mikro çevre sağladığını ortaya

koymaktadır. Özellikle 1:1 Kolajen/HA grubunda, kolajen ve HA kombinasyonunun hücre büyümesini kısıtlamadığı, ancak diğer gruplara kıyasla hacimsel büyümeyi de yeterince teşvik etmediği sonucu çıkarılabilir (132).

Sadece ortam kullanılan kontrol grubunda en düşük ortalama hacmin gözlenmesi, bu grubun hücresel büyüme açısından en az destekleyici ortam olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, kontrol grubunun difüzyon avantajı nedeniyle hücresel metabolizmanın korunabildiği ancak hacimsel büyümenin sınırlandığı sonucuna varılabilir (133).

Araştırma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde HGF sferoidlerinin hacimsel büyüklüklerinin ve yapısal özelliklerinin hidrojel mikro çevresi içinde idame ettirebildiği görüldü. HA ve kolajen hidrojellerinin farklı oranlardaki kombinasyonlarının hücresel davranışlar üzerindeki farklı etkileri, bu malzemelerin hücre-matriks etkileşimlerini optimize etmek için dikkatle tasarlanması gerektiğini göstermektedir. Özellikle, 3:2 Kolajen/HA grubunda gözlenen yüksek sferoid hacmi, bu kombinasyonun HGF hücreleri için uygun bir büyüme ortamı sunduğunu işaret etmektedir.

Araştırmamızda, diş etinde doğal olarak bulunan bazı hücrelerin ve ECM elemanlarının kullanılmamış olması bir limitasyon olarak değerlendirilebilir. Ancak mevcut literatürde, *in-vitro* ortamda üç boyutlu bir diş eti modeli oluşturmayı hedefleyen çalışma sayısının sınırlı olduğu göz önüne alındığında, bu deneysel çalışmada diş etinin en temel bileşenleri seçilmiş ve bunların birbiriyle olan ilişkileri değerlendirilmiştir.

Bu açıdan, klinik koşullara daha yakın ve sürdürülebilir bir modele ulaşılabilmesi için, diş etinin diğer bileşenlerinin de dahil edildiği ve hücresel gen ekspresyon seviyelerinin araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, insan diş eti fibroblastları (otojen) ve L929 hücre (zenojen) hattı kullanılarak, kolajen ve HA hidrojelleri ile oluşturulan üç boyutlu sferoid modelleri değerlendirmiştir. Veriler, hidrojel kombinasyonlarının hücre davranışlarını ve sferoid formasyonunu önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. İnsan diş eti fibroblastları için 5.000 hücre ile oluşturulan sferoidlerin stabil bir yapı sergilediği gözlemlenmiştir. 3:2 Kolajen/HA ve 2:3 Kolajen/HA kolajen-HA kombinasyonlarının hem hücreSEL büyümeYi hem de sferoid stabilitesini desteklediği ortaya konmuştur.

L929 hücre hattı, hücre invazyon kapasitesinde daha agresif bir davranış sergilerken, beklendiği üzere insan diş eti fibroblastları stabil bir yapı ile *in-vivo* koşullara daha yakındır. Bununla birlikte, kolajen bazlı hidrojellerin, hücre migrasyonu ve yara iyileşmesi süreçlerinde en yüksek performansı gösterdiği tespit edilmiştir. Genel olarak, bu bulgular, kolajen bazlı biyomimetik materyallerin yumuşak doku rejenerasyonu için uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

Gelecek çalışmalarda, üç boyutlu modellere epitel hücreleri gibi diğer oral dokuların bileşenlerinin de eklenmesi, daha karmaşık ve biyolojik olarak anlamlı modellerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Ayrıca, farklı hidrojel kombinasyonlarının ekstraselüler matriks proteinleri üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde incelenmesi, modelin biyolojik doğruluğunu artırabilir. Bu tür modellerin, hayvan deneylerine olan ihtiyacı azaltmak ve biyomateryal testlerinde kullanımını yaygınlaştırmak amacıyla daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi önerilmektedir.

Bu çalışma, oral yumuşak doku rejenerasyonu için biyomimetik modellerin geliştirilmesi konusunda önemli bir adım atmış ve gelecekteki translasyonel araştırmalara yol gösterici bir temel oluşturmuştur.

