T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

İN VİTRO HEPATOSELÜLER KARSİNOMA KÜLTÜR MODELİNİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER İLE BİRLİKTE KURULMASI VE ARAŞTIRILMASI

NARMİN ADIGOZALOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. HÜSEYİN AVCI

ESKİŞEHİR, 2026

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

İN VİTRO HEPATOSELÜLER KARSİNOMA KÜLTÜR MODELİNİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER İLE BİRLİKTE KURULMASI VE ARAŞTIRILMASI

NARMİN ADIGOZALOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: PROF. DR. HÜSEYİN AVCI

İKİNCİ DANIŞMAN

ÖĞR. GÖR. DR. HAMED GHORBANPOOR

ESKİŞEHİR, 2026

PROJE NO: ESOGÜ BAP FYL-2025-3430; TUBİTAK 1004-20AG031

ÖZET

Başlık: *İn Vitro* Hepatoselüler Karsinoma Kültür Modelinin Mezenkimal Kök Hücreler ile Birlikte Kurulması ve Araştırılması

Amaç: Bu çalışma, hücre kültürü koşullarında yetiştirilen Huh-7 hücre hattı ile mezenkimal kök hücre (MKH) ve EA.hy926 hücre hattı kullanılarak, karaciğer kanseri araştırmalarında bu hücrelerin etkinliği ve moleküler profillerinin ve proliferasyonlarının ayrıntılı biçimde incelenmesini amaçlamaktadır. Çalışma kapsamında altı kuyulu plakalar üzerine ekilmiş olan hücreler, ko-kültür koşullarında yetiştirilerek, hücresel davranışlar, canlı/ölü analizleri, immünofloresan (İF) analizleri aracılığıyla moleküler düzeyde karakterizasyon gerçekleştirilmiştir.

Yöntem: Bu çalışmada Huh-7, mezenkimal kök hücreler ve EA.hy926 hücreleri standart kültür koşullarında çoğaltılarak ko-kültür modeli oluşturulmuş ve yedi gün inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı canlı/ölü boyama yöntemiyle değerlendirilmiş, protein ekspresyonlarının analizi için İF uygulanmıştır. Ayrıca gen ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiş ve Alfa-fetoprotein (AFP) ile Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni (PCNA) genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. Elde edilen veriler ile hücrelerin canlılık, proliferasyon ve tümöral özellikleri moleküler düzeyde değerlendirilmiştir.

Bulgular: Yedi günlük inkübasyon sonunda canlı/ölü hücre analizleri gerçekleştirilmiş ve kültür koşullarında %80'in üzerinde hücre canlılığı sağlanmıştır. qRT-PCR analizlerinde AFP ve PCNA gen ekspresyon düzeylerinde gruplara ve zaman noktalarına bağlı değişiklikler gözlenmiştir. İF boyamaları ise protein ekspresyonu ve hücresel aktivitedeki farklılıkları doğrulamıştır. Elde edilen veriler, oluşturulan ko-kültür modelinin hücresel canlılık ve fonksiyonel özellikler üzerinde etkili olduğunu göstermiştir.

Sonuç: Yedi günlük inkübasyon sonunda canlı/ölü hücre analizleri gerçekleştirilmiş ve kültür koşullarında %80'in üzerinde hücre canlılığı elde edilmiştir. qRT-PCR analizlerinde ise AFP ve PCNA gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Huh-7, E.Ahy926, MKH, Canlı/ölü analizi, IF, qRT-PCR

ABSTRACT

Title: Establishment and Investigation of an *In Vitro* Hepatocellular Carcinoma Culture Model with Mesenchymal Stem Cells.

Objective: This study aims to investigate the efficacy, molecular profiles, and proliferation of mesenchymal stem cells (MSC) and the EA.hy926 cell line, grown under cell culture conditions, in liver cancer research using the Huh-7 cell line. Within the scope of the study, cells seeded on 6-well plates will be grown under co-culture conditions, and molecular-level characterization was performed through cellular behavior, live/dead assays, immunofluorescence (IF) assays, and gene expression profiling.

Method: In this study, Huh-7, mesenchymal stem cells, and EA.hy926 cells were cultured under standard conditions to create a co-culture model and incubated for seven days. Cell viability was evaluated using live/dead staining, IF was applied to analyze protein expression. Additionally, qRT-PCR analysis was performed to determine gene expression levels, and the expression of Alpha-fetoprotein (AFP) and Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) genes was examined. The obtained data were used to evaluate the viability, proliferation, and tumoral characteristics of the cells at the molecular level.

Findings: Live/dead cell analyses were performed after seven days of incubation, and cell viability exceeding 80% was achieved under culture conditions. qRT-PCR analyses revealed group and time-dependent changes in AFP and PCNA gene expression levels. IF staining confirmed differences in protein expression and cellular activity. The data obtained demonstrated that the created co-culture model had an effect on cellular viability and functional properties.

Conclusion: Live/dead cell analyses were performed after seven days of incubation, and cell viability exceeding 80% was achieved under culture conditions. qRT-PCR analyses revealed significant changes in AFP and PCNA gene expression levels.

