



İki-boyutlu ve Üç-boyutlu Hücre Kültür Modellerinde Güncel Gelişmeler ve Uygulamalar

Current Developments and Applications in 2D and 3D Cell Culture Models

Güneş Kibar¹ , Atakan Tevlek² 

¹MikroNanoPartikül (MNP) Araştırma Grubu, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, Polimer Anabilimdalı, Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Adana, Türkiye

²Atılım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı, Ankara, Türkiye

ABSTRACT

Cell culture models are critical tools in basic and applied biomedical research. While traditional 2B cell culture systems have been widely used due to their simplicity and ease of application, they fall short in mimicking the natural microenvironment of cells. To overcome these limitations, 3D cell culture models have been developed to better replicate cell-cell and cell-matrix interactions, enabling more accurate modeling of biological processes. In particular, microfluidic-based systems, organoids, and biomaterial-enriched 3D platforms have paved the way for innovative applications ranging from cancer research to tissue engineering. This review explores the historical development, advantages, disadvantages, and current applications of 2D and 3D cell culture models, along with their potential in biomedical research. Additionally, the impact of advanced technologies such as dynamic and magnetic cell culture on 3D models is discussed, offering a perspective on innovative approaches in this field.

Keywords: Tissue engineering, organoids, microfluidic systems, magnetic cell culture

ÖZET

Hücre kültür modelleri, temel ve uygulamalı biyomedikal araştırmalarda kritik bir araç olarak kullanılmaktadır. Geleneksel 2-boyutlu (2B) hücre kültür sistemleri, basitlikleri ve kolay uygulanabilirlikleri nedeniyle uzun yıllardır tercih edilmekle birlikte, hücrelerin doğal mikroçevrelerini yeterince taklit edememesi nedeniyle bazı sınırlamalara sahiptir. Bu eksikliklerin giderilmesi amacıyla geliştirilen 3-boyutlu (3B) hücre kültür modelleri, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini daha iyi yansıtarak biyolojik süreçlerin daha doğru bir şekilde modellenmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle mikroakışkan tabanlı sistemler, organoidler ve biyomalzemelerle zenginleştirilmiş 3B platformlar, kanser araştırmalarından doku mühendisliğine kadar geniş bir yelpazede yenilikçi uygulamalara kapı aralamıştır. Bu derleme, 2B ve 3B hücre kültür modellerinin tarihsel gelişimini, avantaj ve dezavantajlarını, güncel uygulamalarını ve biyomedikal araştırmadaki gelecekteki potansiyellerini ele almaktadır. Ayrıca, dinamik ve manyetik hücre kültürü gibi ileri teknolojilerin 3B modeller üzerindeki etkileri tartışılarak, bu alandaki yenilikçi yaklaşımlar için bir perspektif sunulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Doku mühendisliği, organoidler, mikroakışkan sistemleri, manyetik hücre kültürü

Giriş

Son yıllarda, spesifik hastalık tiplerinde ilaç ve aşı etkinliğinin belirlenmesi ile toksisite analizlerinin yapılması hem bireysel hem de toplum sağlığı açısından kritik bir öneme sahip olmuştur. Bu süreçler aynı zamanda sağlık hizmetlerinin maliyetlerini azaltma ve etkinliğini artırma hedefleri doğrultusunda büyük bir gereklilik haline gelmiştir¹⁻³. Örneğin, devlet kurumlarına ve endüstriye göre, kanser hastalığında son altmış yılda katı tümörler için geliştirilmiş yaklaşımların %90(±5) oranında başarısızlık ile sonuçlandığı raporlanmıştır³. Bu başarısızlığın başlıca bilimsel nedeni, katı tümörlerin kaotik moleküler yapısı ve sayısız genetik mutasyon içermesi olarak gösterilmektedir⁴⁻⁶.

Spesifik (kanser, KOVID-19, grip vb. gibi) hastalıklarda farklı genetik mutasyonların tespiti, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi ve önleyici aşı çalışmaları, bilim dünyasında öncelikli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bu doğrultuda, bilimsel çalışmalar kişiselleştirilmiş ve rejeneratif tıp yaklaşımlarına odaklanmıştır.



Kişiselleştirilmiş ve rejeneratif tıp, genotip ile fenotip arasındaki ilişkiyi inceleyen tanı testlerinin geliştirilmesini, ilaç ve aşılarda güvenlik ve etkinliğini artırmayı, aynı zamanda tedaviye erişimi kolaylaştırmak ve yaygın kullanım sağlamak amacıyla maliyetleri azaltmayı hedeflemektedir. Bu hedeflere ulaşmak, yeni nesil hücre kültür modellerinin geliştirilmesini ve kullanımın ön plana çıkarmaktadır.

Hücre bazlı analizler, hücre biyolojisini ve davranışı anlamak için biyomedikal, farmasötik ve biyoteknolojik araştırmalarda tartışmasız değerli temel bir araçtır⁷. Çoğunlukla teşhis/tanı yöntemlerinin geliştirilmesinde, ilaç keşfi ve taramasında, hastalık model çalışmalarında, doku mühendisliğinde ve rejeneratif tıpta hücre/doku kültürü yöntemleri ile hücre bazlı analizler gerçekleştirilmektedir^{8,9}. İyi tasarlanmış hücre kültürü modelleri, vücut içinde (*in-vivo*) karşılaşılabilecek birçok değişken göz önünde bulundurarak laboratuvar koşullarında kontrollü bir şekilde bu değişkenleri taklit etmeyi amaçlar. Böylece vücut dışında (cam üstünde *in-vitro*) hücrelere gerekli besinlerin ve mikro ortam koşullarının sağlandığı bir çalışma platformu oluşturulur^{10,11}.

Hücre kültürü tabanlı çalışmalar, araştırmacılara homojen ve iyi karakterize edilmiş hücre popülasyonları kullanma, hücrelerin fizikokimyasal ve fizyolojik koşullarını kontrol etme, sınır koşullarını inceleme ve hayvan modellerine olan bağımlılığı azaltma gibi önemli avantajlar sunmaktadır. Bu sayede, etik kaygılar azalmakta, maliyetler düşmekte ve sonuçların tekrarlanabilirliği artmaktadır^{11,12}.