7. KAYNAKLAR

1. Wang H-L, Greenwell H, Fiorellini J, Giannobile W, Offenbacher S, Salkin L, ve ark. Periodontal regeneration. *Journal of Periodontology*. 2005;76(9):1601-22.
2. Bosshardt DD, Sculean A. Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontology 2000*. 2009;51(1).
3. Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanis A, Kang B, ve ark. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dental Materials*. 2015;31(4):317-38.
4. Emmert-Buck MR. Translational research: From biological discovery to public benefit (or not). *Advances in Biology*. 2014;2014(1):278789.
5. Ravi M, Paramesh V, Kaviya S, Anuradha E, Solomon FP. 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal of Cellular Physiology*. 2015;230(1):16-26.
6. Chatzinikolaidou M. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. *Drug discovery today*. 2016;21(9):1553-60.
7. Haekkinen L, Uitto V-J, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology 2000*. 2000;24(1).
8. Moharamzadeh K, Colley H, Murdoch C, Hearnden V, Chai W, Brook I, ve ark. Tissue-engineered oral mucosa. *Journal of dental research*. 2012;91(7):642-50.
9. Scheper M, Chaisuparat R, Cullen K, Meiller T. A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2010;3:1-11.
10. Zucchelli G, Tavelli L, McGuire MK, Rasperini G, Feinberg SE, Wang HL, ve ark. Autogenous soft tissue grafting for periodontal and peri-implant plastic surgical reconstruction. *Journal of Periodontology*. 2020;91(1):9-16.
11. Kim DM, Neiva R. Periodontal soft tissue non-root coverage procedures: A systematic review from the AAP regeneration workshop. *Journal of Periodontology*. 2015;86:S56-S72.
12. Tavelli L, Barootchi S, Stefanini M, Zucchelli G, Giannobile WV, Wang HL. Wound healing dynamics, morbidity, and complications of palatal soft-tissue harvesting. *Periodontology 2000*. 2023;92(1):90-119.
13. Brasher WJ, Rees TD, Boyce WA. Complications of free grafts of masticatory mucosa. *Journal of Periodontology*. 1975;46(3):133-8.
14. Tavelli L, Barootchi S, Ravidà A, Oh T-J, Wang H-L. What is the safety zone for palatal soft tissue graft harvesting based on the locations of the greater palatine artery and foramen? A systematic review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2019;77(2):271. e1-. e9.
15. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*. 2014;12(4):207-18.

16. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(10):839-45.
17. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(3):5517-27.
18. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews cancer*. 2003;3(5):362-74.
19. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*. 2012;125(13):3015-24.
20. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*. 2008;3(9-10):1172-84.
21. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015;17(1):1-15.
22. Ivanov DP, Parker TL, Walker DA, Alexander C, Ashford MB, Gellert PR, et al. Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. *PloS One*. 2014;9(8):e103817.
23. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003;83(2):173-80.
24. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols*. 2009;4(3):309-24.
25. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*. 2014;345(6194):1247125.
26. Dauth S, Maoz BM, Sheehy SP, Hemphill MA, Murty T, Macedonia MK, et al. Neurons derived from different brain regions are inherently different in vitro: a novel multiregional brain-on-a-chip. *Journal of Neurophysiology*. 2017;117(3):1320-41.
27. Hartung T. Thoughts on limitations of animal models. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2008;14:S81-S3.
28. Coleman MD. Progress in the development of in vitro human-based alternatives to animal models. Elsevier; 2006. p. 120-2.
29. AlFatlawi Z, Huang M, Chau D, D'Aiuto F. Three dimensional (3D) gingival models in periodontal research: a systematic review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2023;34(11):58.
30. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22(1):287-309.

31. Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature*. 1978;273(5661):345-9.
32. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Research*. 1977;37(10):3639-43.
33. Napolitano AP, Dean DM, Man AJ, Youssef J, Ho DN, Rago AP, et al. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. *Biotechniques*. 2007;43(4):494-500.
34. Achilli T-M, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012;12(10):1347-60.
35. Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair SV, Tamura H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*. 2010;82(2):227-32.
36. Collins C, Keane TM, Turner DJ, O’Keeffe G, Fitzpatrick DA, Doyle S. Genomic and proteomic dissection of the ubiquitous plant pathogen, *Armillaria mellea*: toward a new infection model system. *Journal of Proteome Research*. 2013;12(6):2552-70.
37. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7(3):211-24.
38. Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997;9(1):76-85.
39. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 1996;84(3):345-57.
40. Takeichi M, Nakagawa S, Aono S, Usui T, Uemura T. Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2000;355(1399):885-90.
41. Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes & Development*. 2006;20(23):3199-214.
42. Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997;13(1):119-46.
43. Vasiliev JM. Cytoskeletal mechanisms responsible for invasive migration of neoplastic cells. *International Journal of Developmental Biology*. 2004;48(5-6):425-39.
44. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21(1):247-69.
45. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 2001;294(5547):1708-12.
46. Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology*. 1999;67(3):148-57.

47. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*. 2010;148(1):3-15.
48. He J, Zhang N, Zhu Y, Jin R, Wu F. MSC spheroids-loaded collagen hydrogels simultaneously promote neuronal differentiation and suppress inflammatory reaction through PI3K-Akt signaling pathway. *Biomaterials*. 2021;265:120448.
49. Ohguro H, Watanabe M, Sato T, Hikage F, Furuhashi M, Okura M, ve ark. 3D spheroid configurations are possible indicators for evaluating the pathophysiology of melanoma cell lines. *Cells*. 2023;12(5):759.
50. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, ve ark. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*. 2011;472(7341):51-6.
51. Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, Schmelzle T, Brugge JS, Polverini PJ, ve ark. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nature Methods*. 2007;4(10):855-60.
52. Kim Y, Rajagopalan P. 3D hepatic cultures simultaneously maintain primary hepatocyte and liver sinusoidal endothelial cell phenotypes. *PloS One*. 2010;5(11):e15456.
53. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening*. 2006;11(8):922-32.
54. Salmenperä P, Kankuri E, Bizik J, Sirén V, Virtanen I, Takahashi S, ve ark. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin–integrin interaction. *Experimental cell research*. 2008;314(19):3444-52.
55. Santos JM, Camões SP, Filipe E, Cipriano M, Barcia RN, Filipe M, ve ark. Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6:1-19.
56. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2003;200(4):500-3.
57. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. 2002;3(5):349-63.
58. Park SY, Hong HJ, Lee HJ. Fabrication of cell spheroids for 3D cell culture and biomedical applications. *BioChip Journal*. 2023;17(1):24-43.
59. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration*. 2005;13(1):7-12.
60. Wells RG. Tissue mechanics and fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(7):884-90.

61. Cannella V, Altomare R, Chiaramonte G, Di Bella S, Mira F, Russotto L, ve ark. Cytotoxicity evaluation of endodontic pins on L929 cell line. *BioMed Research International*. 2019;2019(1):3469525.
62. Andrade F, da Silva E, Marinho A, Oliveira A, Sánchez-Porrás D, Bermejo-Casares F, ve ark. A new 3D model of L929 fibroblasts microtissues uncovers the effects of Bothrops erythromelas venom and its antivenom. *Archives of Toxicology*. 2024;98(10):3503-12.
63. Kurzmann C, Janjić K, Shokoohi-Tabrizi H, Edelmayer M, Pensch M, Moritz A, ve ark. Evaluation of resins for stereolithographic 3D-printed surgical guides: the response of L929 cells and human gingival fibroblasts. *BioMed Research International*. 2017;2017(1):4057612.
64. Demuynck R, Efimova I, Lin A, Declercq H, Krysko DV. A 3D cell death assay to quantitatively determine ferroptosis in spheroids. *Cells*. 2020;9(3):703.
65. Neto A, Correia C, Oliveira M, Rial-Hermida M, Alvarez-Lorenzo C, Reis R, ve ark. A novel hanging spherical drop system for the generation of cellular spheroids and high throughput combinatorial drug screening. *Biomaterials Science*. 2015;3(4):581-5.
66. Juarez-Moreno K, Chávez-García D, Hirata G, Vazquez-Duhalt R. Monolayer (2D) or spheroids (3D) cell cultures for nanotoxicological studies? Comparison of cytotoxicity and cell internalization of nanoparticles. *Toxicology in Vitro*. 2022;85:105461.
67. Ghosh S, Joshi MB, Ivanov D, Feder-Mengus C, Spagnoli GC, Martin I, ve ark. Use of multicellular tumor spheroids to dissect endothelial cell–tumor cell interactions: A role for T-cadherin in tumor angiogenesis. *FEBS Letters*. 2007;581(23):4523-8.
68. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2003;200(4):423-8.
69. Fernandes H, Moroni L, Van Blitterswijk C, De Boer J. Extracellular matrix and tissue engineering applications. *Journal of Materials Chemistry*. 2009;19(31):5474-84.
70. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;97:4-27.
71. Chaudhuri O, Cooper-White J, Janmey PA, Mooney DJ, Shenoy VB. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature*. 2020;584(7822):535-46.
72. Urbanczyk M, Layland SL, Schenke-Layland K. The role of extracellular matrix in biomechanics and its impact on bioengineering of cells and 3D tissues. *Matrix Biology*. 2020;85:1-14.
73. Metzger W, Rother S, Pohlemann T, Möller S, Schnabelrauch M, Hintze V, ve ark. Evaluation of cell-surface interaction using a 3D spheroid cell culture model on artificial extracellular matrices. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;73:310-8.