Keywords: Cancer, Huh-7, EA.hy926, MSC, Live/dead analysis, IF, qRT-PCR

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....
ÖZET..... **i**
ABSTRACT.....**ii**
İÇİNDEKİLER.....**iii**
TABLOLAR DİZİNİ.....**v**
ŞEKİLLER DİZİNİ.....**vi**
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....**ix**
1. GİRİŞ VE AMAÇ..... **1**
2. GENEL BİLGİLER..... **4**
2.1. Karaciğerin Anatomik Yapısı..... 4
2.2. Karaciğerin Fizyolojik ve Metabolik İşlevleri..... 5
2.3. Karaciğer Hastalıkları ve Küresel Sağlık Üzerindeki Etkileri..... 7
2.4. Hepatoselüler Karsinom (HCC) ve Tedavi Yöntemleri..... 9
2.5. Hücresel Tedavi ve Deneysel Yaklaşımlar..... 12
2.6. Karaciğer Kanserinde AFP ve PCNA'nın Biyolojik Rolleri..... 14
2.7. Karaciğerin Rejenerasyonu ve Yenilenme Mekanizmaları..... 15
2.8. Huh-7 Hepatoselülür Karsinom Hücre Hattı (Huh-7)..... 16
2.9. E.Ahy926 Hücre Hattı (EA.hy926)..... 16
2.10. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)..... 17
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER..... **19**
3.1. Deney Tasarımı ve Çalışma Grupları..... **19**
3.2. Hücre Kültürü Koşulları..... 20
3.3. Hücrelerin Temini, Çözdürülmesi ve Kültüre Edilmesi..... 21
3.3.1. İnsan Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iWJ-MKH) izolasyonu karakterizasyonu ve kültürü.....21
3.3.1.1. iWJ-MKH'lerin deney öncesi canlılık ve proliferasyon analizi.....*22*
3.4. 6-kuyucuklu Plakalarda Ekstraselüler Matriks (ECM) Kaplanması..... 25
3.5. Hücrelerin 6-kuyucuklu Plakalara Ekilmesi..... 25
3.6. Örneklerin Toplanması..... 26
3.7. Analiz Yöntemleri..... 26

3.7.1. Canlı–ölü boyama ile hücre canlılığının değerlendirilmesi 26
3.7.2. İmmünofloresan (İF) boyama yöntemi 27
3.7.3. Hedef genlerin ekspresyon düzeylerinin analizi (q-PCR) 28
3.8. İstatiksel Analiz 31
4. BULGULAR 32
4.1. iWJ-MKH'lerin Flow Sitometri Karakterizasyonu 32
4.2. iWJ-MKH'lerin Canlılık ve Proliferasyon Analiz Değerlendirilmesi.....33
4.3. Canlı–ölü Boyama ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi..... 34
4.4. İmmünofloresan Analiz Sonuçları 38
4.5. Gen Ekspresyonu Analizleri (AFP ve PCNA)..... 44
5. TARTIŞMA 49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 54
7. KAYNAKLAR DİZİNİ..... 56

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Kullanılan kök hücre tipi ve diğer hücre hatları.....20

Tablo 3.2. Deneysel çalışmada kullanılan farklı hücre kombinasyonları.....20

Tablo 3.3. İmmunofloresan çalışmasında kullanılan deney grupları ve kullanılan antikorlar.....28

Tablo 3.4. Farklı hücre kombinasyonlarının nanodrop ölçümleri.....30

Tablo 3.5. q-PCR'da kullanılanprimerler..... 30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Karaciğerin anatomik yapısı. 5

Şekil 2. 2. Karaciğer kanserinin şematik görüntüsü 8

Şekil 3. 1. Çalışmamın grafiksel özeti. 19

Şekil 3.2. Hücrelerin 6-kuyucuklu plakalara ekilmesi ile ilgili şematik görünüm. a) ECM hazırlanması b) 6 kuyucuklu plakanın ECM ile kaplanması c) Hücrelerin 6 kuyucuklu plakaya ekilmesi 25

Şekil 3. 3. İmmunofloresan çalışmamızın grafiksel özeti 27

Şekil 3. 4. q-PCR çalışmamızın grafiksel özeti 29

Şekil 4. 1. iWJ-MKH'lerin immunofenotipik olarak karakterize edilmesi. 3. pasaj'da iWJ-MKH'lerin flow sitometri ile karakterizasyonu. 32

Şekil 4. 2. Çözülen V4P4 Mezenkimal Kök hücrelerin morfolojik kontrollerinden elde edilen faz kontrast mikroskobik görüntüleri. 34

Şekil 4. 3. Farklı hücre kombinasyonlarının 1.gün canlı/ölü analiz sonuçları. a) Huh-7, b) Huh-7 + EA.hy926, c) Huh-7 + MKH ve d) Huh-7 + EA. hy926 + MKH, e) 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği, y ekseni Alan %. 35

Şekil 4. 4. Farklı hücre kombinasyonlarının 4.gün canlı/ölü analiz sonuçları. a) Huh-7, b) Huh-7 + EA.hy926, c) Huh-7 + MKH ve d) Huh-7 + EA. hy926 + MKH, e) 4.gün deney gruplarının grafiği, y ekseni Alan %.. 36

Şekil 4. 5. Farklı hücre kombinasyonlarının 7.gün canlı/ölü analiz sonuçları. a) Huh-7, b) Huh-7 + EA.hy926, c) Huh-7 + MKH ve d) Huh-7 + EA. hy926 + MKH, e) 7.gün deney gruplarının grafiği, y ekseni Alan %.. 37

