



Kitosan Kaplı Yüzeylerde Kollajen, Vitronektin ve Jelatinin Üç Boyutlu HEK293 Hücre Kültürüne ve Hücrel Kollajen Salınımına Olan Etkileri

Effects of Collagen, Vitronectin and Gelatin on Three-Dimensional HEK293 Cell Culture and Cellular Collagen Release on Chitosan-Coated Surfaces

Mustafa Gökhan ERTOSUN

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

Yazışma Adresi

Correspondence Address

Mustafa Gökhan ERTOSUN

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik
Cerrahi Anabilim Dalı,
Antalya, Türkiye

E-posta: mgertosun@akdeniz.edu.tr

Geliş tarihi \ Received : 05.04.2020

Kabul tarihi \ Accepted : 07.06.2020

Elektronik yayın tarihi : 04.03.2021

Online published

Bu makaleye yapılacak atıf:

Cite this article as:

Ertosun MG. Kitosan kaplı yüzeylerde kollajen, vitronektin ve jelatinin üç boyutlu HEK293 hücre kültürüne ve hücrel kollajen salınımına olan etkileri. Akd Tıp D 2021; 7(1):134-42.

Mustafa Gökhan ERTOSUN

ORCID ID: 0000-0002-2557-7346

ÖZ

Amaç: Son zamanlarda *in vivo* ve klinik çalışmalara uyarlanmasının daha kolay olması nedeniyle üç boyutlu kültür oluşturulması oldukça önem kazanmıştır. Üç boyutlu kültür çalışmaları açısından hem maliyeti hem de farklı hücrelerde uygulanabilmesi nedeniyle kitosan materyali ön plana çıkmaktadır. Projemizde hücreler arası matriks elemanlarının kitosan yüzeylere kaplanması, hücrel sferoid oluşumuna ve Hücrelerarası Matriks Elemanları (HME) salınımına olan etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışmada, HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hatlarında farklı hücreler arası matriks elemanları ile kaplanmış kitosan yüzeylerde oluşturdukları sferoid yapıları mikroskop altında incelenmiştir. Ayrıca HEK293 hücrelerinin ortama salgıladıkları kollajen miktarları ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir.

Bulgular: Farklı hücreler arası matriks elemanları ve onların konsantrasyonlarının HEK293 hücrelerinin sferoid oluşumlarını farklı etkilediği tespit edilmiştir. HEK293 hücreleri yaygın olmayan ama büyük sferoid odakları oluştururken, ortamda sadece kollajen tip 1 ve jelatinin varlığında daha yaygın ve bütün yüzeye yayılım gösteren sferoidler oluşturmaktadır. Vitronektin ise sferoid oluşumunu negatif yönde etkilemektedir. Ayrıca hücreler arası matriks elemanlarının farklı dozları ve kombinasyonları ortama salınan kollajen tip 1 ve kollajen tip 4 miktarını etkilediği saptanmıştır.

Sonuç: Değişen hücreler arası matriks elemanları ve konsantrasyonu 3 Boyutlu (3B) kültür oluşumunu etkilemektedir. Hücrelerin sferoid oluşumunun artışı sağlayan koşulların, hücrelerden ortama salgılanan kollajen miktarını değiştirdiği de gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: 3 Boyutlu Kültür, Kitosan, Kollajen, Vitronektin, Jelatin

ABSTRACT

Objective: Recently, it has become very important to create a three-dimensional culture as it is easier to adapt to *in vivo* and clinical studies. In terms of three-dimensional culture studies, chitosan material comes to the fore because of its cost and its use in different cells. The effects of chitosan surfaces coated with extracellular matrix elements (ECM) on cellular spheroid formation and cellular ECM release were investigated in this study.

Material and Methods: Spheroid structures formed by human embryonic kidney cell lines (HEK293) on different ECM-coated chitosan surfaces were examined under a microscope. In addition, the amount of collagen released by HEK293 cells was determined by the ELISA method.

Results: It was determined that the different extracellular matrix elements and their concentrations affect the spheroid formation of HEK293 cells on chitosan surfaces. While HEK293 cells form large spheroid structures with fewer foci on chitosan surfaces, they create larger spheroids in the presence of only collagen type 1 or gelatin on chitosan surfaces. Vitronectin negatively affects spheroid formation. In addition, different doses and combinations of extracellular matrix elements have been found to affect the amount of collagen type-1 and collagen type-4 released into the micro-environment.

Conclusion: Changing extracellular matrix elements and their concentrations used with a chitosan surface affects 3D culture formation. It has also been shown that the conditions that increase the spheroid formation of cells change the amount of collagen secreted from cells to the micro-environment.

Keywords: 3D Culture, Chitosan, Collagen, Vitronectin, Gelatin

DOI: 10.17954/amj.2021.2700

GİRİŞ

Hücre kültürü deneyleri biyolojik bilimlerin temelini oluşturmakta ve önemli buluşların oluşturulmasında önem arz etmektedir.

Hücre kültürü tıbbi bilimlerin en önemli basamaklarından biri olsa da hücrelerin sadece yatay ortamda büyümesine (2-boyutlu) izin vermesi nedeniyle bazı kısıtlamalara sahiptir. 2B (2-boyutlu) hücre kültüründe hücrelerin büyümesinde meydana gelen kontak inhibisyon, bütün hücrelerin bir organizasyon göstermeden kendi kaderini yaratması nedeniyle gerçek bilimsel verilerin elde edilmesinde bazı problemlere ve yanılsamalara neden olacağı aşikârdır. Ayrıca şu bir gerçektir ki; *in vivo* dokulardaki hücreler, plastik bir tabak üzerine kaplanmış tipik kültürlenmiş hücrelerden çok farklı bir mikro çevreye maruz kalmaktadır (1).

Son zamanlarda bu hücre kültüründeki kısıtlamaların önüne geçilmesi için *in vitro* ortamda 3 boyutlu (3B) hücre kültürü çalışmaları hız kazanmaktadır. Bu hızlanmanın nedeni, 3B model olarak kültürlenen hücrelerin kompleks *in vivo* koşullara daha yakın özellikler sergilemesidir (2). 3B kültür modellerinin *in vivo* uygulamalara adapte edilmesinin daha gerçekçi ve kolay olduğu kanıtlanmıştır. İki boyutlu hücre kültürü bize mükemmel homojen bir çalışma materyali sağlarken, 3B hücre kültürü hücreleri doğal koşullara bir adım daha yaklaşacak şekilde davranmaya iter. Bu nedenlerle 3B kültür modelleri *in vivo* uygulamalar için çalışma bulgularını çevirmede daha gerçekçi bir yöntemdir (3).

Optimum 3B koşulu gerekliliklerinin hücre tipleri arasında değiştiği ve 3B kültürlerindeki kullanılan yöntemlere göre değiştiği de bilinmektedir (3). 3B kültür oluşturulmasında altı ana grup içerisinde sınıflandırılmış materyalin literatürde kullandığı bilinmektedir (3). Bu gruplar;

1. Hücreler arası Matriks (Doğal)
2. Hücreler arası Matriks (Sentetik)
3. Biyolojik ve Sentetik hibritler
4. Metaller
5. Seramik ve biyoaktif camlar
6. Karbon nanotüpler'dir.