74. Liu C, Mejia DL, Chiang B, Luker KE, Luker GD. Hybrid collagen alginate hydrogel as a platform for 3D tumor spheroid invasion. *Acta Biomaterialia*. 2018;75:213-25.
75. Calori IR, Alves SR, Bi H, Tedesco AC. Type-I collagen/collagenase modulates the 3D structure and behavior of glioblastoma spheroid models. *ACS Applied Bio Materials*. 2022;5(2):723-33.
76. Stamov DR, Pompe T. Structure and function of ECM-inspired composite collagen type I scaffolds. *Soft Matter*. 2012;8(40):10200-12.
77. Rico-Llanos GA, Borrego-González S, Moncayo-Donoso M, Becerra J, Visser R. Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers*. 2021;13(4):599.
78. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 2008;89(5):338-44.
79. Heo DN, Hospodiuk M, Ozbolat IT. Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2019;95:348-56.
80. Bignami A, Hosley M, Dahl D. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anatomy and Embryology*. 1993;188(5):419-33.
81. Price RD, Myers S, Leigh IM, Navsaria HA. The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2005;6:393-402.
82. Haycock JW. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques: Springer; 2011.
83. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*. 2011;21(12):745-54.
84. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, ve ark. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017;32(4):266-77.
85. Caliori SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*. 2016;13(5):405-14.
86. Lou J, Mooney DJ. Chemical strategies to engineer hydrogels for cell culture. *Nature Reviews Chemistry*. 2022;6(10):726-44.
87. Cushing MC, Anseth KS. Hydrogel cell cultures. *Science*. 2007;316(5828):1133-4.
88. Oberoi G, Nitsch S, Janjić K, Shokoohi-Tabrizi H, Moritz A, Moscato F, ve ark. The impact of 3D-printed LAY-FOMM 40 and LAY-FOMM 60 on L929 cells and human oral fibroblasts. *Clinical Oral Investigations*. 2021;25:1869-77.
89. Maritan SM, Lian EY, Mulligan LM. An efficient and flexible cell aggregation method for 3D spheroid production. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2017(121).

90. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Cell Viability Assays: Methods And Protocols*. 2017:1-17.
91. Stamm A, Reimers K, Strauß S, Vogt P, Scheper T, Pepelanova I. In vitro wound healing assays–state of the art. *BioNanoMaterials*. 2016;17(1-2):79-87.
92. Sakolish CM, Esch MB, Hickman JJ, Shuler ML, Mahler GJ. Modeling barrier tissues in vitro: methods, achievements, and challenges. *EBioMedicine*. 2016;5:30-9.
93. Kimlin L, Kassis J, Virador V. 3D in vitro tissue models and their potential for drug screening. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2013;8(12):1455-66.
94. Zhang B, Korolj A, Lai BFL, Radisic M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nature Reviews Materials*. 2018;3(8):257-78.
95. Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, ve ark. Organ-on-a-chip: Recent breakthroughs and future prospects. *Biomedical Engineering Online*. 2020;19:1-19.
96. Gao X, Wu Y, Liao L, Tian W. Oral organoids: progress and challenges. *Journal of Dental Research*. 2021;100(5):454-63.
97. Jin L, Kou N, An F, Gao Z, Tian T, Hui J, ve ark. Analyzing human periodontal soft tissue inflammation and drug responses in vitro using epithelium-capillary interface on-a-chip. *Biosensors*. 2022;12(5):345.
98. Svanberg S, Hirth E, Mitsiadis TA, Dittrich PS. “Periodontal ligament-on-chip” as a Novel Tool for Studies on the Physiology and Pathology of Periodontal Tissues. *Advanced Healthcare Materials*. 2024:2303942.
99. Steigmann L, Maekawa S, Sima C, Travan S, Wang C-W, Giannobile WV. Biosensor and Lab-on-a-chip Biomarker-identifying Technologies for Oral and Periodontal Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:588480.
100. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(22):12200.
101. Ehrhart F, Schulz J, Katsen-Globa A, Shirley S, Reuter D, Bach F, ve ark. A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. *Cryobiology*. 2009;58(2):119-27.
102. Lou J, Stowers R, Nam S, Xia Y, Chaudhuri O. Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture. *Biomaterials*. 2018;154:213-22.
103. Szot CS, Buchanan CF, Freeman JW, Rylander MN. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials*. 2011;32(31):7905-12.
104. Gurski LA, Jha AK, Zhang C, Jia X, Farach-Carson MC. Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials*. 2009;30(30):6076-85.

105. Saczko J, Dominiak M, Kulbacka J, Chwiłkowska A, Krawczykowska H. A simple and established method of tissue culture of human gingival fibroblasts for gingival augmentation. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2008;46(1):117-9.
106. Smirani R, Rémy M, Devillard R, Naveau A. Use of human gingival fibroblasts for pre-vascularization strategies in oral tissue engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2022;19(3):525-35.
107. Zhang Y, Wang Y, Li Y, Yang Y, Jin M, Lin X, ve ark. Application of collagen-based hydrogel in skin wound healing. *Gels*. 2023;9(3):185.
108. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L, Coto G. Hyaluronic acid and wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2015;18(1):53-60.
109. Aijaz A, Faulknor R, Berthiaume F, Olabisi RM. Hydrogel microencapsulated insulin-secreting cells increase keratinocyte migration, epidermal thickness, collagen fiber density, and wound closure in a diabetic mouse model of wound healing. *Tissue engineering part A*. 2015;21(21-22):2723-32.
110. Solbu AA, Caballero D, Damigos S, Kundu SC, Reis RL, Halaas Ø, ve ark. Assessing cell migration in hydrogels: An overview of relevant materials and methods. *Materials Today Bio*. 2023;18:100537.
111. Hadden WJ, Young JL, Holle AW, McFetridge ML, Kim DY, Wijesinghe P, ve ark. Stem cell migration and mechanotransduction on linear stiffness gradient hydrogels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(22):5647-52.
112. Lei Y, Gojgini S, Lam J, Segura T. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials*. 2011;32(1):39-47.
113. Guo Sa, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*. 2010;89(3):219-29.
114. Zhang W, Li C, Baguley BC, Zhou F, Zhou W, Shaw JP, ve ark. Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. *Analytical Biochemistry*. 2016;515:47-54.
115. Alfonso García SL, Mira Uribe LM, Castaño López S, Parada-Sanchez MT, Arboleda-Toro D. Ultrastructural characterization of human gingival fibroblasts in 3D culture. *Cells*. 2022;11(22):3647.
116. Thakuri PS, Gupta M, Plaster M, Tavana H. Quantitative size-based analysis of tumor spheroids and responses to therapeutics. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2019;17(3):140-9.
117. Geckil H, Xu F, Zhang X, Moon S, Demirci U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine*. 2010;5(3):469-84.
118. Carvalho MP, Costa EC, Miguel SP, Correia IJ. Tumor spheroid assembly on hyaluronic acid-based structures: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2016;150:139-48.