Şekil 4. 6. Deney gruplarının ko-kültür modellerinde canlı/ölü analiz sonuçlarının karşılaştırılması 37

Şekil 4. 7. Hücre kombinasyonlarının İF boyama ile elde edilen 1.gün floresan mikroskop görüntüleri. (a) Huh-7 ALB (i) + MRP2 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), (b) Huh-7 + EA.hy926 ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), c) Huh-7 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), d) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), e) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v) hücre gruplarını kapsamaktadır.....38

Şekil 4. 8. Hücre kombinasyonlarının İF boyama ile elde edilen 4.gün floresan mikroskop görüntüleri. (a) Huh-7 ALB (i) + MRP2 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), (b) Huh-7 + EA.hy926 ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), c) Huh-7 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), d) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), e) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v) hücre gruplarını kapsamaktadır.…..... 40

Şekil 4. 9. Hücre kombinasyonlarının İF boyama ile elde edilen 7.gün floresan mikroskop görüntüleri. (a) Huh-7 ALB (i) + MRP2 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), (b) Huh-7 + EA.hy926 ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), c) Huh-7 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), d) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), e) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v) hücre gruplarını kapsamaktadır..... 42

Şekil 4. 10. Farklı ko-kültür modellerinde a) Albümin, b) CD142, c) MRP2 d) P miyozin ekspresyonları grafikleri. 43

Şekil 4. 11. Gerçek zamanlı PCR analizi ile PCNA gen ekspresyonunun her bir deney grubunda 1., 4. ve 7.günlere göre değerlendirilmesi. a) Huh-7 grubu, b) Huh-7 + EA.hy926 grubu, c) Huh-7 + MKH grubu, d) Huh-7 + MKH + EA.hy926 grubu.....45

Şekil 4. 12. Gerçek zamanlı PCR analizi ile PCNA gen ekspresyonunun 1., 4. ve 7.günlerde farklı deney grupları arasında karşılaştırılması. a) 1.gün PCNA gen ekspresyonu, b) 4.gün PCNA gen ekspresyonu, c) 7.Gün PCNA gen ekspresyonu. Ekspresyon düzeyleri referans grup olarak Huh-7'e göre normalize edilerek relatif olarak ifade edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ns: anlamsız). 46

Şekil 4. 13. Gerçek zamanlı PCR analizi ile AFP gen ekspresyonunun her bir deney grubunda 1., 4. ve 7.günlere göre değerlendirilmesi. a) Huh-7 grubu, b) Huh-7 + EA.hy926 grubu, c) Huh-7 + MKH grubu, d) Huh-7 + MKH + EA.hy926 grubu..... 47

Şekil 4. 14. Gerçek zamanlı PCR analizi ile AFP gen ekspresyonunun 1., 4. ve 7.günlerde farklı deney grupları arasında karşılaştırılması. a) 1.gün AFP gen ekspresyonu, b) 4.gün AFP gen ekspresyonu, c) 7.Gün AFP gen ekspresyonu. Ekspresyon düzeyleri referans grup olarak Huh-7'e göre normalize edilerek relatif olarak ifade edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ns: anlamsız). 48

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ECM	:Ekstrasellüler Matriks
Col I	:Tip I kolajen
DAPİ	:4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DMEM	:Dublecco’s modified eagle’s medium
DMSO	:Dimetil sülfoksit
EDTA	:Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	:Fetal sığır serumu
FN	:Fibronektin
ml veya Ml	:Mililitre
mM	:Milimolar
PBS	:Fosfat tamponlu salin
µm	:Mikrometre
EA.hy926	:Vasküler endotel hücre hattı
Huh-7	:Karaciğer hepotosellüler karsinoma kanser hücre hattı
HCC	:Hepatosellüler karsinoma
MKH	:Mezenkimal kök hücre
q-PCR	:Kantitatif PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer, omurgalı canlılarda çok sayıda hayati işlevi yerine getiren başlıca metabolik organlardan biridir. Hem kalpten oksijen açısından zengin kanı hepatik arter aracılığıyla hem de gastrointestinal sistemden besin yönünden zengin kanı portal ven yoluyla alır. Alınan bu kan, hepatosit kordonları arasında yer alan ve endotel ile Kupffer hücreleriyle çevrili sinüzoidlerden geçerek merkezi venden hepatik venlere ulaşır ve buradan sistemik dolaşıma katılır. Karaciğerdeki hücresel yapının büyük bir bölümünü (%70-85) hepatositler oluşturur (Hamel et al., 2006; Wang et al., 2019). Bu hücreler, metabolik aktiviteler, salgı işlevleri ve endokrin düzenleme açısından temel rolleri olan karaciğerin ana parankimal hücreleridir. Karaciğerde bulunan bir diğer hücre grubu ise Kupffer hücreleridir. Bu hücreler sinüzoidlerin duvarlarına yerleşmiş karaciğere özgü makrofajlardır ve bağışıklık yanıtında önemli görevler üstlenirler (Wisse et al., 1996). Bununla birlikte, hepatositler ile sinüzoidal endotel arasında konumlanan hepatik yıldız hücreleri (HSC'ler), Disse aralığında yer alan perisit benzeri hücrelerdir. Normalde inaktif halde bulunan bu hücreler, karaciğer hasarına yanıt olarak aktif hale gelebilir bu da kolajen üretimiyle birlikte fibrozis ve siroz gelişimine neden olabilir (Wu & Zern 2000). Karaciğerin önemli işlevlerinden biri olan safra üretimi, hepatositler tarafından gerçekleştirilir. Üretilen safra, epitel hücrelerle çevrili safra kanallarına taşınır ve daha sonra bu kanallar aracılığıyla karaciğeri terk eder (Wisse et al., 1996).