Bu gruplarda bulunan materyaller ile oluşturulan her üç boyutlu hücre kültür metodunun birbirine karşı farklı avantajları bulunmaktadır. Ama her laboratuvarında kullanılabilen basitlikte ve de maliyette olması nedeniyle genelde doğal hücreler arası matriks elemanları daha çok tercih edilmektedir. Bunlar arasında en sık kullanılanlar ise kitosan, kollajen, vitronektin ve jelatindir.

Kitosan, beta-(1->4)-bağlı N-asetil-D-glukosamin ve D-glukozamin birimlerinin bir kopolimerdir ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilir, eklem bacaklı ekzostonlarda bulunur. Glikosaminoglikanlar (GAG) ve hiyalüronik asit ile bazı özellikleri paylaştığından, çeşitli doku mühendisliği

uygulamalarında kullanılır (4). Ek olarak kitosanın biyobozunur, biyoyumlu, antijenik olmayan, toksik olmayan ve iki yönlü özellikleri, bu polimeri yara sargıları ve ilaç taşıma sistemi (5) açısından uygun bir malzeme hâline getirir. Kitosanın hücre bağlanması ve çoğalmasında rol oynadığı bilinmektedir (6).

Hücreler arası matriks yapısında en sık bulunan kollajen, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yara sargıları ve suni deri dahil olmak üzere birçok tıbbi uygulama için onaylanmıştır (7, 8). Kollajen, RGD gibi hücre yapışma alanı sekansları içerir ve böylece fenotip ve çeşitli hücrelerin fonksiyonlarının korunmasına yardımcı olur.

Vitronektin (VN), hücreler ve ECM arasında integrinler, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ve ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü (uPAR) gibi çeşitli ligandlar aracılığıyla bir bağlantı görevi gören yapışkan bir glikoproteindir. Plazmada monomerik veya dimerik bir yapı (katlanmış veya doğal form) olarak ve birkaç dokunun hücreler arası matriksinde multimerik bir oluşum (katlanmamış veya aktif form) olarak bulunur (9, 10).

Jelatin, kollajenin kısmi denatürasyonu ile elde edilen doğal bir proteindir. Hücre yapışması için uygun fonksiyonel grupları korur ve biyolojik olarak bozunabilir, biyoyumlu ve immünojenik olmayan yapısı jelatini uygun bir malzeme hâline getirmektedir (11, 12).

Literatürde bu materyallerin tek başlarına kullanımları mevcuttur. Bunlara ek olarak yapılan çalışmalarda kitosan'a kollajen veya jelatin kombine edilmesiyle oluşturulmuş üç boyutlu kültür çalışmaları da literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır (13-17). Fakat bu materyallerin birden farklı kombinasyonlarının hücresel sferoid oluşumuna etkileri daha önce literatürde karşılaştırılmamıştır. Aynı şekilde farklı kombinasyonların, hücrelerin buldukları ortama (mikroçevreye) hücreler arası matriks elemanlarını salgılama potansiyelleri üzerine olan etkileri de daha önce araştırılmamıştır.

Çalışmamızda bu elemanların birden farklı kombinasyonlarının, hücresel biyoloji ve biyoteknoloji araştırmalarında en sık kullanılan hücre hatlarından biri olan HEK293 insan embriyonik böbrek hücrelerinde (18) üç boyutlu kültür oluşumuna olan etkileri ve de hücreler tarafından buldukları ortama hücreler arası matriks elemanlarını salgılama potansiyelleri üzerine olan etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Hücrelerin 3B oluşumları mikroskop altında analiz edilmiş olup, salınım gösteren hücreler arası matriks elemanlarının miktarı ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. ELISA yöntemi ile tespit edilen matriks elemanları Kollajen tip 1 ve Kollajen tip 4'dür. Kollajen tip 1 en genel hücreler arası matriks elemanı iken; kollajen tip 4 böbrek yapısında bulunan en sık hücreler arası matriks elemanlarından biridir. Çalışmamızda embriyonik böbrek

hattı kullanmamız nedeniyle Kollajen tip 4 salınımı projeye dahil edilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Kitosan kaplamanın oluşturulması

%1'lik kitosan solüsyonu oluşturmak için; toz kitosan (Sigma, Cat:# 448869-250G) 50 mM glasiyel asetik asit içeren deiyonize H₂O içerisinde tamamen eriyene kadar manyetik bir karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Çözülmemiş partiküllerin uzaklaştırılması için hazırlanan solüsyon 5.000 rpm'de 1 saat oda sıcaklığında santrifij işlemine tabi tutuldu. Toplam santimetre kare başına 0.1 ml kitosan çözeltisi gelecek şekilde hücre platelerine döküldü ve gece boyunca 37 °C'de bir inkübatörde kurutuldu (Deneyler 6,12 ve 24 kuyulu plate'de gerçekleştirildi.). Daha sonra plate tabanında oluşan kitosan zarları, 0.1 M NaOH ile nötralize edildi, %70 etanol ile ve ardından UV ışığı altında sterilize edildi.

Kollajen, Vitronektin ve Jelatin kaplama

Ticari olarak alınan Kollajen tip 1 (Sigma, Cat No# 08-115), Vitronektin (Sigma, Cat No# SRP3186) ve Jelatin (StemCell Cat No# 07903, Sigma, Cat No#G9391) kullanım belgelerine göre sulandırıldı (1xPBS ve distile su) ve ana stok oluşturuldu. Daha önce literatürde belirtildiği üzere bu hücreler arası matriks elemanlarının tek tek veya kombinasyonlarının kullanımı ile hücre kültürü petripleri kaplandı (19-22). Her kuyuya deneyde belirtilen konsantrasyonlarda solüsyon eklendi. Kuyu yüzeyini kaplayacak olan solüsyonun konsantrasyonu ilk deneyde her bir hücreler arası eleman için 4 µg/mL olarak kullanıldı. Sabit bir eleman varlığında değişken hücreler arası matriks elemanları deneyinde ise kaplamak için kullanılan solüsyonun final konsantrasyonu sabit hücreler arası matriks elemanı için 1 veya 4 µg/mL, değişken diğer elemanlar için 1-4-8-16µg/mL olacak şekilde planlandı.

Hücreler arası matriks elemanlarının yüzeye yapışmasına izin vermek için çözelti 37°C'de 3 saat boyunca veya 4°C'de gece boyu çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında solüsyon kuyulardan uzaklaştırıldı. Kitosan zarları, %10 FBS ve penisilin/streptomisin ile desteklenmiş DMEM ortamında 20 dakika dengelendi. Hücre ekimi öncesi dengelemek için kullanılan besiyeri uzaklaştırıldı.

Deney planında kullanılan 2B kültürde herhangi bir kaplama yapılmadan, sadece kitosan kaplanan yüzeylerde ise kitosan kaplandıktan sonra hücreler arası matriks elemanları kullanılmadan aynı işlemler uygulandı.