Bu derleme, 2B ve 3B hücre kültür modellerinin gelişimini, avantajlarını ve dezavantajlarını, güncel uygulama alanlarını ve biyomedikal araştırmalardaki gelecek potansiyellerini kapsamlı bir şekilde incelemektedir. Ayrıca, dinamik ve manyetik hücre kültürü gibi ileri teknolojilerin 3B modeller üzerindeki etkileri değerlendirilerek, bu alandaki yenilikçi yaklaşımlar için önemli bir bakış açısı sunulmaktadır.

2-boyutlu (2B) hücre kültürü

Hücre bazlı analizlerin büyük bir kısmı, düşük maliyet, tekrarlanabilirlik ve kullanım kolaylığı gibi avantajlar göz önüne alındığında, günümüzde hala yaygın olarak tek katmanlı (monolayer) ya da iki boyutlu (2B) hücre kültür modellerine dayanmaktadır¹³. Örneğin ilaç geliştirme için standart süreç, ilacın bir 2B hücre kültür modelinde test edilmesiyle başlar, ardından hayvan modellerinde prelinik testlerin gerçekleştirilmesi ve son aşamada klinik denemelere geçilmesi ile devam eder¹⁴.

Bu hücre kültürü modelinde (Şekil 1), hücreler plastik veya camdan yapılmış kültür kaplarının düz yüzeyinde vücut içindeki (*in vivo*) koşulları taklit edecek şekilde tasarlanmış besin maddelerinin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin bulunduğu bir ortamda büyür¹⁵. 1900'lerin başında beri kullanılan köklü geçmişe sahip 2B hücre kültürü yaklaşımı¹³⁻¹⁶, basitliği, ilaç keşfinde yüksek hacimli tarama için maliyet-etkin ve güvenilir bir platform oluşturmuştur. Ancak yeni ilaçların test edilmesinde, insan vücudundaki doğal mikroçevrenin karmaşık yapısını doğru bir şekilde temsil etme ve yeni moleküllere karşı insan biyolojisinin tepkilerini tahmin etme konusunda her zaman başarılı sonuçlar verememektedir¹⁷⁻¹⁹. Bu sebeple prelinik çalışmalarda 2B hücre kültür modelleri ile elde edilen yeni ilaçların etkinlik tahminleri, yaklaşık %90 oranında klinik denemelerde başarısızlıkla sonuçlanmaktadır²⁰.

Tablo 1'de karakteristik özellikleri verilen 2B hücre kültür modelinde oluşan kısıtlamaların üstesinden gelmek için, son yıllarda hücre kültürü modelleme sürecinde anlamlı ilerlemeler kaydedilmiştir¹⁵.

2B hücre kültüründeki sınırlamalar, doğal doku ortamını daha iyi taklit etmeyi amaçlayan 3B hücre kültürü sistemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Buna rağmen, 2B kültürler, basitlikleri ve tekrarlanabilirlikleri sayesinde, başlangıç aşamasındaki ilaç testleri, gen ekspresyonu çalışmaları ve temel hücresel araştırmalar için önemli bir araç olmaya devam etmektedir²¹⁻²².

Tablo 1. 2B ve 3B hücre kültür modellerinin karakteristik özelliklerinin karşılaştırması

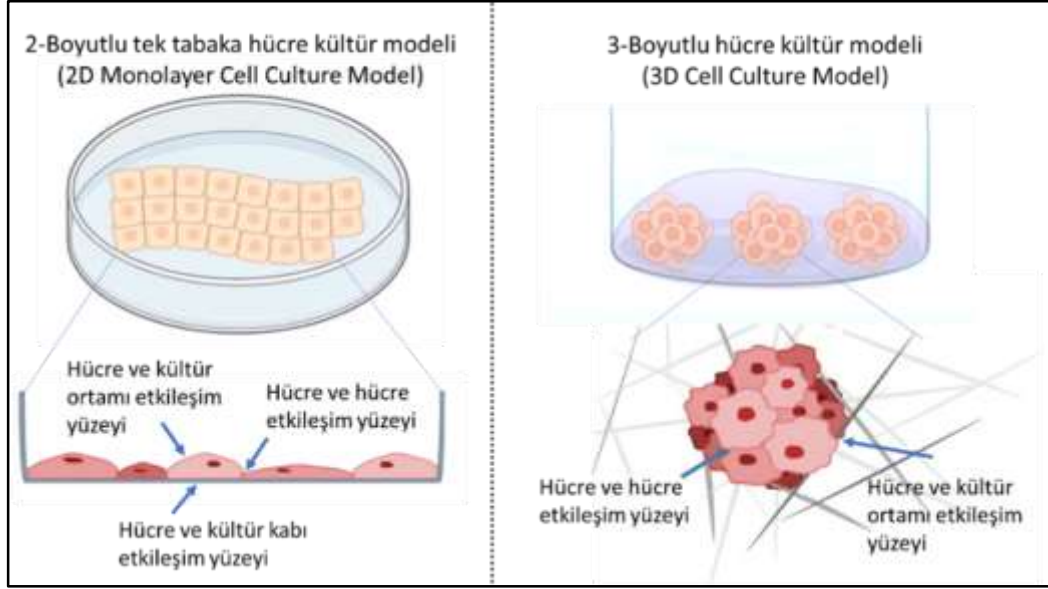
Karakteristik özellikleri	2B Hücre Kültürü	3B Hücre Kültürü	Ref
Kültür oluşturma süresi	Dakikalardan birkaç saate	Birkaç saatten birkaç güne	15,24
Hücre şekli	Düz ve uzamış, sadece tek tabaka halinde iki-boyutlu büyüyebilir ve genişleyebilir	Doğal hücre şekli ve hücre büyümesi, birden çok hücre katmanı, 3B kümeler/sferoidler	26,41,42
Hücre-kültür ortamı etkileşimi	Ortamdan bütün hücrelere aynı miktarda besin, oksijen, sinyal molekülleri için <i>in-vivo</i> şartların aksine sınırsız erişim sağlama, Kültürdeki çoğu hücrenin hücre döngüsünün aynı aşamada olması	Her hücre, kültür ortamından besin ve diğer moleküllere değişken erişim sağlama, Çekirdek hücrelerde daha az oksijen ve diğer moleküllere erişim, kanser tümör hücre yapısını <i>in-vivo</i> koşulları gibi taklit imkanı	29,43
Hücre-hücre etkileşimi	Hücre bağlantıları az ve birbirleri ile etkileşimden yoksun,	Hücre bağlantıları yaygın ve hücreden hücreye iletişime izin verir,	29,43
Moleküler mekanizma	Gen ve protein ekspresyon seviyeleri, biyokimyasal değişiklikler <i>in vivo</i> modellere kıyasla genellikle çok farklı	Gen ve protein ekspresyon seviyeleri, biyokimyasal değişiklikler <i>in vivo</i> hücrelerde bulunan seviyelere benzer	43-45
Hücre farklılaşması	Değişen morfoloji ve bölünme şekli; çeşitli fenotip ve polarite kaybı	Korunmuş morfoloji ve bölünme şekli, çeşitli fenotip ve polarite	42,46
Kültür oluşturma süresi	Dakikalardan birkaç saate	Birkaç saatten birkaç güne	15,24
<i>In vivo</i> taklit etme	Dokunun veya tümör kütesinin doğal yapısını taklit etmede, Vücut içi şartları temsil etmede yetersiz	Doku ve organları 3B vücut içi koşulları temsile yakın	25,42,47
İlaç duyarlılığı	İlaçlar iyi metabolize olmaz, hücreler ilaca karşı çok daha az direnç gösterir, Hücrelere uygulanan ilaçların başarılı bir tedavi olduğu izlenimi verir	İlaçları çok daha iyi metabolize etme, hücrelere ilaca karşı daha dirençlidir İlaç etkilerinin daha doğru bir temsilini gösterir	25,48,49
Apoptozis (Programlı ölüm)	İlaçlar hücrelerde kolayca apoptozu indükleyebilir	İlaça bağlı apoptoz için daha yüksek direnç sahiptir	11,25,50
Uyarılara yanıt	Hücreler, iki boyuta genişleyebildikleri için yerçekimini ve mekanik uyarıları aynı deneyimler Sadece tek katmanda yanıt üretirler	Hücreler mekanik uyarılara ve yerçekimine maruziyetini vücut içi ortama yakın daha doğru bir şekilde temsil edilmesi sağlar. Çok katmanlı hücre yanıtı üretirler	49,51
Kültür kullanımı, analiz ve kültür maliyeti	Yüksek performans, tekrarlanabilirlik, uzun süreli kültür, yorumlaması kolay, kültürün basitliği Ticari olarak bulunan ucuz testler ve kültür ortamları	Deneylerin tekrarlanabilirliği ve elde edilen verilerin yorumlanması zor Daha pahalı, daha fazla zaman alan, ticari olarak bulunan daha az bulunan testler	13,24,52