Karaciğer, insan sağlığının sürdürülebilirliği açısından kritik rol oynayan ve birçok hayati fonksiyonu yerine getiren temel bir organdır. Ancak bu hayati organ, günümüzde çeşitli karaciğer hastalıkları nedeniyle ciddi tehditlerle karşı karşıyadır. Bu hastalıklar, sadece bireysel düzeyde değil, küresel sağlık sistemi üzerinde de önemli bir yük oluşturmaktadır. Özellikle hepatit B ve C virüsleri, Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünya genelinde 325 milyondan fazla kişiyi etkileyerek bu alandaki en büyük viral tehditlerden biri haline gelmiştir (Wazir et al., 2023). Bu enfeksiyonlar çoğunlukla belirti göstermeksizin ilerlediği için tanı konulmasında gecikmelere yol açmakta ve karaciğer hastalıklarının yaygınlığına önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Karaciğer çalışmaları için *in vitro* modellerin oluşturulmasında, karaciğer hücrelerinin özelliklerini simüle edebilen hücre hatları ve diğer özel hücreler büyük önem taşır. Bu hücrelere Kupffer hücreleri, endotel hücreleri, birincil insan hepatosit hücreleri örnek verebiliriz. EA.hy926 hücre hattı, vasküler

fonksiyonların incelenmesinde sıkça kullanılır ve kardiyovasküler hastalıkların araştırılmasında önemli bir rol oynar.

Huh-7 hücreleri, ilk kez 1982 yılında 57 yaşındaki Japon bir erkekten alınan karaciğer tümöründen izole edilmiştir ve kökeni hepatosit olan, farklılaşmış ve kanseröz özellikler taşıyan bir hücre hattıdır (Nakabayashi et al., 1982). Huh-7 hücreleri, tanımlanmış kültür ortamlarında çoğaltılabilmesi sayesinde yalnızca onkogenezin düzenleyici mekanizmalarını açıklamakla kalmaz, aynı zamanda gen ekspresyonunun araştırılması ve çeşitli bileşiklerin hücre büyümesi ve metabolizması üzerindeki etkilerinin sistematik bir şekilde incelenmesi açısından da oldukça uygun bir model oluşturur.

EA.hy926 hücre hattı, hibrit hücreler arasında en iyi karakterize edilen hücre hattıdır. EA.hy926, insan akciğer karsinomu hücre hattı A549 ile insan göbek damarından izole edilen HUVEC hücrelerinin birleşimiyle oluşturulmuştur (Emeis & Edgell, 1988).

MKH'ler, kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip olup, aynı zamanda çok farklılaşabilen hücrelerdir (Dennis et al., 2002; Torensma et al., 2003). Bu hücreler çeşitli dokulardan elde edilebilir. Örnek olarak, göbek kordonu, endometrial polipler, adet kanı, kemik iliği ve yağ dokusu gibi kaynaklar sayılabilir (Ding et al., 2006; Ding et al., 2007).

3B hücre kültürleri, hücrelerin doğal ortamda etkileşime girerek büyüdüğü ve tümör mikroçevrelerini taklit eden modeller olarak önemli bir araştırma aracıdır. Çok hücreli küreler, 3B kültürlerde yaygın olarak kullanılan modellerden biridir ve hücrelerin yerçekimi veya dönüş gibi fiziksel kuvvetlerle şekillendirilen ortamlarda büyümesiyle tümör benzeri yapılar oluşturulmaktadır. Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya çapında yaygın ve yüksek mortaliteye sahip bir kanser türüdür, ancak erken tanı ve tedavi yöntemleri henüz yeterince gelişmemiştir. HCC'nin patogenezi tam olarak anlaşılamamış olup, bu alandaki araştırmalar uygun model sistemlerinin geliştirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Huh-7 hücre hattı, karaciğer kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir modeldir (Jung et al., 2017).

Son yıllarda, HCC'nin daha iyi taklit edilebilmesi için büyük boyutlu hücre kürelerinin üretimi üzerine çalışmalar artmıştır. Bu bağlamda, SFU (Spheroid Forming Unit – küresel yapı oluşturan birim) adı verilen yeni bir 3B kültür sistemi