119. Xu X, Gurski LA, Zhang C, Harrington DA, Farach-Carson MC, Jia X. Recreating the tumor microenvironment in a bilayer, hyaluronic acid hydrogel construct for the growth of prostate cancer spheroids. *Biomaterials*. 2012;33(35):9049-60.
120. Liang Y, Jeong J, DeVolder RJ, Cha C, Wang F, Tong YW, ve ark. A cell-instructive hydrogel to regulate malignancy of 3D tumor spheroids with matrix rigidity. *Biomaterials*. 2011;32(35):9308-15.
121. Li Y, Kumacheva E. Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. *Science Advances*. 2018;4(4):eaas8998.
122. Dominijanni AJ, Devarasetty M, Forsythe SD, Votanopoulos KI, Soker S. Cell viability assays in three-dimensional hydrogels: a comparative study of accuracy. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2021;27(7):401-10.
123. Gao L, Gan H, Meng Z, Gu R, Wu Z, Zhang L, ve ark. Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;117:398-405.
124. Chen T, Wen Y, Song X, Zhang Z, Zhu J, Tian X, ve ark. Rationally designed β -cyclodextrin-crosslinked polyacrylamide hydrogels for cell spheroid formation and 3D tumor model construction. *Carbohydrate Polymers*. 2024;339:122253.
125. Quan VM, Le KM, Dat HT, Van P-TH, Le M-AT, Nguyen KT-T, ve ark. Design of a non-oxidative adhesive dopamine-grafted hyaluronic acid/NOCC hydrogel for enhanced cell spheroid formation and soft tissue regeneration. *Reactive and Functional Polymers*. 2024:106108.
126. Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials*. 2011;23(12):H41-H56.
127. Kim IL, Mauck RL, Burdick JA. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*. 2011;32(34):8771-82.
128. Yang R, Huang J, Zhang W, Xue W, Jiang Y, Li S, ve ark. Mechanoadaptive injectable hydrogel based on poly (γ -glutamic acid) and hyaluronic acid regulates fibroblast migration for wound healing. *Carbohydrate Polymers*. 2021;273:118607.
129. Silva-Correia J, Zavan B, Vindigni V, Silva TH, Oliveira JM, Abatangelo G, ve ark. Biocompatibility evaluation of ionic-and photo-crosslinked methacrylated gellan gum hydrogels: In vitro and in vivo study. *Advanced healthcare Materials*. 2013;2(4):568-75.
130. Hong S, Song S-J, Lee JY, Jang H, Choi J, Sun K, ve ark. Cellular behavior in micropatterned hydrogels by bioprinting system depended on the cell types and cellular interaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2013;116(2):224-30.
131. Colangelo MT, Vicedomini ML, Belletti S, Govoni P, Guizzardi S, Galli C. A Biomimetic Polynucleotides–Hyaluronic Acid Hydrogel Promotes the Growth

- of 3D Spheroid Cultures of Gingival Fibroblasts. *Applied Sciences*. 2023;13(2):743.
132. Kaufman G, Nunes L, Eftimiades A, Tutak W. Enhancing the three-dimensional structure of adherent gingival fibroblasts and spheroids via a fibrous protein-based hydrogel cover. *Cells Tissues Organs*. 2016;202(5-6):343-54.
 133. Kaemmerer E, Melchels FP, Holzappel BM, Meckel T, Hutmacher DW, Loessner D. Gelatine methacrylamide-based hydrogels: An alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(6):2551-62.



8. EKLER

Ek-1 Etik Kurul Kararı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Doç.Dr. Aliye Akcalı

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	
FAKS	
E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	7525-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/> YÜKSEKLİSANS <input checked="" type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Üç Boyutlu Bir Yumuşak Doku Rejenerasyon Modelinin Geliştirilmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOY ADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr. Aliye Akcalı SBE
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ		Karar No:2022/32-26	Tarih:12.10.2022		
Doç.Dr. Aliye Akcalı'nın sorumlusu olduğu "Üç Boyutlu Bir Yumuşak Doku Rejenerasyon Modelinin Geliştirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmacının mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI		Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu			
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr. Emel Çalikoğlu (Başkan Yardımcısı)	Preventif Onkoloji	Onkoloji Enstitüsü	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr. Aysin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr. Aliye Akcalı	Periodontoloji	Diş Hekimliği Fakültesi	Kadın	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>

Doç.Dr. Aliye Akcalı çalışmada sorumlu araştırmacı olduğu için çalışma görüşülürken toplantıda bulunmamıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

Ek-2 ARBIS Özgeçmiş



BİRTAN TOLGA YILMAZ

Kişisel Bilgiler

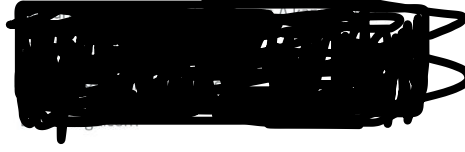
İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası



Öğrenim Bilgileri

01 Şubat 2022 - Şu Anda (3 yıl)

Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, DENTAL BİYOMALZEMELER (YL) (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.85 / 4.0

01 Ocak 2016 - 01 Temmuz 2019 (3 yıl 7 ay)

Dış Hekimliğinde Uzmanlık, Anadal/Normal Öğretim, HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ,
TÜRKİYE

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ, DİŞ HEKİMLİĞİ PR.