Hücre Kültürü

Çalışmamızda, ticari olarak satın alınan İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı olan HEK293 hücreleri (ATCC, CRL-1573) kullanılmıştır. Bu hücrenin kullanılmasının nedeni bazal bir hücresel metabolizmaya sahip olması ve

epitelyal yapıda bulunan bir hücre hattı olmasıdır. Hücreler L-glutamin (Lonza), esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat, %10 Fetal Dana Serum (FBS-Biochrom cat. No: S0115), Penisilin/ Streptomisin/Amfotersin B (BI-03033113) ve gentamisin eklenerek; %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltılmıştır.

ELISA

Oluşan üç boyutlu yapılardaki ortama salgılanan Kollajen tip 1, Kollajen tip 4 miktarı ölçmek için ELISA yöntemi kullanıldı. Hücre kültüründen alınan süpernatantlar Kollajen tip 1 (Elabsience, #E-EL-H0869) ve Kollajen tip 4 (Mybiosource, #MBS725110) ELISA kitleri içerisinde bulunan firmanın önerdiği protokole tabii tutularak belirtilen hücreler arası matriks eleman miktarları belirlendi.

Oluşturulan sferoidlerin histolojik görüntülenmesi

Üç boyutlu yapı oluşturulan hücreler 15 dk %3 paraformaldehit ile fikse edildi. Paraformaldehit muamelesi sonrasında kuyular 1XPBS ile yıkandı ve kuyulara hazırlanmış soğumaya bırakılmış %2'lik agaroz jel döküldü. Bir buçuk saat oda sıcaklığında agaroz jelin donması için inkübasyona bırakıldı. Jelin donmasından sonra 5 dakika +4°C'de, 5 dakika -20°C'de ve 2 dakika -80°C'de inkübe edildi. Bistüri yardımıyla kuyuların kenarından ayrılan agaroz jelle gömülü hücreler %70 etanol içine konuldu. Doku takibi işlemi için sırasıyla %80, %90 ve %100 etanol içine alınan hücreler ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömüldü. Gömülü hücrelerden 4 mikron kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilin&eoziin boyaması gerçekleştirildikten sonra mikroskop altında görüntüledi.

İstatistiksel Analiz

Mikroskop görüntülerindeki üç boyutlu oluşumların alan hesaplaması ve sayıları Kameram uygulaması kullanılarak yapıldı. Sferoid yapılarının istatistiksel analizleri ve grafikleri GraphPad Prism programı kullanılarak yapıldı. Aynı şekilde ELISA yönteminde elde edilen sonuçlar da GraphPad Prism programı ile analiz edilmiştir.

BULGULAR

Kitosan protokolü ile 3 boyutlu kültürün denenmesi

Literatürde belirtilen ve de herhangi bir hücreler arası matriks elemanları bulunmayan Kitosan ile kaplı yüzeyde kültür edildiğinde hücrelerin tek tabaka (monolayer) büyüme paterni yerine sferoid olarak büyüdüğü gözlemlendi (Şekil 1 A,B).

Kitosan ile birlikte hücreler arası elemanlarının birlikte kullanılması

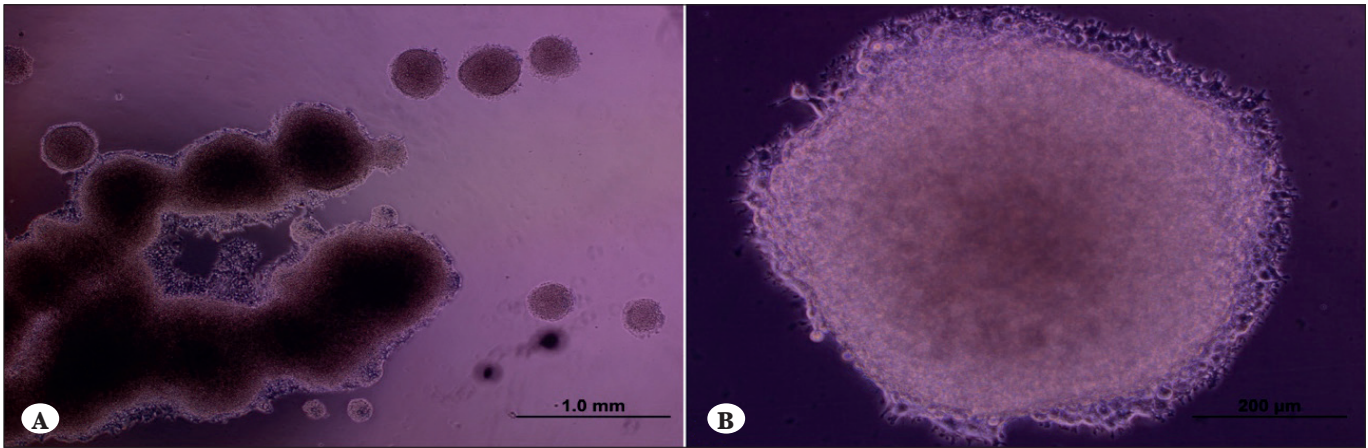
Kitosan muamelesi sonrası 24 kuyulu plateler ayrı ayrı 4 µg/mL final konsantrasyonda olacak şekilde Kollajen tip

1, Vitronektin ve Jelatin ile ayrı ayrı kaplandı ve 3 gün süre ile takip edildi. Mikroskop altında yapılan takip sonucunda beklendiği gibi kitosanın 3B oluşuma neden olduğu görüldü (Şekil 2). Hücreler arası matriks elemanları içerisinde jelatinin tek başına kullanımı diğer iki elemanlara (kollajen ve vitronektin) göre daha çok 3 boyutlu yapıya neden olduğu görüldü. Kollajen ve vitronektinin beraber kullanımı üç boyutlu sferoid oluşumunu azaltırken iki boyutlu hüresel büyümeye yol açmaktadır. Kollajen ve jelatinin beraber kullanılması ise üç boyutlu yapılanmanın, yalnızca kollajen kullanılan gruptan daha fazla olmasına neden olduğu görüldü. Bunlara ek olarak Vitronektin ve de jelatinin birlikte kullanımı ise ikili kombinasyon içerisinde en çok 3B kültürüne izin vermektedir. Sadece kitosan kullanımı çok odaklı 3B oluşumlara neden olurken, vitronektin ve jelatinin kitosan'a eklenmesi daha diffüz/yaygın bir üç boyutlu yapılanmaya yol açtığı görülmektedir. Yapılan deney doğrultusunda sabit kollajen tip 1 kaplamasına ek olarak kullanılan diğer hücreler arası matriks elemanlarının üç boyutlu sferoid oluşumlarına etkili olduğu görüldü.