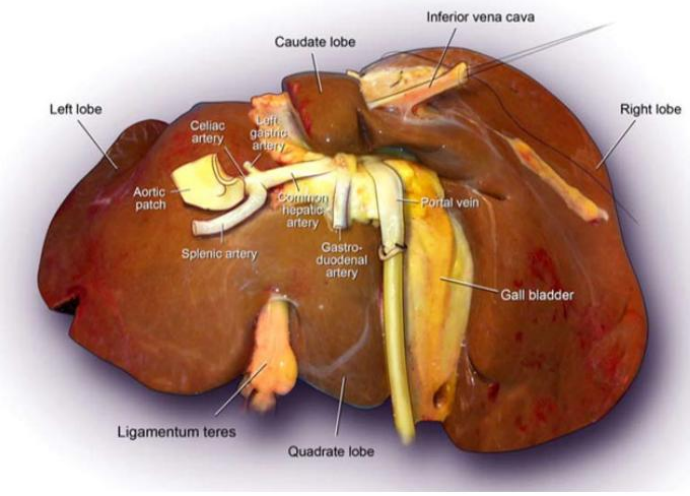
geliştirilmiş ve bu sistemin kanser ilaç testlerinde etkin bir model olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. SFU, asılı damla ve rotasyon kültür yöntemlerini birleştirerek büyük hücre kürelerinin üretimine olanak tanımaktadır ve bu küreler, hipoksi gibi karmaşık tümör mikroçevrelerini taklit edebilme kapasitesine sahiptir. Bu tür 3B kültür modelleri, kanser tedavi araştırmalarında önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır (Jung et al., 2017).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *in vitro* hepatoselüler karaciğer modeli oluşturulması amacıyla, Huh-7 hücreleri 3B kültür ortamında diğer hücre hatları olan mezenkimal kök hücreler ve EA.hy926 ile birlikte çalışılmıştır. Bu çalışmada, yeni bir yedi günlük kanser modelinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Araştırma, hücrelerin biyolojik özelliklerini değerlendirmek amacıyla canlı/ölü analizleri, İF ve q-PCR yöntemleriyle incelenmiştir. Bu doğrultuda, farklı hücre popülasyonlarının karaciğer kanseri modeli içerisindeki davranışlarının ve karşılıklı etkileşimlerinin daha kapsamlı biçimde ortaya konulması amaçlanmaktadır. Elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, geliştirilen modelin hem hücresel canlılığı sürdürdüğü hem de fonksiyonel ve moleküler aktiviteyi desteklediği ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğerin Anatomik Yapısı

Karaciğer, insan vücudunun en büyük organıdır ve yaklaşık 1500 gram ağırlığa sahiptir; bu da yetişkinlerin vücut ağırlığının yaklaşık %2,5'ine tekabül eder. Karaciğer, karın bölgesinin sağ üst kadranında, areolanın sol tarafından geçen diyafram yüzeyinde, tipik bir karaciğer haçıyla yedi ila on bir kaburga derinliğindedir (Moore & Dalley, 2006). Karaciğer, embriyolojik prensiplere göre gelişen embriyonun endoderm tabakasından elde edilir. Karaciğerin morfolojik ve işlevsel parçalarına dönüşmeden önce, bu endoderm tabakası farklılaşır. Göğüs kafesi, ligamentöz bağlantı olarak da bilinen peritoneal yansıma aracılığıyla karaciğeri korur. (Bismuth, 1982; Abdel-Misih & Bloomston, 2010). Anatomik olarak, Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi karaciğerin sağ, sol, kaudat ve kuadratik lobları vardır. Sağ ve sol loblar ön tarafta en belirgin loblardır. Arka tarafta bulunan kuadratik ve kaudat loblar daha küçüktür. Yukarıdaki falciform ligaman sağ ve sol lobları birbirinden ayırır. Sağ lobun ön kısmında bir safra kesesi vardır. Karaciğerin kan alımını sağlayan vena kava ve porta hepatis damarları, sağ ve sol lobların üstünde bulunan kaudat lobla bağlantılıdır (Allen,S.E.2002). Dış yüzeyi pürüzsüz ve düz, tipik olarak kahverengidir. Karaciğer, kanının %80'ini iki ana kaynaktan alır: dalak ve bağırsakları boşaltan toplar damardan gelen portal ven, %20'sini ise oksijenli kan taşıyan hepatik arter. Portal ven üst mezenterik venle birleşir. Ayrıca alt mezenterik ven de splenik vene boşalır. Çoğu durumda, karaciğer, splenik ve sol gastrik arterlerle birlikte çölyak arterin bir dalı olan ortak hepatik arterden kan almaktadır. Karaciğeri besleyen damarlar, bununla birlikte nadiren başka anatomik değişiklikler gösterir. Karaciğerin damar yapısı kişiden kişiye değişebilir, çünkü hepatit arterin anatomisi çeşitli şekillerde değişebilir. (Hiatt, Gabbay, & Busuttil, 1994).



Şekil 2. 1. Karaciğerin anatomik yapısı. (Sibulesky, L. 2013).

2.2. Karaciğerin Fizyolojik ve Metabolik İşlevleri

Vücudun birçok metabolik işlemi karaciğer tarafından yönetilir. Temel besin metabolizması, serum bileşenlerinin sentezi ve detoksifikasyon bu prosedürlerin arasında yer almaktadır. Karaciğerin bu görevleri, "ritmik olarak değişen sistemik bir ortamda" gerçekleşir. Karaciğer, diğer organlar gibi içsel bir zamanlama sistemine sahiptir ve bu sistem sayesinde fizyolojik işlevlerini günün uygun saatlerine göre ayarlar. Bu sirkadiyen saat, karaciğerin çevresel ve genel değişimlere yanıt olarak işlevlerini en üst düzeye çıkarmak için kullanılmasını sağlar. (Reinke & Asher, 2016). Sirkadiyen saat, biyolojik zamanı "endojen bir zaman tutucu" olarak düzenler ve organizmanın 24 saatlik döngülerde çevresel değişimlere adaptasyonunu sağlar; bu ritimler, evrimsel olarak korunmuş süreçler olup, neredeyse tüm canlılarda görülür. (Peek et al., 2012).