3-boyutlu (3B) hücre kültürü

3B hücre/doku kültür kavramı (Şekil 1), 20. yüzyılın ortalarına kadar uzanmakta olup, hücrelerin süspansiyon içinde yetiştirilmesi veya jel içinde yerleştirilmesi gibi erken çabalarla başlamıştır²¹. Ancak, 1990'lara gelindiğinde 3B doku kültürü konusunda gelişen malzeme teknolojileri ile önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalarda, hücrelerin 3B ortamda kültürlendiğinde doku mimarisi, gen ekspresyonu ve hücre davranışları daha doğru bir şekilde yansıttığını göstermiştir²³. Bu durum, biyomedikal araştırmalar ve ilaç keşfi için daha fizyolojik olarak geçerli modellere doğru bir geçişi işaret etmiştir.

2000'li yılların başından itibaren, Matrigel ve fibronektin gibi hücre dışı matris (ECM) bileşenlerinin ticari kullanımının yaygınlaşması, 3B kültür teknolojilerinin gelişimini hızlandıran önemli bir adım olmuştur. Ayrıca, mikro-fabrikasyon ve biyo-baskılama gibi ileri teknolojilerin geliştirilmesi, daha karmaşık ve yeniden üretilebilir 3B kültür modellerinin oluşturulmasını mümkün kılmıştır. Bu teknolojik yenilikler, ilaç geliştirme, kanser araştırmaları ve hastalık modellemesi gibi kritik biyomedikal alanlarda 3B kültür modellerinin kullanımını artırmış ve bu sistemlerin modern araştırmalardaki önemini daha da pekiştirmiştir. Özellikle ilaç testleri ve kanser çalışmaları gibi uygulamalardaki etkileri, 3B kültür teknolojilerinin biyomedikal bilimler için vazgeçilmez bir araç haline gelmesine olanak sağlamıştır.

Günümüzde 3B hücre kültür modelleri farklı mikro-mimari teknikleri ile geliştirilmektedir (Şekil 2). Bu teknikler (i) iskele ve/veya jel destekli (biyolojik ve/veya sentetik hidrojeller, çeşitli biyo-polimerik yapı iskeleleri) 3B kültürler (ii) iskeleden bağımsız (asılı-damla kültürleri, ultra-düşük-bağlanma gösteren kültür plakaları, hücre tabakaları oluşturma) 3B kültürler (iii) özelleşmiş 3B hücre kültür platformları (dönen rotasyonlu kültürler biyoreaktörler, mikro-desenli hücre kültür plakaları, biyo-baskılama, mikroakışkan cihazlar, manyetik hücre kültürleri) olarak hücre kültürü ve uygulamaları için günümüzde kullanılmaktadır²⁴.



Şekil 1. 2-boyutlu ve 3-boyutlu hücre kültürlerinin şematik gösterimi.