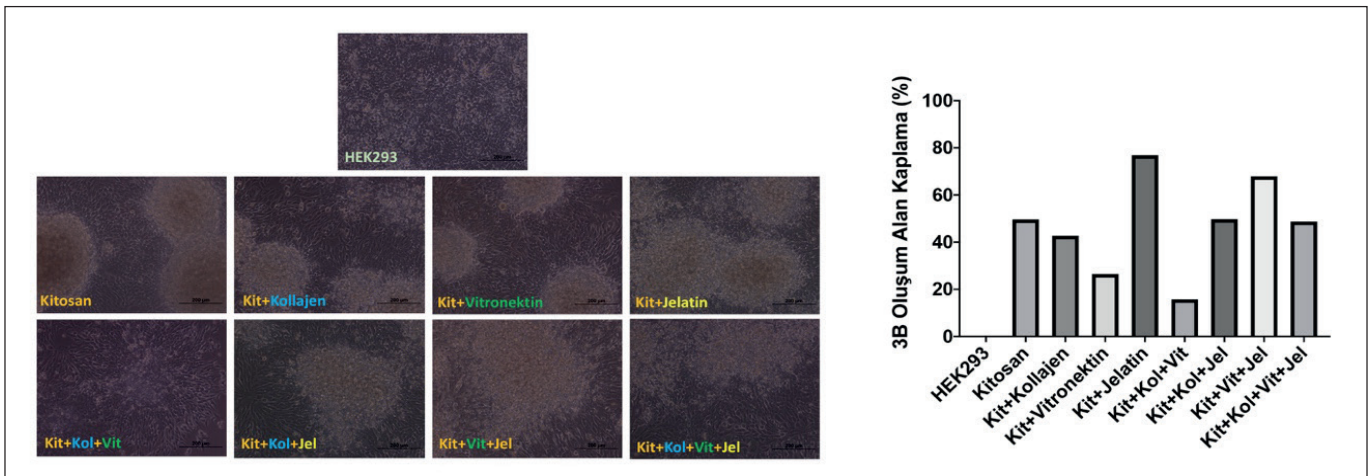
Sabit Kollajen tip 1 ile kaplanmış kitosan bazlı üç boyutlu hücre kültüründe Vitronektin ve Jelatinin değişen miktarlarının sferoid oluşumuna etkisi

Sabit kollajen tip 1 varlığına ek olarak değişen miktarlarda vitronektin ve jelatin varlığının kollajen tip 1 elemanının oluşturduğu üç boyutlu sferoidlere olan etkisini araştırmak için, 24 kuyulu plakeleri kaplanmasında kullanılan kollajen tip 1 miktarını 1 µg/mL dozunda sabit tutarak; vitronektin ve jelatinin 1-4-8 µg/mL değişen dozlarını kollajen tip 1 ile kombine edildi. 10.000 hücre/kuyu hücre ekimi yapıldı ve üç gün inkübasyona bırakıldı.

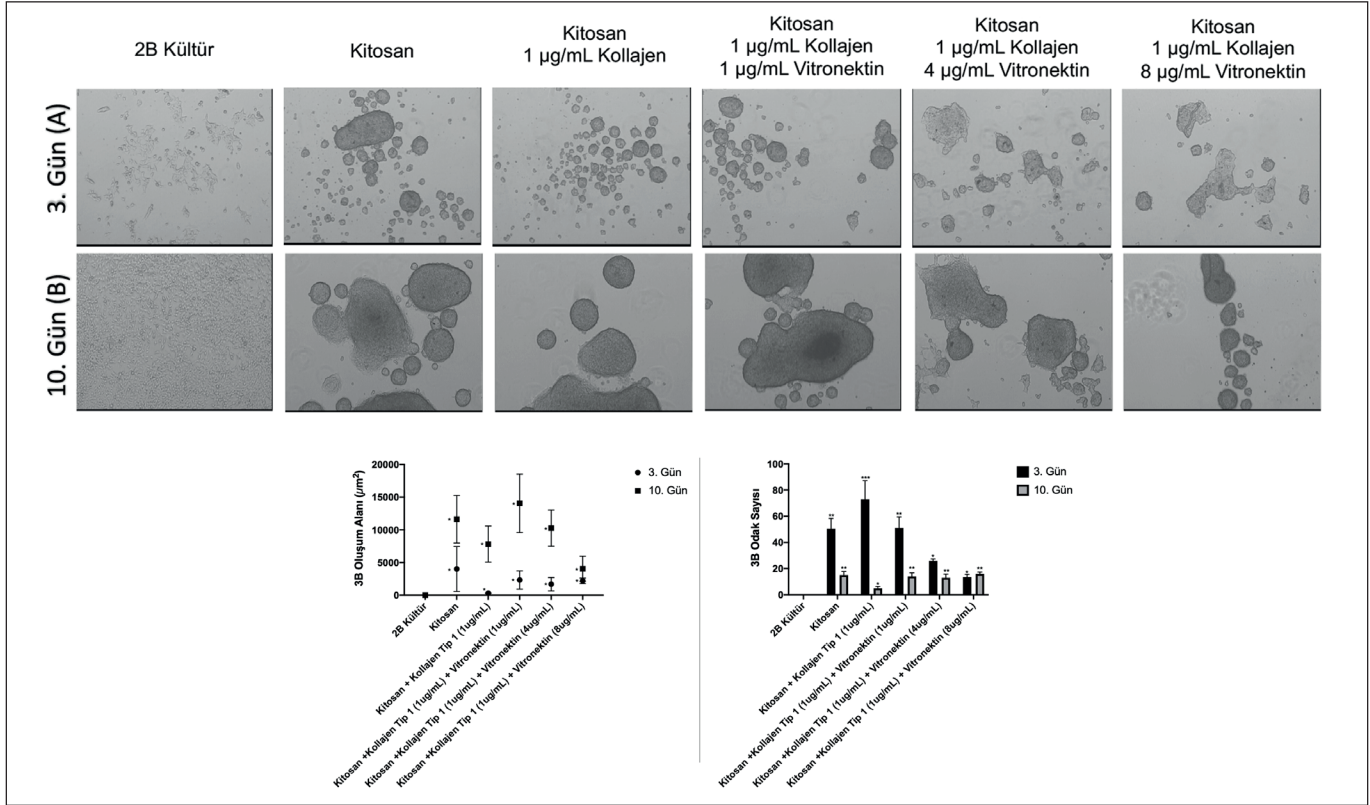
Üçüncü gün mikroskop altında yapılan incelemede; kitosan kaplaması içeren kuyuların içermeyen kuyulara göre (normal hücre kültürü yüzeyine göre) anlamlı bir şekilde üç boyutlu yapı oluşturduğu görülmektedir ($p \leq 0.05$) (Şekil 3A). Buna ek olarak kitosan yapısına 1 µg/mL kollajen tip 1 eklendiğinde, oluşan sferoid yapılarının daha küçük ve çok odaklı olduğu görüldü. Kollajen ile birlikte vitronektin