Tez Başlığı: Düşük Yoğunluklu Lazer Uygulamasının Tavşan Kranial Defektlerinde
Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisi

Tez Konusu: Bu çalışmanın amacı, düşük yoğunlukta (diod) lazerin farklı uygulama protokollerinin tavşanlarda oluşturulan deneysel kranial defektlerinin iyileşmesine etkilerinin histolojik, histopatolojik ve mikroBT incelemeleri ile değerlendirilmesidir. Ayrıca, 2. hafta sonunda yapılan histolojik ve immunohistokimyasal incelemeler ile diod lazer uygulamasının biyolojik etki mekanizmalarının belirlenmesi hedeflendi.

Tarih: 2019

Tez Danışmanı: ABDULLAH CEVDET AKMAN

Tez Eş Danışmanı: GÜLİZ NİGAR GÜNCÜ

31 Ağustos 2010 - 14 Temmuz 2015 (4 yıl 11 ay)

Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ, DİŞ HEKİMLİĞİ PR.

Diploma Numarası: 2014/02/0069

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.73 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Ocak 2016 - Temmuz 2019 (3 yıl 6 ay) (Tam Zamanlı)

ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
KLİNİK BİLİMLER BÖLÜMÜ PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Diş Hekimliği -- Klinik Bilimler -- Periodontoloji

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Biyoteknoloji -- Biyomateryal

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

E. COUSO-QUEIRUGA, G. AVILA-ORTIZ, E. P. BARBOZA, L. CHAMBRONE, H. G. KECELI, B. T. YILMAZ & D. M. RODRIGUES, Correlation of Gingival Stippling with Periodontal Phenotypic Features: A Cross-Sectional Study, *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 2024, 19453388, 44, 6, 629-638.

H. M. PARLAK, M. H. DURMAZ, H. BAYRAK, B. T. YILMAZ & H. G. KECELI, Cyanoacrylate and hyaluronic acid combination on palatal donor site management after de-epithelialized graft harvesting, *JOURNAL OF PERIODONTOLOGY*, 2023, 0022-3492, 94, 4, 10.

H. M. PARLAK, B. T. YILMAZ, M. H. DURMAZ, H. TOZ & H. G. KECELI, The effects of vertically coronally advanced flap and free gingival graft techniques on shallow vestibule: a randomized comparative prospective trial, *CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS*, 2023, 1432-6981, 27, 12, 12.

B. T. YILMAZ, E. COMERDOV, N. YAKAR YILMAZ & G. KECELI, The influence of tissue adhesive to palatal donor site healing after de-epithelialized gingival graft harvesting: a randomized clinical trial, *Journal of the International Academy of Periodontology*, 2022, 2518-3745, 24, 2, 103.

B. T. YILMAZ, E. COMERDOV, C. KÜTÜK, J. NART & H. G. KEÇELİ, Modified coronally advanced tunnel versus epithelialized free gingival graft technique in gingival phenotype modification: a comparative randomized controlled clinical trial., *CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS*, 2022, 1432-6981, 2022, 6, 1.

B. T. YILMAZ, A. C. AKMAN, A. CETINKAYA, C. COLAK, B. YILDIRM, O. O. YUCELI, G. N. GUNCU & R. M. NOHUTCU, In vivo efficacy of low-level laser therapy on bone regeneration, *LASERS IN MEDICAL SCIENCE*, 2022, 0268-8921.

O. DIZDAR, M. HAYRAN, D. C. GUVEN, T. B. YILMAZ, S. TAHERI, A. C. AKMAN, E. BILGIN, B. HUSEYİN & E. BERKER et al., Increased cancer risk in patients with periodontitis, *CURRENT MEDICAL RESEARCH AND OPINION*, 2017, 0300-7995, 33, 12, 2195-2200.