İskele destekli 3B hücre kültürleri

Bu 3B hücre kültür modelinde iskele kullanımdaki temel amaç hücreye hücre dışı matrikse (ECM) benzer bir mikro-çevre sağlayarak büyüme ve farklılaşmayı desteklemektir²⁵. Bu amaçla, hidrojeller ve polimerik yapılar gibi destek malzemeleri sıklıkla tercih edilmektedir. Hidrojel destekli 3B hücre kültürü sistemlerinde, hücreler agaroz tabakalar arasında veya Matrigel gibi farklı hidrojel ortamlarında kültüre edilmektedir. Genellikle 7 günlük kültür sürecinin ardından 3B hücresel yapılar gözlemlenmektedir (Şekil 2A)²⁶. Bu yöntemde, iki katmanlı agar/hidrojel hazırlığının zahmetli ve zaman alıcı olması, uzun süreli kültür gerekliliği, salgılanan hücresel ürünlerin örneklenmesindeki zorluklar, hücrelerin destek malzemesinden uzaklaştırılması ve immüno Floresans boyama süreçlerindeki güçlükler, deneysel sonuçların tekrarlanabilirliğini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Yapısında endojen büyüme faktörleri ve sitokinler barındırabilir. Bu biyolojik moleküller, hücrelerin fizyolojik davranışlarını değiştirebilir ve deneysel sonuçların güvenilirliğini etkileyerek yanıltıcı sonuçlara yol açma potansiyeli taşır²⁷.

Polimerik yapı iskelesi destekli 3B kültürlerde ise hücreler, ipek, kolajen, laminin veya aljinat gibi biyolojik olarak parçalanabilir malzemelerden üretilmiş lif ya da partikül formundaki yapı iskelelerine tutunmakta, bu iskelelerin arasındaki boşluklara göç ederek büyüme ve bölünmelerini sürdürmektedir²⁸. Bu yöntem, hidrojellerde sıkça karşılaşılan hücreleri ortamdan uzaklaştırma problemini ortadan kaldırmakla birlikte, kültür koşullarında hücrelerin yapı iskelelerine yapışıp düzleşmesine ve yayılmasına yol açabilmektedir. Kullanılan iskelelerin boyutu, malzeme türü ve yüzey topografyası, hücrelerin yapışma, büyüme ve davranışlarını doğrudan etkileyebilmektedir^{24,29}. Ayrıca, bu teknik bazı analizler için hücre gözlemi ve hücre ekstraksiyonu açısından kısıtlayıcı olabilmektedir²⁹.

İskeleden bağımsız 3B hücre kültürleri

Bu 3B hücre kültür modelinin temel amacı, hücrelerin dış etkilere bağımsız olarak yapışabilecek bir yüzey bulamaması ve bu sayede bir araya gelerek hücre kümeleri oluşturmalarını sağlamaktır³⁰. Bu amaçla, hücre-tabaka (cell-sheet), asılı-damla (hanging-drop) kültür ve ultra-düşük bağlanma yüzeyine sahip plaka (ultra-low-attachment plate) gibi teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hücre tabakası (cell sheet) tekniği, sıcaklık farkına bağlı yüzey hidrofobikliğini kontrol ederek hücre yapışmasına ve ayrılmasına izin veren termal-duyarlı plaka kullanımına dayanır³⁰. Bu teknik, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini koruyarak kornea, miyokard, karaciğer, kalp ve böbrek gibi dokular için *in vivo* ortamı taklit eden sinyaller elde edilmesinde umut verici sonuçlar sunmaktadır. Ancak, hastadan türetilen her bir hücre tabakasının üretimi oldukça maliyetli olup, kalın hücre tabakalarının hipoksik (oksijen eksikliği) mikro çevrelerin oluşmasına yol açarak hücre canlılığını olumsuz etkilediği bildirilmiştir³⁰.

Asılı-damla kültürü tekniğinde, hücreler yüzey gerilimi nedeniyle hücre süspansiyonu oluşturduğu damlacıklar içerisinde askıda kalır ve yerçekimi ile kendiliğinden kümelenir (Şekil 2B)³¹. Uygulama zorluğu ve deneylerin tekrarlanabilirliği tekniğin dezavantajlarıdır³². Uzmanlaşmış kişiler tarafından yapılan bile bir hücre kültür modelidir.

Ticari olarak satılan ultra-düşük-bağlanma yüzeyine sahip plakalar ile 3B hücre kümeleri yaklaşık 3 günlük bir kültür süresince elde edilmektedir. Ancak özelleşmiş yüzeyli kültür plakaları oldukça maliyetli olduğu, görüntüleme analizinde hücre kümelerinin kuyucuklardaki tespitinin zorluğu, taze kültür ortamını kuyucuklara eklemenin yoğun emek ve dikkat gerektirdiği bu tekniğin dezavantajları olarak bilinmektedir³².

Bahsi geçen tekniklerin önemli bir avantajı, iskele kullanımına gerek duyulmaması nedeniyle oluşan hücre kümelerinin ışık mikroskobu, floresan mikroskobu ve konfokal mikroskop gibi yöntemlerle kolaylıkla görselleştirilebilmesidir. Ayrıca, iskele materyalinden kaynaklanabilecek potansiyel toksik etkilerin bulunmaması ve iskele malzemesinin uzaklaştırılması ya da saflaştırılması gibi ek işlemlere ihtiyaç duyulmaması, bu yöntemlerin tercih edilirliliğini artırmaktadır.

Özelleşmiş 3B hücre kültür platformları

Bu platformların temel amacı, farklı mühendislik tekniklerini kullanarak yüksek performanslı ve belirli özelliklere sahip hücre kümelerinin oluşturulmasını sağlamaktır. Bu amaç doğrultusunda, döner rotasyonlu biyoreaktörler, mikro-desenli hücre kültür plakaları, biyo-baskılama (bioprinting) teknikleri ve mikroakışkan cihazlar kullanılmaktadır.

Döner rotasyonlu biyoreaktörler

Döner rotasyonlu biyoreaktörlerde ve biyoreaktörlerde, süspansiyon kültürleri temel alınarak hücreler süspansiyon ortamında hafif ajitasyon veya çalkalama ile karıştırılır. Bu yöntem, hücrelerin kap duvarlarına yapışmasını önlerken, hücre-hücre etkileşimini artırarak hücre kümelerinin oluşumunu sağlar (Şekil 2C)³³. Bu sistemlerde hücre kültür ortamının nispet daha kolay değiştirilmesi, ortama oksijen ve besi yerinin sağlanması yüksek verimde hücre kümeleri elde etmede avantaj sağlarken, hareketten kaynaklanan kesme kuvveti, hücresel fizyolojilerini değiştirebilir. Elde edilen hücre kümelerinin farklı boyutlarda olması kontrollü büyüme sağlanamaması ilaç tarama tahlillerinde dezavantaj oluşturmaktadır.