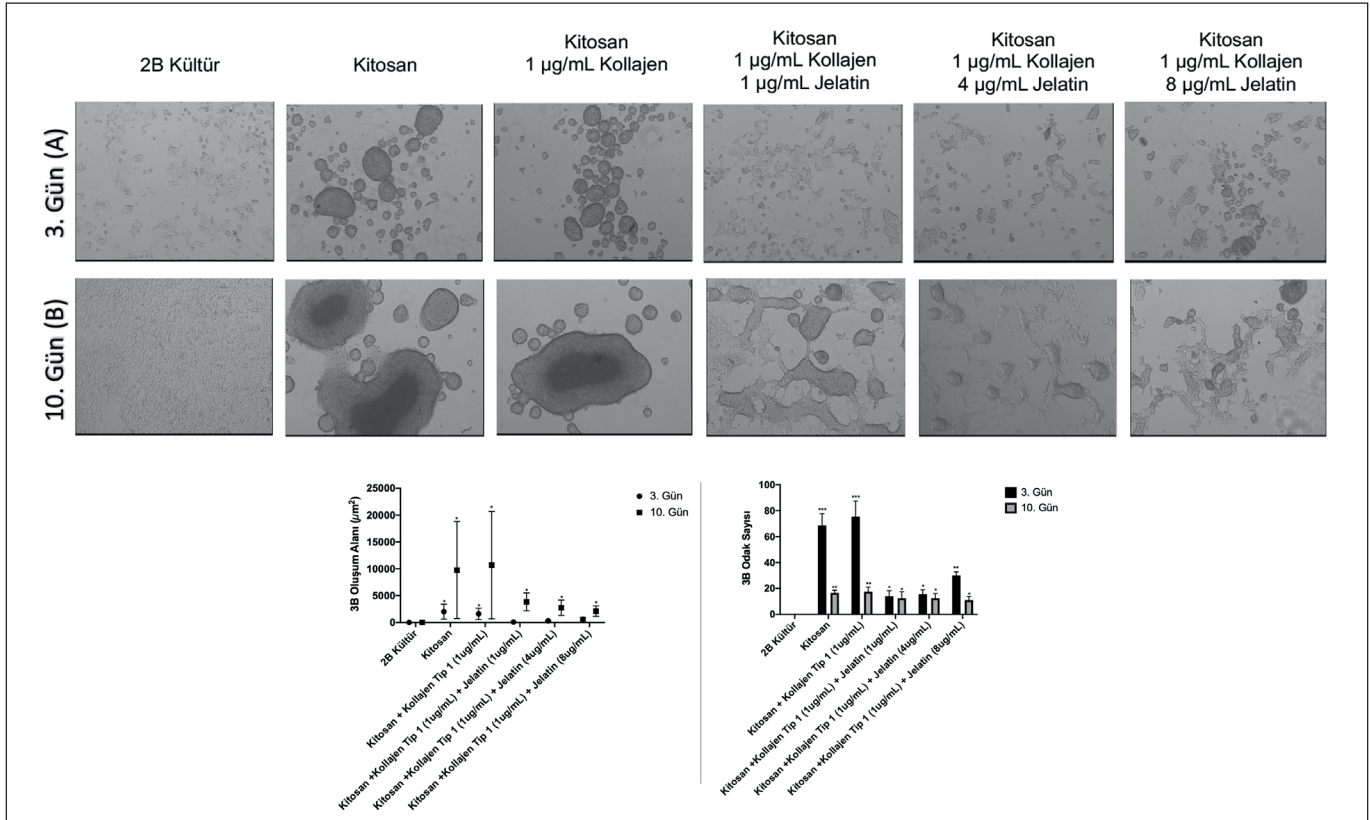
Şekil 1: Kitosan protokolü ile 3 boyutlu hücre kültürünün mikroskop altında görüntülenmesi **A)** 4X büyütmedeki görüntüsü **B)** 20X büyütmedeki görüntüsü.



Şekil 2: Kitosan yüzey ile birlikte hücreler arası matriks elemanlarının birlikte kullanımı ile oluşan üç boyutlu sferoidlerin 20X büyütmedeki mikroskop görüntüleri (**Kit:** Kitosan, **Kol:** Kollajen, **Vit:** Vitronektin, **Jel:** Jelatin)



Şekil 3: Sabit Kollajen tip 1 miktarı ile vitronektinin değişen miktarlarının sferoid oluşumuna etkisi **A)** Üçüncü gün 10X büyütmedeki mikroskop görüntüleri **B)** Onuncu gün 10X büyütmedeki mikroskop görüntüleri (***: $p \leq 0.001$; **: $p \leq 0.01$; *: $p \leq 0.05$) (İstatistiksel analizler 2B kültür grubu ile karşılaştırılarak yapılmıştır.)



Şekil 4: Sabit Kollajen tip 1 miktarı ile jelatinin değişen miktarlarının sferoid oluşumuna etkisi **A)** Üçüncü gün 10X büyütmedeki mikroskop görüntüleri **B)** Onuncu gün 10X büyütmedeki mikroskop görüntüleri (***: $p \leq 0.001$; **: $p \leq 0.01$; *: $p \leq 0.05$) (İstatistiksel analizler 2B kültür grubu ile karşılaştırılarak yapılmıştır.)

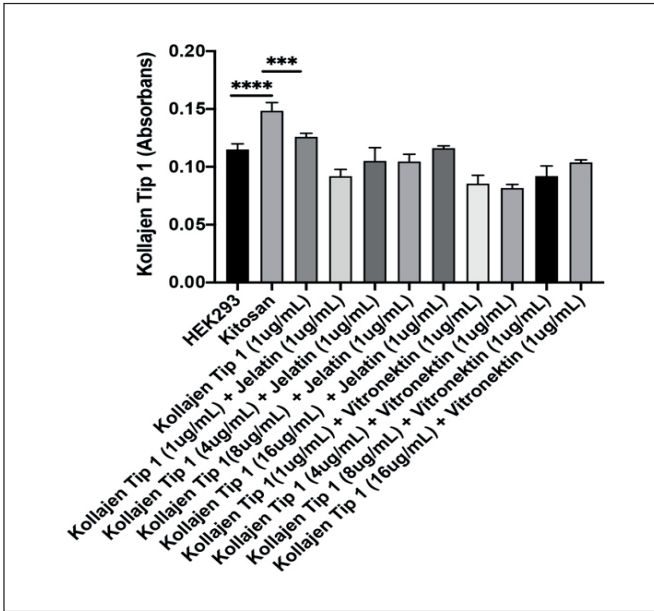
tin varlığında ise artan vitronektin oranı ile doğru orantılı olarak, 3 boyutlu oluşum yapılarının daha düzensiz olduğu ve odak sayılarının azaldığı görülmüştür.

Hücre kültürünün takibi devam ettiğinde (10. gün) 1µg/mL kollajen tip 1 ve 1 µg/mL vitronektin varlığında oluşan sferoid yapılarının daha büyük ve sferoidlerin birleşerek daha büyük bir oluşum içinde olduğu görülmüştür (Şekil 3B). İçerdikleri az miktarda küçük odaklar nedeni ile istatistiksel olarak bir anlamlılık içermese de oluşan odakların ortalama hacimleri diğer gruplardan daha büyüktür.

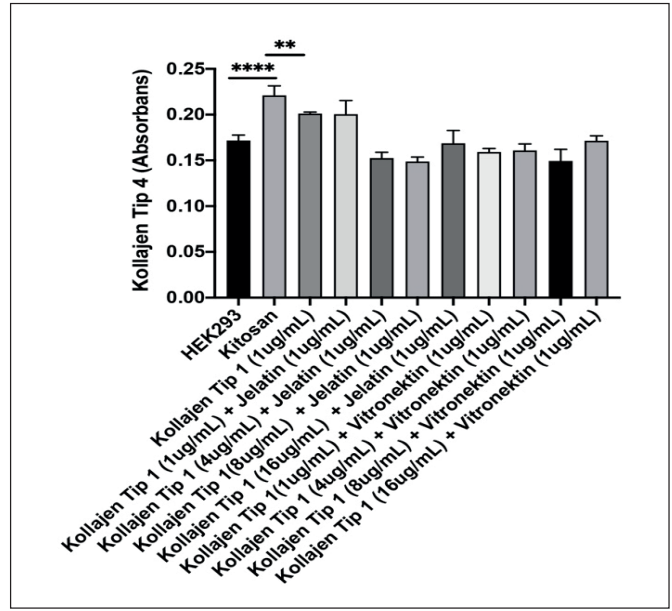
Kollajen tip 1 ile jelatinin kombinasyonu incelendiğinde ise ilk üç gün jelatinin doz bağımsız olarak eklenmesi, sferoid yapı oluşumunu pozitif yönde etkilememiştir ($p>0.05$) (Şekil 4A). İnkübasyonun devamında ise kollajene ek olarak kullanılan jelatin, birden fazla odak oluşumuna ve de sferoid çaplarının küçülmesine neden olduğu görülmüştür (Şekil 4B).