Karaciğerin detoksifikasyon işlevi, vücuttan ksenobiyotiklerin (toksinler ve ilaçlar gibi yabancı maddeler) çıkarılmasını sağlar. Hepatositlerde bulunan mikrozomal monooksijenazlar, bu maddelerin biyotransformasyonunda önemli bir rol oynar. (Sirica & Pitot, 1979). Ayrıca, karaciğerin safra üretme ve salgılama işlevi, yağların sindirimini ve vücuttan atıkların atılmasını sağlayan ana işlevdir. Atıkların organizmadan doğru bir şekilde atılmasını sağlayarak metabolik denetimin sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. Karaciğer aynı zamanda sindirim sisteminden emilen maddelerin güvenli bir şekilde işlenmesini ve sistemik olarak dolaşmasını denetlemelidir. Bu görev, kuruluşun iç denetim sistemlerinin doğru çalıştığını garanti etmek için gereklidir. (Ozougwu, J. C., 2017). Karaciğerin fizyolojik

görevleri, organizmanın homeostazını sürdürmesine ve çevresel koşullara uyum sağlamasına yardımcı olur. Vücudun metabolik dengesini sürdürebilmesi için gerekli olan bu karmaşık görevleri yerine getirirken, organizmanın çevresel koşullara en iyi şekilde adapte olması gerekir. Karaciğer, hayati bir organ olarak vücudu kontrol eder ve dengeler. (Alamri, Z. Z., 2018).

Vücudun üç ana metabolik kategorisi (karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması) karaciğer tarafından gerçekleştirilir. Karaciğer, yemekten sonra kan dolaşımına giren glikozdan aşırı miktarda glikozu glikojene dönüştürür. Bu işlem glikojenez olarak bilinir. Glikojenin glikoza dönüştürülmesiyle enerji üretimi glikojeoliz olarak bilinir. Düşük kan şekeri seviyeleri buna neden olur. (Mitra, V., & Metcalf, J., 2012).

Amino asitlerin protein moleküllerinin yapı taşları olarak işlev görmesiyle protein metabolizması gerçekleşir. Bir amino grubu (–NH2) ve bir karboksil grubu (–COOH) olan amino asitler, birbirleriyle bağlanarak proteinleri oluşturur. Bu amino asitler, vücut tarafından tüketilen proteinlerden elde edilir ve daha sonra kas proteinleri oluşturmak için kullanılır. Ek olarak, amino asitler vücutta çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar yoluyla çeşitli görevleri yerine getirir. (Mitra, V., & Metcalf, J., 2012).

Yağ asitlerinin üretimi, lipid metabolizmasının başlangıcıdır. Bu işlem, asetil koenzim A veya asetil CoA moleküllerinden yağ asitleri üretir. Karbonhidratların ve bazen proteinlerin katabolizması, lipogenez olarak bilinen fazla enerjinin depolanmasını sağlar. Bu, vücudun acil enerji ihtiyacını aşan bölümlerinin yağ olarak depolanmasını sağlar. (Mitra, V., & Metcalf, J., 2012).

Karaciğerin metabolik işlevlerinin yanı sıra, vücut fonksiyonlarını düzenlemek için büyüme hormonu ve insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) gibi hormonlar salgıladığı için önemlidir. Karaciğer, büyüme hormonu (GH) ve insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) gibi çok önemli hormonların üretiminde önemli bir rol oynar. Bu hormonlar, metabolik işlevlerde çok önemli görevleri üstlenir. Karaciğerde sentezlenerek karaciğerde sistemik dolaşıma salınır ve hücresel yaşlanmayı başlatarak hepatik stellat hücrelerinin (HSC) inaktivasyonunu teşvik ederek karaciğer fibrozu üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. (Takahashi, 2017). IGF-I ayrıca karaciğerde trigliserit birikimini azalttığı, mitokondriyal fonksiyonları geliştirdiği ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Yakar et al., 2001; Nishizawa et

al., 2012). Bu sonuçlar, IGF-I'nin non-alkolik steatohepatit (NASH) ve siroz gibi karaciğer hastalıklarının tedavisinde bir iyileştirici ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. (Takahashi, 2017).

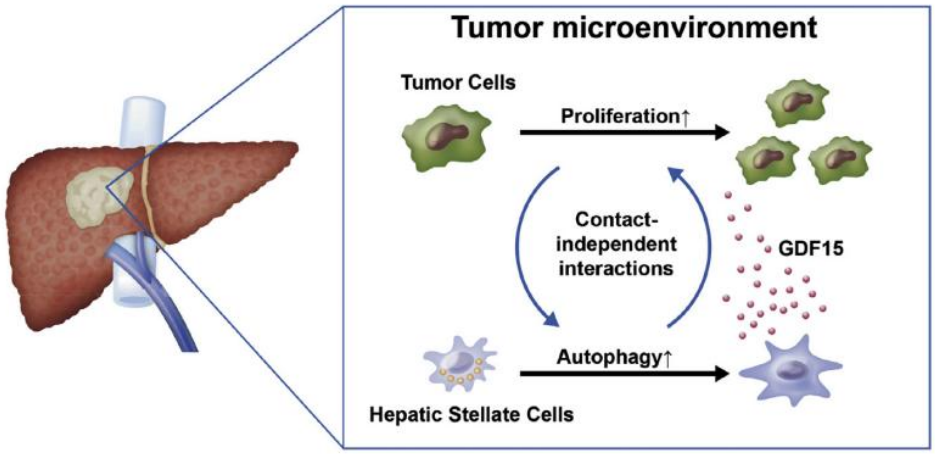
2.3. Karaciğer Hastalıkları ve Küresel Sağlık Üzerindeki Etkileri