Ödüller

Üniversite veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Uluslararası, 3rd International Symposium on Regeneration and Esthetics in Periodontology and Implant Dentistry, Investigation of the Effects of Low Level Laser Therapy in Bone Regeneration at Rabbit Cranial Defects, Ödül Alınan Kurum: UNIVERSITY OF BERN, İSVİÇRE, 16 Kasım 2019.

Diğer, Ulusal, TIBBİ ONKOLOJİ ARAŞTIRMA ÖDÜLÜ, Increased Cancer Risk in Patients with Periodontitis, Ödül Alınan Kurum: TÜRK TIBBİ ONKOLOJİ DERNEĞİ (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 17 Mart 2018.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	ÜİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0

Ek-3 Tez Çalışmasından Üretilen Sözlü Sunum

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

“Diş Hekimliği Eğitimi”

Uluslararası Kongresi

Program ve Bildiri Özetleri



3 – 4 Haziran 2022, Dokuz Eylül Üniversitesi Sabancı Kültür Sarayı - İzmir

1
Bu PDF kitapçık 54 sayfadır

K11. Yumuşak doku rejenerasyonunda üç boyutlu modeller

Birtan Tolga Yılmaz¹, Aliye Akcalı^{1,2}, Yasemin Başbınar³

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dental Biyomalzemeler Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.

² Dokuz Eylül Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.

³ Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı İzmir, Türkiye.

Giriş: Periodontal ve peri-implant yumuşak dokuların sağlığı, diş ve implantların uzun dönem sağ kalımı için önemlidir. Bu çalışmada, yumuşak doku rejenerasyonunda kullanılan güncel modellerin detaylı bir biçimde incelenmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Diş ve implant çevresi yumuşak doku rekonstrüksiyonu amacıyla çeşitli membranlar, doku iskeleleri ve büyüme faktörleri cerrahi yaklaşımlarla birlikte uygulanmaktadır. Güncel teknolojiler ümit verici olsa da yumuşak doku ogmentasyonu amacıyla kullanılan sentetik biyomalzemeler otojen greftlere karşı henüz bir üstünlük ya da öngörülebilir bir başarı sağlayamamışlardır. Bu malzemeler yeterli düzeyde hücre içermezler, ayrıca revaskülarizasyon, hücre göçü ve çoğalmasını destekleyecek sinyal moleküllerini de içermemektedirler. Buradan yola çıkılarak hücre temelli doku mühendisliğinden yararlanılarak farklı biyomalzeme alternatifleri üretmeye yönelik araştırmalar hala sürmektedir. Gelişen tedaviler ile, bağ dokusu rejenerasyonu amacıyla tek tabaka halindeki fibroblastlar ekstraselüler matrisi taklit eden yüzeylere yerleştirilerek uygulanmaktadır. Ancak, bu yaklaşım ile doğal üç boyutlu yapı taklit edilememektedir. Sferoidler çok hücreli makro dokulardır. Sferoidlerin ortaya çıkış amacı laboratuvar ile klinik uygulamalar arasındaki boşluğun giderilebilmesidir.

Bulgular: Güncel kanıtlar, insan periodontal ligament hücreleri sferoidlerinin kolajen matris içerisinde kültüre edildikten sonra büyüme faktörleri eklenmesi ile *in-vitro* ortamda sementojenik farklılaşmaya uğrayabildiklerini göstermektedir. Ayrıca, gingival fibroblastların kolajen membranlar içerisine göç edebildiği gösterilmiştir.

Fibroblast sferoidlerinin buldukları mikro çevrede başarılı bir biçimde canlı kaldıkları ve üç boyutlu hidrojel matris içinde yer alan kolajen yapıyı tekrar düzenleyebildikleri gösterilmiştir. Buna ek olarak, hidrojel içindeki gingival sferoidlerin dağılımları ve göç karakteristiklerinin *in-vivo* ortama benzer olduğu gösterilmiştir.

Sonuç: Bu gelişmelerin ışığında, fibroblast sferoidlerinin bağ dokusu eldesinde mikro dokular olarak kullanılabilceği düşünülebilir. Ancak, bu yapıların rejeneratif kapasitesini inceleyen daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.