Sabit Vitronektin ve Jelatin ile kaplanmış kitosan bazlı üç boyutlu hücre kültüründe Kollajen Tip 1'in değişen miktarlarının hücreler arası matriks elemanlarının salınımına etkisi

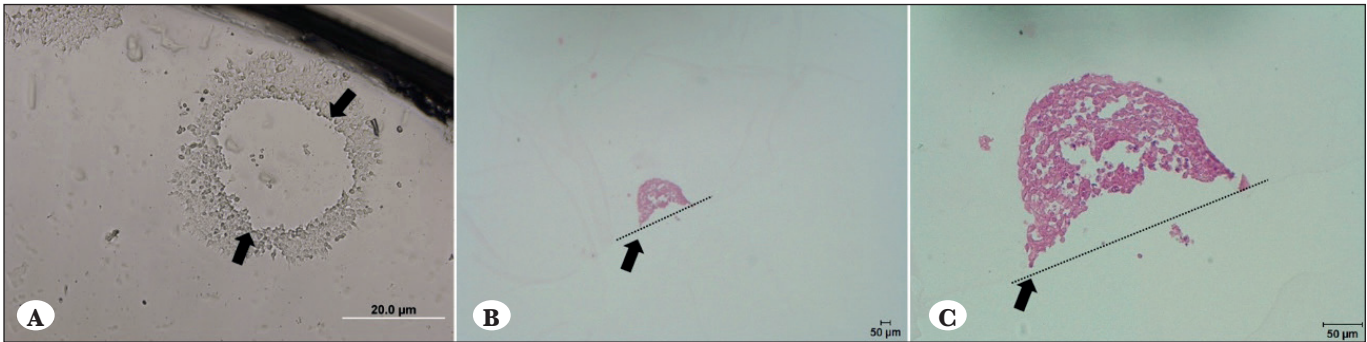
Sabit vitronektin ve jelatin varlığında değişen kollajen tip 1 miktarlarının ortama salınan hücreler arası matriks elemanlarının seviyesine olan etkilerinin araştırılması için 1µg/mL vitronektin veya jelatin varlığında değişen miktarlarda (1-4-8-16 µg/mL) kollajen tip 1 ile kaplanan kitosan yüzeylerde yapılan kültürden onuncu gün süpernatantlar toplandı. Süpernatantlar ile gerçekleştirilen ELISA sonuçlarına göre, kitosan kaplı yüzeylerde kültüre edilen ve sferoid oluşturan HEK293 hücrelerinin, tek tabaka (monolayer) ile kıyaslandığında ortama salgıladıkları kollajen tip 1 miktarının arttığı gözlemlenmiştir ($p\leq 0.0001$) (Şekil 5). Kitosan yüzey-



Şekil 5: Sabit vitronektin ve jelatin konsantrasyonunda, değişen Kollajen tip 1 miktarının ortama salınan Kollajen tip 1 miktarı üzerine etkisinin belirlenmesi (***: $p=0.0005$, ****: $p\leq 0.0001$).



Şekil 6: Sabit vitronektin ve jelatin konsantrasyonunda, değişen Kollajen tip 1 miktarının ortama salınan Kollajen tip 4 miktarı üzerine etkisinin belirlenmesi (**: $p<0.0015$, ****: $p\leq 0.0001$).



Şekil 7: Oluşan üç boyutlu sferoid yapıların histolojik analizi **A)** sferoid yapının yüzeyden Agaroz jel ile ayrıştırılmasından sonra oluşan sferoid alanının gösterilmesi **B)** Oluşan sferoid yapının Hematoksilen&Eozin boyaması, 4X objektif **C)** Oluşan sferoid yapının Hematoksilen&Eozin boyaması, 20X objektif. Ok ile gösterilen alan sferoid yapının yüzeye tutunduğu alanı göstermektedir.

yin kollajen tip 1 kaplanması sonucunda ise ortama salınan kollajen miktarının anlamlı olarak azaldığı görülmektedir ($p \leq 0.001$). Bu verilere ek olarak kollajene eklenen jelatinin, vitronektine göre kollajen salınımını değiştirdiği gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda hem kollajen tip 1 miktarı hem de diğer hücreler arası matriks elemanlarının bulunması, ortama salınan kollajen tip 1 seviyesini değiştirmektedir.

Ortama salınan kollajen tip 4 miktarı incelendiğinde ise kitosan yüzey kaplamasının, kollajen tip 1'e benzer şekilde, monolayer hücre kültürüne oranla daha çok kollajen tip 4 salınımına neden olduğu görülmektedir ($p \leq 0.0001$) (Şekil 6). Aynı şekilde kitosan yüzeyin kollajen tip 1 ile kaplanması, hücrelerin kollajen tip 4 salınımını azaltmaktadır ($p \leq 0.01$). Kollajene ek olarak ortama vitronektinin veya jelatinin eklenmesi genel olarak kollajen tip 4 salınımını azaltmaktadır.

Oluşan üç boyutlu yapıların gösterilmesi

Elde edilen sferoid yapılarının agaroz jele gömülmesiyle doku takibi ve histolojik analizler için uygun kesit alınabildiği görüldü (Şekil 7A-C). Agaroz jel içerisinde sferoid yapıları kuyudan uzaklaştırıldığında kuyular mikroskop altında incelendi ve üç boyutlu yapıların yüzeyden uzaklaştırıldığı görüldü (Şekil 7A). Kuyulardan uzaklaştırılan ve kesit alınarak hematoksilen ve eozin boyaması yapılan üç boyutlu sferoid yapılar incelendiğinde yüzey alanın üzerinde üç boyutlu bir büyümenin ve hücre gruplaşmanın olduğu görülmüştür (Şekil 7B,C). Bu şekilde sferoid dokuların incelenmesi literatür açısından yeni bir yöntem olarak görülmektedir.