Dünya çapında, karaciğer hastalıkları yılda yaklaşık 2 milyon kişiyi öldürür. Karaciğerin fonksiyonlarını bozan bir dizi sağlık sorunu karaciğer hastalıkları olarak bilinir. Şekil 2.2.'de kanser karaciğer gösterilmiştir. Bunlar siroz, hepatit, karaciğer yağlanması ve karaciğer kanseridir. Kronik karaciğer hastalığının insidansı ve yaygınlığı, coğrafi, etnik ve sosyoekonomik faktörlere bağlı olarak değişebilir, ancak hastalığın tam olarak teşhis edilmesi ve tanımlanması, çok sayıda farklı değerlendirme yöntemi ve eksik veriler nedeniyle hala çok zordur. Ek olarak, çoğu vakada sirozun erken evrelerinde tespit edilmemesi, hastalığın yükünü yanlış değerlendirmeye yol açabilir. (Asrani, S. K. 2019).

Yıllık 1,16 milyon ölümle dünya çapında en yaygın 11. ölüm nedeni sirozdur, karaciğer kanseri ise 788.000 ölümle 16. sıradadır. Bu iki hastalık, tüm dünyadaki ölümlerin %3,5'ini oluşturmaktadır. 2000 yılına kıyasla, karaciğer hastalıklarına bağlı ölümlerde bir artış görüldü. Siroz ve karaciğer kanseri sırasıyla en yaygın ölüm nedenleri olarak sıralandı ve sırasıyla 13. ve 20. sırada yer aldı. Hindistan ve Çin, Latin Amerika, Karayipler, Orta Doğu ve Kuzey Afrika'da karaciğer hastalıklarına bağlı ölümlerin çoğunun sorumlularıdır. (Asrani, S. K. 2019).

Hepatit A, B, C ve E virüslerinin neden olduğu enfeksiyonlar, dünya çapında önemli bir sağlık sorunu teşkil etmekte olup, özellikle viral hepatit B ve C ile ilişkili ölümler, 2020 yılında 1,1 milyon kişiyle tüberküloz kadar yüksek bir seviyeye ulaşmıştır. epatit A (HAV), düşük ve orta gelirli ülkelerde yaygın olup, çocuklar arasında genellikle asemptomatik seyretmesi nedeniyle doğru vaka verileri eksik kalmaktadır. Bununla birlikte, ABD, Avrupa ve Asya'da yetişkinlerde enfeksiyon oranlarında artış gözlemlenmektedir ve bu artış, özellikle madde bağımlılığı, evsizlik ve erkeklerle seks yapan erkekler gibi riskli gruplarda kişiden kişiye bulaşma oranlarının artmasıyla ilişkilidir. Hepatit B'nin küresel prevalansı azalma eğiliminde olsa da, bu azalma bölgesel farklılıklar göstermektedir; özellikle Afrika ve Güneydoğu Asya, küresel hepatit B yükünün önemli bir kısmını taşırken, HBV her yıl 1,1 milyon ölüme yol açarak, hepatit B ve C'ye bağlı ölümlerin büyük kısmını oluşturmaktadır. Hepatit B'nin önlenmesi için aşılama en etkili yöntemken, dünya

genelindeki aşılamada bölgesel farklılıklar gözlemlenmektedir. Öte yandan, HCV'nin küresel insidansı 1,43-1,5 milyon kişi arasında değişirken, 2020'de viremik HCV enfeksiyonunun yaygınlığı %0,7'ye düşmüş ve bu azalma, etkili tedavi ve yeni enfeksiyonların önlenmesi gibi faktörlerden kaynaklanmıştır. En yüksek HCV yaygınlığı 2020'de Doğu Avrupa (%2,9) ve Orta Asya'da (%2,6) gözlemlenirken, Çin, Pakistan ve Hindistan, en yüksek hastalık yüküne sahip ülkeler olarak öne çıkmaktadır (Devarbhavi, H/2023).



Şekil 2. 2. Karaciğer kanserinin şematik görüntüsü (Myojin et al., 2021).