Düşük bağlanma gösteren hücre kültür plakaları

Hücre kümelerini bir hücre ekiminde hem çok sayıda hem de eş boyutta elde etmek amacıyla kuyucukları farklı modifikasyonlar içerecek şekilde (örneğin AggreWell™ microwell plate, veya Corning Elplasia plate) (Şekil 2B) tasarlanmıştır³⁴.

Mikro-desenli hücre plakaları

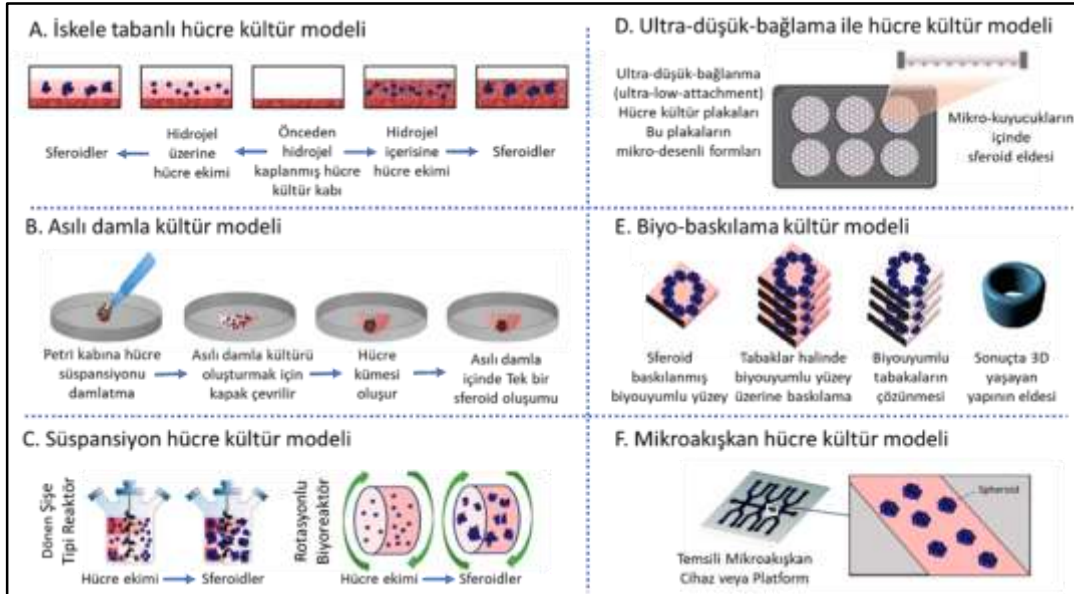
Mikro-desenli hücre plakaları birçok hücre tipiyle uyumludur ve yüksek verimli tarama, kanser/tümör biyolojisi, kök hücre biyolojisi, hücre tedavisi araştırması ve 3B doku mühendisliği dahil olmak üzere ilaç taraması gibi birçok uygulamada kullanılabilir. Her ne kadar birçok hücre tipi için uygun bulunsun da hücre kültür protokolünün optimizasyonu için birkaç tane plaka zayıfatı verilmektedir. Mikro-desenli plakalar çok yüksek maliyetli oldukları için araştırma laboratuvarlarında veya kısıtlı bütçeli araştırmalarda tercih edilmemektedir. Bunun yanı sıra hücre kültürü ortam değişimi esnasında 3 boyutlu hücre kümelerinin kuyucuklarda yerlerinin değişmesi ve bir kısmının pipetleme sonrası kayba uğraması kültür sonrası analizler için bu plakaların dezavantajı olarak gösterilebilir.

Biyo-baskılama

Biyo-baskılama tekniği, hücrelerin biyolojik veya biyokimyasal materyaller üzerine hassas bir şekilde konumlandırılarak katman katman 3B hücre kümeleri oluşturulması prensibine dayanır (Şekil 2E)³⁵. Bu teknik ile farklı biyo-mürekkepler (bioink) kullanarak tümör mikro çevresini sitokinler, hücre dışı matriks ve hücrelerle taklit etmek mümkündür. Ancak maliyet, hücre canlılığı, hücre yoğunluğu ve hücrelere uygun işlevlerde en iyi desteği verecek yeni malzemelerin (biopaper) geliştirilme ihtiyacı bu sistemin dezavantajlarını oluşturmaktadır²⁹.

Mikroakışkan cihazlar veya platformlar

Mikroakışkan cihazlar veya platformlar ile 3B hücre kültürleri yönetimi büyüme faktörlerinin veya besin maddelerinin sürekli olarak salınmasına izin vererek hücrel mikro ortamın doğru kontrolünü sağlar (Şekil 2F)³⁶. Mikroakışkan sistemler genellikle PDMS (polidimetilsiloksan) yapıda olup akış sisteminde hücreleri devamlı besleme ile vücut benzeri bir ortam sağlar. Erken dönem çalışmalarda, mikroakışkan çipler üzerinde 2B kültürler kullanılarak canlılık, toksisite ve ilaç taşıma analizleri yapılmıştır³⁷. Örneğin Gökdoğan ve arkadaşlarının çalışmasında, mikroakışkan çipin cam yüzeyini fibronektin kaplayarak üzerinde 2B karaciğer hücrelerini kültüre etmiş ve 3B akış ortamında manyetik nanoparçacık toksisite analizleri yapılmıştır. İlerleyen çalışmalarda, çip içerisinde sferoid ve organoid denilen 3B hücre kümelerinin kültürleri ile çip-üstü-organ (organ-on-chip) sistemleri geliştirilmiştir³⁶.