TARTIŞMA

Hücre kültürü çalışmaları özellikle tıbbi bilimlerde kurulan hipotezlerin ispatı için başvurulan yöntemlerin başında gelmektedir. Hücre kültüründe genel olarak kullanılan iki boyutlu (tek tabakalı) kültür yönteminin birçok avantajı olduğu kadar, kurulan hipoteze bağımlı olarak bazı dezavantajları da mevcuttur (23, 24). İki boyutlu hücre kültürü bize mükemmel homojen bir çalışma materyaliyken, hücrelerin birbiri ile etkileşimi ve organizasyonu üzerine planlanan çalışmalar için çok uygun bir çalışma materyali değildir (23, 24). Bu nedenle günümüzde *in vitro* koşullarda üç boyutlu hücre büyümesini sağlayan yöntemlerin araştırılması ve geliştirilmesi oldukça popülerdir. 3B kültür, hücreleri doğal koşullara bir adım daha yaklaşacak şekilde davranmaya itmektedir ve çalışmaları *in vivo* uygulamalara adapte etmek için daha gerçekçi bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (23, 25). Literatürde *in vitro* kültür işleminde 3B çalışmalarında, maliyetinin daha uygun olması ve farklı hücrelerde kullanılabilir olması nedeniyle kitosan, bir adım öne çıkmaktadır (26).

Literatürde kitosan tabanlı 3B hücre kültürü genellikle kollajen veya jelatin kaplaması ile birlikte kullanılmaktadır

ve bu iki elemanın sferoid oluşum kapasitelerinden çok yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması çalışma konusu olmuştur (27). Bu iki elemana ek olarak, diğer bir hücreler arası matriks elemanlarından vitronektinin kitosan ile oluşturulan 3B sferoid yapıları üzerine literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca literatürde bu üç farklı hücreler arası matriks elemanlarının, 3B sferoid oluşumu üzerine avantajları ve dezavantajlarını karşılaştıran bir geniş çaplı çalışma da bulunmamaktadır. Çalışmamızda bu üç hücreler arası matriks elemanının HEK293 insan embriyonik böbrek hücrelerinin sferoid oluşumuna olan etkileri ve de kültüre edilen hücrelerden hücreler arası matriks elemanlarının en geniş ailesi olan kollajenin tip 1 ve tip 4 alt tiplerinin salınımı üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Kitosan yapısının ve hücreler arası matriks elemanları ile kaplanmasının, üç boyutlu oluşuma neden olması neticesinde hücrelerin birbiri ile etkileşimini ve hücrelerarası oluşumların baş mimarı olan Kollajen tip1 ve tip 4'ün salınımı üzerine olan etkileri çalışmamızda gün yüzüne çıkarılmıştır. Ayrıca oluşan üç boyutlu yapılar ile Kollajen tip 1 ve tip 4 salınım korelasyonu literatürde ilk defa çalışmamızda gösterilmiştir. Daha önce toksisite veya hücre DNA partikül alımı araştırmalarında kullanılan HEK293 ve kitosan, çalışmamızda üç boyutlu kültür araştırmasında birlikte kullanılmış olması çalışmamızı literatürdeki diğer çalışmalardan ayırmaktadır (28, 29).

Kitosanın, hücrelerin tek tabakalı büyümesi yerine üç boyutlu büyümesini tetikleyerek sferoid oluşumuna yol açtığı literatürde bilinmektedir (30). Kitosan yüzeyinin kollajen tip 1 ile kaplanması sonrasında oluşan sferoid yapılarının daha küçük ve daha fazla odaklı olduğu görülmektedir. Kollajenin hücrelerin yüzeye bağlanmasını artırması sonucuyla 3B oluşumu negatif yönde etkileyeceği aşikârdır. Aynı durum diğer iki hücreler arası matriks elemanları (Vitronektin ve Jelatin) için de geçerlidir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda jelatin ile kaplanan kitosan yüzeyinde oluşan sferoidlerde hücresel yoğunluğun daha az olmasına rağmen daha yaygın bir üç boyutlu oluşum gözlenmektedir. İkili kombinasyonların kullanılması sonucunda ise kollajen+vitronektin kullanımı sferoid oluşumunu minimal seviyeye indirmekte; kollajen+jelatin kullanımı ise daha yaygın, daha az odaklı bütünsel sferoid oluşumuna neden olmaktadır. Bu kollajen+jelatin ikilisine vitronektin eklendiğinde ise üç boyutlu oluşumların ve de sferoid yapılarındaki hücresel yoğunluğun azaldığı görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda vitronektinin ortama eklenmesi hücrelerin üç boyutlu büyüyerek sferoid oluşumundan çok iki boyutlu (tek tabakalı) hücresel büyümeye yol açtığı görülmektedir.

Vitronektinin ve jelatinin kollajene ek olarak sferoid oluşumlar üzerinde yaptığı bu etkilerin doz bağımlı olup olmadığını anlamak için planlanan deneyde; vitronektinin 1µg/mL dozu üçüncü gün sferoid oluşum odaklarını

azaltıp daha büyük sferoid yapılarının oluşmasına neden olduğu görülmüştür. Ayrıca aynı etkiyi kültür süresi uzadığında da (onuncu günde) göstermektedir. Fakat vitronektin dozu arttıkça sferoid oluşumları azalmakta ve oluşan üç boyutlu yapılar küçülmektedir. Bunlara ek olarak jelatinin kollajene eklenmesi ile oluşan sferoidler, sadece kollajen varlığında oluşan sferoidlerden yapısal bakımdan daha küçük ve miktar bakımından daha azdır. Buna rağmen oluşan sferoid yapıları daha yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır. Kollajene ek olarak eklenen diğer elemanların dozunun artışı hücrelerin, hücre kültürü yüzeyinin hücreler bakımından tutulum sağlamasını artırmaktadır. Bu artmış yüzey tutulumu hücrelerin sferoid oluşumunu azaltmakta ve hücreleri tek tabaka olarak büyümeye yönlendirmektedir. Bu hücreler arası matriks elemanlarının kombinasyonlarının ve konsantrasyonlarının değiştirilmesi ile hücrelerin istediğimiz boyutta ve odak sayısında sferoid yapı oluşturması sağlanabilir. Bu veriler doğrultusunda bundan sonraki yapılacak çalışmalarda elde edilmesi hedeflenen üç boyutlu (sferoid) yapının özellikleri (sayısı, alanı, dağılımı, vb...), bu hücreler arası matriks elemanlarının değişik konsantrasyonlarının hesaplanması ve optimize edilmesi ile sağlanabileceği gösterilmiştir.

Onuncu gündeki sferoid oluşumları incelendiğinde vitronektinin ve jelatinin 1µg/mL konsantrasyonunun uzun dönem sferoid yapıları üzerine en olumlu dozları olduğu görülmesi nedeniyle hücreler arası matriks elemanları salınım analizinde bu dozlar kullanıldı. Yapılan ELISA sonucunda ortama salınan tip 1 kollajen miktarının kitosan yüzeylerde, normal iki boyutlu kültürden anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda yüzeye tutulum sağlayamayan hücrelerin bir organizasyon sağlamaya çalışması neticesinde kollajen salınımı artırdığını düşünmek yanlış olmayacaktır. Bu verilere uyumlu olarak kitosan yüzeyin kollajen tip 1 ile kaplanması sonrasında hücrelerden kollajen tip 1 salınımı (kitosan yüzeye göre) anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Kollajen tip 1 ile yüzeyin kaplanması hücrelerin yüzeye daha fazla tutunmasına yol açarak hücrelerin organizasyon oluşturma ve bir yüzeye tutunma çabası nedeniyle salınım yaptığı kollajen tip 1 miktarını

azaltmaktadır. Bu bilgilere ek olarak kollajen tip 1'in jelatin ile kombinasyonunda, vitronektin ile olan kombinasyonuna göre daha fazla hücreyel kollajen tip 1 salınımı olduğu görülmektedir. Bu meydana gelen değişiminin kollajen tip 1 ile sınırlı olup olmadığını görmek için diğer bir kollajen alt tipi olan tip 4 salınımını da incelediğimizde kitosan varlığının tip 4 kollajen salınımınının da (iki boyutlu hücre kültürüne oranla) artırdığı görülmektedir. Aynı şekilde kitosan yüzeylerin kollajen tip 1 ile kaplanması da hücrelerin ortama salgıladığı kollajen tip 4 miktarını anlamlı bir şekilde azaltmaktadır. Kollajen tip 1 ile diğer hücreler arası matriks elemanlarının kombine edilmesi de ortama salınan kollajen tip 4 miktarını azaltmaktadır. Bu veriler kollajen tip 1 için kurulan hipotez ile doğru orantılı olarak, hücreyel yüzey tutulumunu artırmak (sferoid yapılarının küçülmesi/azalması) hücreler arası matriks elemanlarının ortama salınımını azalttığı anlamına gelebilir.