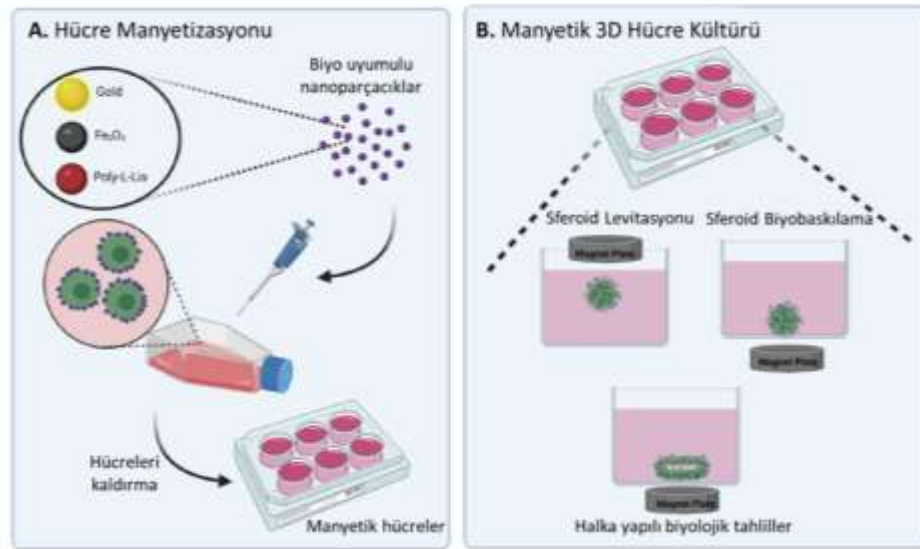
Şekil 2. 3B hücre kültürlerinde farklı mikro-mimari tekniklerinden birkaçının açıklayıcı temsili görsel gösterimi (a) iskele tabanlı hücre kültür modeli, (b) asılı damla kültür modeli, (c) süspansiyon hücre kültür modeli, (d) ultra-düşük-bağlama ile hücre kültür modeli, (e) biyo-baskılama hücre kültür modeli, (f) mikroakışkan hücre kültür modeli.

Sferoidler, hücre kültürü araştırmalarında kullanılan birincil kaynaklardan veya hücre hatlarından elde edilen küresel hücre türü belli kümeleridir. Genellikle, biyopsi veya dokulardan türetilen araştırmada incelenecek organın kaynağına benzer bazı fizyolojik işlevleri özetleme yeteneğine sahip çok hücre çeşidi olan karmaşık yapıları sferoidlerde, organoid olarak bilinmektedir.

Mikroakışkan sistemler, çip üzerinde organoid ve sferoid oluşumu ile hücre kültürü için farklı çip geometrileri ve platformlarla kontrollü bir çalışma ortamı sunmaktadır. Bu sistemler sayesinde çip-üstü-akciğer ve çip-üstü-karaciğer modelleri gibi organ spesifik platformların yanı sıra, kanser modelleri ile Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklar için kök hücre kaynaklı nöronal modeller de geliştirilmiştir³⁸. Mikroakışkan sistemlerde, hücrelerin akış sırasında çip içerisinde stabil bir şekilde tutulması, 3B görüntüleme olanaklarının geliştirilmesi ve sferoid veya organoid yapıların homojen besin ve oksijen dağılımını sağlayacak şekilde desteklenmesi, bu teknolojilere özgü başlıca zorluklar arasında yer almaktadır. Bu konular, halen yoğun araştırmaların yürütüldüğü ve yenilikçi mühendislik çözümleri gerektiren alanlardır.

Manyetik 3 boyutlu hücre kültürü (m3B)

Manyetik 3 boyutlu hücre kültürü (m3B), manyetik kuvvetler kullanılarak 3B hücre kümelerinin oluşturulmasını sağlayan ve mikro-doku mimarisi geliştirme açısından umut vadeden en yeni yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir³⁹. Manyetik 3B hücre kümelerini, hücrelerin nanoparçacıklar ile manyetizasyonu veya manyetik alanın kullanımı ile hücrelerin (havaya kaldırma: levitasyon veya biyo-baskılama: bioprinting yöntemleriyle) bir araya gelmesi sağlanır (Şekil 3). Bu aşamada önemli olan kullanılan manyetik alanın veya manyetik nanoparçacıkların hücre üzerinde toksisite yaratmaması, hücrenin metabolik, fonksiyonel ve bölünme gibi özelliklerini etkilememesi gereklidir. Yapılan çalışmalar sonucunda uygun manyetik alan ve manyetik nanoparçacıklar için uygun konsantrasyon ayarlandığında istenilen özelliklere ulaşabildiği gösterilmiştir³⁹. Hücrelerin manyetik parçacıklarla işaretlenmesi, hücre kümelerinin manyetik manipülasyonunu kolaylaştırmakla birlikte, hücre görüntüleme süreçlerinde bazı zorluklara yol açmaktadır. Ayrıca, hücre membranına yapışan veya hücre içine giren nanoparçacıkların hücrelerin metabolik özelliklerini etkilediği bilinmektedir.



Şekil 3. m3B hücre kültürü metodolojisinin şematik gösterimi A. Hücre manyetizasyonu: Hücreler istenilen sayıya kadar 2B çoğaltılır ve manyetik nanoparçacıklar ile manyetize edilir. B. Manyetize edilmiş hücreler, doğal (neodimyum gibi) magnet konumlandırılması ile düşük bağlanma yüzeyine sahip plakalar kullanılarak sferoidler veya hücre kümeleri elde edilir. Magnet hücre kültür plakasının üzerine konumlandırarak hücre kümeleri havaya (levitation) kaldırılabilir ve hava-sıvı yüzey arası kültüre edilebilir. Magnet hücre kültür plakası altına konumlandırılarak hücreleri plaka altında kümelenmesi sağlanabilir biyo-baskılama (bioprinting) yapılabilir. Magnet farklı şekillerde yerleştirilerek halka veya farklı geometrilerde hücre kümeleri oluşturulabilir.

Manyetik levitasyon

Manyetik levitasyon yöntemiyle hücre kümeleri, hücrelerin manyetik nanoparçacıklarla işaretlenmesi yoluyla oluşturulabileceği gibi, hücrelerin nanoparçacıklarla işaretlenmesine gerek kalmadan belirli koşullarda manyetik alan uygulanarak da elde edilebilmektedir. Inevi ve çalışma arkadaşları, farklı konsantrasyonlarda Gd^{3+} ve çeşitli boyutlarda polimerik parçacık içeren bir hücre kültür ortamını mikro-kapiller bir kanala yerleştirerek, bu ortamı halka şeklindeki bir miknatısın arasına konumlandırmış ve hücre kümeleri oluşturmayı başarmıştır⁴⁰. Hücrelere etki eden yerçekimi kuvvetini ve dolayısıyla manyetik levitasyonu sağlamak için gereken manyetik duyarlılığı azaltmak amacıyla, ortamın yoğunluğu Ficoll® PM 400 (hücre kültür ortamına eklenen hidrofilik, şeker bazlı bir polimer) ile artırılmıştır. Bu koşullar altında, hücreler paramanyetik kültür ortamında kendiliğinden kümelenecek sferoidler oluşturmuştur⁴⁰. Geliştirilen bu sistem, hücre membranının manyetik nanoparçacıklarla işaretlenmesinden kaynaklanabilecek dezavantajları ortadan kaldırmaktadır. Ancak, eppendorf tüp içerisinde kültür ortamı değişimi sırasında sferoidin pipetlenmeden mevcut kültür ortamının uzaklaştırılması ve yenisinin eklenmesi, teknik bir beceri gerektirmektedir. Ayrıca, bu sistemde kullanılan hücre kültür ortamlarında yer alan katkı maddelerinin ve paramanyetik iyonik konsantrasyonların hücreler üzerindeki metabolik veya toksik etkileri henüz ayrıntılı bir şekilde incelenmemiştir. Yüksek verimli ilaç testleri ve toksisite analizleri için bu yöntemin uygulanabilirliği, nadir toprak elementi olan Gd^{3+} iyonunun kullanımı nedeniyle ekonomik açıdan sınırlayıcı olabilmektedir. Manyetik levitasyon yöntemiyle sıfır yerçekimi etkisi altında gerçekleştirilen bu yenilikçi statik hücre kültür tekniği, birden fazla sferoid üzerinde aynı anda çalışmayı gerektiren yüksek verimli ilaç tarama deneylerinde pratiklik ve maliyet açısından geliştirilmesi gerekmektedir.

Sonuç

Hücre kültür modelleri, özellikle ilaç geliştirme ve hastalık modellemesi alanlarında biyomedikal araştırmaların temel araçlarından biri olarak önemli bir rol oynamaktadır. Geleneksel olarak yaygın kullanılan iki boyutlu (2B) hücre kültürleri, basitlik ve maliyet etkinliği gibi avantajlar sunsa da insan biyolojisini doğru şekilde simüle edemedikleri için ilaç testlerinde yüksek başarısızlık oranlarına yol açmaktadır. Bu sınırlamaları aşabilmek amacıyla, üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinin geliştirilmesi gereksinimi ortaya çıkmıştır.

3B hücre kültürleri, hücrelerin doğal mikroçevrelerini daha etkin bir şekilde taklit ederek, daha fizyolojik ve doğru sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. 1990'lı yıllarda teknolojik gelişmelerin hız kazanmasıyla, hücre dışı matris bileşenlerinin kullanımı yaygınlaşmış ve mikro-fabrikasyon, biyobaskılama gibi ileri düzey teknolojiler sayesinde 3B hücre kültür modelleri giderek daha karmaşık hale gelmiştir. Farklı 3B kültür teknikleri, iskele destekli, iskeleden bağımsız ve özelleşmiş platformlar gibi çeşitli yaklaşımlar sunmakta olup, her birinin biyomedikal araştırmaların özel ihtiyaçlarına göre özelleştirilmesi mümkün olmuştur. Örneğin, döner biyoreaktörler, mikro-desenli plakalar ve mikroakışkan cihazlar gibi teknolojiler, hücre kümelerinin daha verimli bir şekilde büyümesini sağlamak ve biyolojik testlerin doğruluğunu artırmaktadır.

Sonuç olarak, 3B hücre kültürleri, 2B hücre kültürlerinin eksikliklerini gidermeye yönelik güçlü bir alternatif sunmakta ve ilaç araştırmaları, kanser tedavisi ve hastalık modellemesi gibi alanlarda önemli uygulama potansiyeline sahiptir. Bu teknolojilerin ilerlemesiyle birlikte, biyomedikal araştırmaların daha doğru, güvenilir ve verimli hale gelmesi beklenmektedir.

3B hücre kültür modelleri, özellikle sferoidler ve organoidler aracılığıyla, 2B kültürlerin sınırlamalarını aşma potansiyeli taşımakta ve mevcut ile yeni geliştirilen terapötik ajanların taranmasında temel bilim ve klinik uygulamalarda umut vadeden perspektifler sunmaktadır. Bu gelişmiş mikro ve makro ölçekli 3B platformlar, hastalık modellemesi, kanser ve COVID-19 gibi spesifik hastalıklara yönelik güçlü ilaçların keşfi ve ilaç tarama süreçlerinde önemli bir potansiyel taşımaktadır.

Kaynaklar

1. Ramezankhani, R. et al. Organoid and microfluidics-based platforms for drug screening in COVID-19. *Drug Discovery Today*. 2022;27:1062-76.
2. Deb, B., H. Shah, and S. Goel, Current global vaccine and drug efforts against COVID-19: Pros and cons of bypassing animal trials. *Journal of biosciences*. 2020;45:1-10.