SONUÇ

Hücreler arası matriks elemanları kitosan yüzeylerde birbirinden farklı sferoid oluşumuna yol açmaktadır. Bu farklılık kullanılan hücrelere bağlı olabileceği ve çalışmamızda sadece bir hücre hattı kullanıldığı için; 3B çalışmalardan önce kullanılacak kitosan yüzeylerin optimizasyonu oldukça önemlidir. Kitosan yüzeye hangi hücreler arası matriks elemanlarının seçileceği ön çalışmalar ile belirlenmelidir. İlk günlerde farklılık görülmemesine rağmen hücre kültürünün devamı sferoid oluşumlarında farklı etkilerin görülmesine yol açmaktadır. Seçilecek hücreler arası matriks elemanları hücrelerin ortama salgıladıkları komponentlerin değişimine neden olmaktadır. Hücreyel yüzey tutulumunu artırmak (sferoid yapılarının küçülmesi/azalması) hücreler arası matriks elemanlarının ortama salınımını azaltmaktadır. Ayrıca bu çalışmada gerçekleştiren ve literatürde daha önce tanımlanmamış sferoidlerin histolojik analizini elverişli hâle getiren metodun, üç boyutlu hücre kültürü çalışmalarında büyük avantaj sağlayacağı kesin olmakla beraber, çalışmanın tek hücre hattında yapılmış olması nedeniyle ileri araştırmaların yapılması bilimsel bilgi birikimi için oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Simian M, Bissell MJ. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol* 2017; 216(1):31-40.
2. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, Lomas C, Mendiola M, Hardisson D, Eccles SA. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* 2012;10:29.
3. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Paul Solomon FD. 3D cell culture systems: Advantages and applications. *J Cell Physiol* 2015; 230(1):16-26.
4. Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000; 21(24):2589-98.
5. Aiedeh K, Gianasi E, Orienti I, Zecchi V. Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin. *J Microencapsul* 1997; 14(5):567-76.

6. Zhu A, Zhang M, Wu J, Shen J. Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive hetero-bifunctional crosslinking reagent on PLA surface. *Biomaterials* 2002; 23(23):4657-65.
7. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol* 2000; 18(1):2-9.
8. Pachence JM. Collagen-based devices for soft tissue repair. *J Biomed Mater Res* 1996; 33(1):35-40.
9. Preissner KT. Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7:275-310.
10. Burgos-Panadero R, Noguera I, Canete A, Navarro S, Noguera R. Vitronectin as a molecular player of the tumor microenvironment in neuroblastoma. *BMC Cancer* 2019; 19(1):479.
11. Mao JS, Cui YL, Wang XH, Sun Y, Yin YJ, Zhao HM, Yao KD. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials* 2004; 25(18):3973-81.
12. Moscato S, Matti L, D'Alessandro D, Cascone MG, Lazzeri L, Serino LP, Dolfi A, Bernardini N. Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges. *Micron* 2008; 39(5):569-79.
13. Gohi B, Liu XY, Zeng HY, Xu S, Ake KMH, Cao XJ, Zou KM, Namulondo S. Enhanced efficiency in isolation and expansion of hAMSCs via dual enzyme digestion and micro-carrier. *Cell Biosci* 2020; 10:2.
14. Ranganathan S, Balagangadharan K, Selvamurugan N. Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2019; 133: 354-64.
15. Oryan A, Alidadi S, Bigham-Sadegh A, Moshiri A, Kamali A. Effectiveness of tissue engineered chitosan-gelatin composite scaffold loaded with human platelet gel in regeneration of critical sized radial bone defect in rat. *J Control Release* 2017; 254:65-74.
16. Fu JH, Zhao M, Lin YR, Tian XD, Wang YD, Wang ZX, Wang LX. Degradable chitosan-collagen composites seeded with cells as tissue engineered heart valves. *Heart Lung Circ* 2017; 26(1):94-100.
17. Li M, Han M, Sun Y, Hua Y, Chen G, Zhang L. Oligoarginine mediated collagen/chitosan gel composite for cutaneous wound healing. *Int J Biol Macromol* 2019; 122: 1120-7.
18. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 2014; 5:4767.
19. Shenvi SV, Dixon BM, Petersen Shay K, Hagen TM. A rat primary hepatocyte culture model for aging studies. *Curr Protoc Toxicol* 2008; Chapter 14:14-7.
20. Yap LY, Li J, Phang IY, Ong LT, Ow JZ, Goh JC, Nurcombe V, Hobley J, Choo AB, Oh SK, Cool SM, Birch WR. Defining a threshold surface density of vitronectin for the stable expansion of human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; 17(2):193-207.
21. Li J, Bardy J, Yap LY, Chen A, Nurcombe V, Cool SM, Oh SK, Birch WR. Impact of vitronectin concentration and surface properties on the stable propagation of human embryonic stem cells. *Biointerphases* 2010; 5(3):132-42.
22. Lin, YM, Lee J, Lim JFY, Choolani M, Chan JKY, Reuveny S, Oh SKW. Critical attributes of human early mesenchymal stromal cell-laden microcarrier constructs for improved chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1):93.
23. Kapalczynska M, Kolenda T, Przybyla W, Zajaczkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Blizniak R, Luczewski L, Lamperska K. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* 2018; 14(4):910-9.
24. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)* 2017; 32(4): 266-77.
25. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci* 2015; 16(3):5517-27.
26. Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J Stem Cells* 2019; 11(12):1065-83.
27. Mousavi S, Khoshfetrat AB, Khatami N, Ahmadian M, Rahbarghazi R. Comparative study of collagen and gelatin in chitosan-based hydrogels for effective wound dressing: Physical properties and fibroblastic cell behavior. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 518(4):625-31.
28. Corsi K, Chellat F, Yahia L, Fernandes JC. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 2003; 24(7): 1255-64.
29. Ramezani MR, Naderi-Manesh H, Rafieepour HA. Cytotoxicity assessment of a gold nanoparticle-chitosan nanocomposite as an efficient support for cell immobilization: Comparison with chitosan hydrogel and chitosan-gelatin. *Biocell* 2014; 38(1-3):11-6.
30. Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials* 2005; 26(9):979-86.