3. Maeda, H. and M. Khatami, Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs. *Clinical and translational medicine*. 2018;7:1-20.
4. Shaverdian, N et al., Effects of tumor mutational burden and gene alterations associated with radiation response on outcomes of postoperative radiation therapy in non-small cell lung cancer. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2022;113:335-44.
5. Mirfakhraie, R. et al. Treatment failure in acute myeloid leukemia: focus on the role of extracellular vesicles. *Leukemia Research*. 2022;112: 106751.
6. Di Federico A. et al. Immunotherapy in pancreatic cancer: why do we keep failing? A focus on tumor immune microenvironment, predictive biomarkers and treatment outcomes. *Cancers*. 2022;14:2429.
7. Hudu, S.A. et al. Cell culture, technology: enhancing the culture of diagnosing human diseases. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2016;10:DE01.
8. Huang, D. et al. Liver spheroids on chips as emerging platforms for drug screening. *Engineered Regeneration*. 2022.
9. Barbosa, M.A. et al. 3B cell culture models as recapitulators of the tumor microenvironment for the screening of anti-cancer drugs. *Cancers*, 2022;14:190.
10. Marchini, A. and F. Gelain, Synthetic scaffolds for 3B cell cultures and organoids: applications in regenerative medicine. *Critical reviews in biotechnology*. 2022;42:468-86.
11. Fontoura, J.C. et al. Comparison of 2B and 3B cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;107:110264.
12. Namekawa, T., et al., Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells. *Cells*. 2019;8:74.
13. Kapalczyńska, M., et al., 2B and 3B cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. 2018;14:910-19.
14. Mittal, R. et al. Organ-on-chip models: implications in drug discovery and clinical applications. *Journal of cellular physiology*. 2019;234:8352-80.
15. Duval, K. et al. Modeling physiological events in 2B vs. 3B cell culture. *Physiology*, 2017;32:266-77.
16. Harrison, R. Biology and medicine. Observations on the living developing nerve fiber. in *Sci. Proc*. 1907.
17. LaBarbera, D.V., B.G. Reid, and B.H. Yoo, The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*. 2012;7:819-30.
18. Brancato, V. et al., Could 3B models of cancer enhance drug screening? *Biomaterials*. 2020;232:119744.
19. Godugu, C. et al., AlgiMatrix™ based 3B cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. *PloS one*. 2013;8:e53708.
20. Marques, I.A., et al. Magnetic-Based Human Tissue 3B Cell Culture: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23:12681.
21. Moro, L.G. et al. A Brief Review on the Cell Culture History: From Harrison to Organs-on-a-Chip. 2024.
22. Kibar, G., et al. Evaluation of drug carrier hepatotoxicity using primary cell culture models. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2023;48:102651.
23. Bissell, M.J. and W.C. Hines, Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine*. 2011;17:320-29.
24. Jensen, C. and Y. Teng, Is it time to start transitioning from 2B to 3B cell culture? *Frontiers in molecular biosciences*. 2020;7:33.
25. Ravi, M., et al. 3B cell culture systems: advantages and applications. *Journal of cellular physiology*. 2015;230: 16-26.
26. Luckert, C. et al. Comparative analysis of 3B culture methods on human HepG2 cells. *Archives of toxicology*. 2017;91:393-406.
27. Aisenbrey, E.A. and W.L. Murphy, Synthetic alternatives to Matrigel. *Nature Reviews Materials*. 2020;5:539-51.
28. Carletti, E., A. Motta, and C. Migliaresi, Scaffolds for tissue engineering and 3B cell culture. *3B Cell Culture: Methods and Protocols*. 2011;17-39.
29. Hoarau-Véhot, J. et al. Halfway between 2B and animal models: are 3B cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International journal of molecular sciences*. 2018;19:181.
30. Alghuwainem, A., A.T. Alshareeda, and B. Alsowayan, Scaffold-free 3-D cell sheet technique bridges the gap between 2-D cell culture and animal models. *International journal of molecular sciences*. 2019;20:4926.
31. Timmins, N.E. and L.K. Nielsen, Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Tissue engineering*. 2007;141-51.
32. Amaral, R.L. et al. Comparative analysis of 3B bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. *Frontiers in physiology*. 2017;8: 605.
33. Barrila, J. et al. Organotypic 3B cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8:791-801.
34. Basu, A., et al. Ready to go 3B? A semi-automated protocol for microwell spheroid arrays to increase scalability and throughput of 3B cell culture testing. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2020;30:590-604.
35. Jorgensen, C. and M. Simon, In vitro human joint models combining advanced 3B cell culture and cutting-edge 3B bioprinting technologies. *Cells*. 2021;10:596.
36. Russo, M., C.M. Cejas, and G. Pitingolo, Advances in microfluidic 3B cell culture for preclinical drug development. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2022;187:163-204.
37. Li, L., et al. A microfluidic 3B hepatocyte chip for hepatotoxicity testing of nanoparticles. *Nanomedicine*. 2019;14: 2209-26.
38. Van Duinen, V. et al. Microfluidic 3B cell culture: from tools to tissue models. *Current opinion in biotechnology*. 2015;35:118-26.

39. Caleffi, J.T. et al. Magnetic 3B cell culture: State of the art and current advances. *Life Sciences*. 2021;286:120028.
40. Anil-Inevi, M. et al. Magnetic levitation assisted biofabrication, culture, and manipulation of 3B cellular structures using a ring magnet based setup. *Biotechnology and Bioengineering*. 2021;118:4771-85.
41. Bonnier, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2B and 3B cell culture models. *Toxicology in vitro*, 2015;29:124-31.
42. Soares, C.P. et al. 2B and 3B-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PloS one*. 2012;7: e38147.
43. Rodríguez-Hernández, M.A. et al. Differential effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in 2B/3B culture according to cell differentiation, p53 status and mitochondrial respiration in liver cancer cells. *Cell Death & Disease*. 2020;11:339.
44. Luca, A.C., et al. Impact of the 3B microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PloS one*. 2013;8:e59689.
45. Liu, H., J. Lin, and K. Roy, Effect of 3B scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*. 2006;27:5978-89.
46. Baharvand, H., et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2B and 3B culture systems in vitro. *International journal of developmental biology*. 2004;50:645-52.
47. Padmalayam, I. and M.J. Suto, 3B cell cultures: Mimicking in vivo tissues for improved predictability in drug discovery. *Annual reports in medicinal chemistry*. 2012;47:367-78.
48. Breslin, S. and L. O'Driscoll, The relevance of using 3B cell cultures, in addition to 2B monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*. 2016;7:45745-56.
49. Souza, A.G. et al. Comparative assay of 2B and 3B cell culture models: proliferation, gene expression and anticancer drug response. *Current pharmaceutical design*. 2018;24:1689-94.
50. Imamura, Y., et al. Comparison of 2B-and 3B-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology reports*. 2015;33:1837-43.
51. Melissaridou, S. et al. The effect of 2B and 3B cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer cell international*. 2019;19:1-10.
52. Wendt, D. et al. Potential and bottlenecks of bioreactors in 3B cell culture and tissue manufacturing. *Advanced materials*. 2009;21:3352-67.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Güneş Kibar
Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi
Adana, Türkiye
e-mail: gkibar@atu.edu.tr

Geliş tarihi/ Received: 25.12.2024

Kabul tarihi/Accepted: 04.06.2025

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 123M943 tarafından desteklenen proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.