Karaciğer hastalıkları, dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil etmektedir. HCC, tüm primer karaciğer kanserlerinin %90'ını oluşturmakta olup, karaciğer kanseri, tüm kanser türleri arasında ikinci sırada yer alan bir ölüm nedenidir. HCC, dinamik bir şekilde değişen zamansal eğilimler sergileyen ve coğrafi bölgeler, ırksal ve etnik gruplar, cinsiyetler arasında belirgin farklılıklar gösteren epidemiyolojik özelliklere sahip bir kanser türüdür. Bunun yanı sıra, HCC gelişiminde çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı ve bu faktörlerin çoğunun potansiyel olarak önlenebilir olduğu iyi belgelenmiştir. Ayrıca, sağlıklı karaciğerde nadiren görülen ancak siroz aşamasındaki kronik karaciğer hasarına yanıt olarak kanser gelişme riskinin belirgin şekilde arttığı hepatokarsinogenez süreci, giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Bu süreçteki moleküler mekanizmaların aydınlatılması, HCC'nin patogenezi üzerine yapılan araştırmaların önemli bir parçası haline gelmiştir (El-Serag & Rudolph, 2007).

Karaciğerin ana yapısal birimini hepatositler oluşturur. Hepatositler, karaciğer hücrelerinin yaklaşık %60'ını ve toplam hücresel kütlesinin %80'ini temsil eder (Allen, 2002). Bu hücreler, tek bir hücre kalınlığında düzenlenmiş plakalar

şeklinde sıralanır (Singh, 2007) Kan akışı, hepatik vene doğru, her iki açık yüzeyden geçerek hepatositler arasındaki boşluklardan ilerler ve burada toksinler ile besinler hepatositler tarafından alınır. Hepatositler, metabolik ve sentetik işlevlerin yerine getirilmesinde önemli rol oynayan, zengin bir endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, mitokondri, lizozom ve peroksizom içeren organellerle donatılmıştır (Wanson, Bernaert, & May, 1979). Kronik karaciğer hastalıklarının dünya genelindeki etkisi büyüktür. Tahminlere göre, dünya çapında 800 milyondan fazla kişi, kronik karaciğer hastalıklarından etkilenmekte olup, Çin'de bu sayı 300 milyonu aşmaktadır (Byass, 2014; Gines et al., 2016).

Kronik hepatit sırasında karaciğer hücre proliferasyonu artarken, siroz aşamasında hepatosit proliferasyonu belirgin şekilde azalır (Delhaye, Louis, & Degraef, 1996). Bu durum, karaciğerin rejeneratif kapasitesinin siroz evresinde tükenmiş olduğunu göstermektedir. Kronik karaciğer hastalığı sırasında, karaciğer hücrelerinde hızlandırılmış telomer kısalması meydana gelir ve bu durum, siroz evresinde yaşlanmış hepatositlerin birikmesine yol açar (Delhaye, Louis, & Degraef, 1996).

Son dönem karaciğer hastalıkları, dekompanse siroz ve karaciğer yetmezliği gibi ağır klinik tabloları içermektedir. Bu durumlar, portal hipertansiyon, asit, spontan peritonit, pıhtılaşma bozuklukları, gastrointestinal kanamalar, hepatik ensefalopati ve hepatorenal sendrom gibi ciddi komplikasyonlarla seyreder (Arroyo et al., 2016.). Karaciğer sirozu, yılda %57'lik bir ölüm oranına sahip olup, dünya genelinde yaklaşık 1,32 milyon ölüme neden olmaktadır ve bu, tüm ölümler içinde %2,4'lük bir paya sahiptir (Tsochatzis, Bosch, & Burroughs, 2014; Allen & Kim, 2016).

2.4. Hepatoselüler Karsinom (HCC) ve Tedavi Yöntemleri

HCC için en yaygın risk faktörü, kronik Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonudur ve bu durum vakaların yaklaşık %50'sinde gözlemlenmektedir. Özellikle gizli HBV enfeksiyonu ve aflatoksin B1'e maruz kalma, bu riskin artırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Sherman 2010; Chen et al. 2010). Yapılan çalışmalara göre, HBV taşıyıcılarında HCC gelişme riski, taşıyıcı olmayan bireylere kıyasla yaklaşık 100 kat daha fazladır. Siroz ile ilişkili hastalarda ise, viral

yük ve enfeksiyonun süresi, HCC riskini daha da artırmaktadır (Beasley et al. 1981; Chen et al. 2011).

HBV enfeksiyonu ile ilişkili HCC, aşı ile önlenebilir bir hastalık olup, kronik enfeksiyon ve viral replikasyonu tedavi etmek amacıyla kullanılan antiviral ajanlar, karaciğer hastalığının ilerlemesini engellemeye yardımcı olabilir ve uzun vadede HCC gelişimini önleyebilir (Papatheodoridis et al. 2010; Cho et al. 2014).

Çok erken aşama (0)

Çok erken evre, kompansize karaciğer fonksiyonu gösteren (Child-Pugh A) ve siroz ile sınırlı olan hastaları ifade eder. Bu aşamada, hastalar genellikle hiçbir semptom göstermezler ve portal hipertansiyon gelişmez. Tümör, tek bir lezyon olarak $\leq$ 2 cm büyüklüğünde olup, bu durum karsinom in situ olarak tanımlanır. Performans durumu, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) skalalarına göre 0 olmalıdır. Bu hastalar, cerrahi rezeksiyonla tedavi edildiklerinde, beş yıllık sağkalım oranları %90'ın üzerinde olup, tümör tekrarı oldukça nadirdir (Dai Y.2014).

Erken aşama hepatoselüler karsinom (BCLC A)

Erken evre hepatoselüler karsinom (HCC), genellikle tek bir lezyonun çapının 2 cm'yi aştığı ya da üç nodüler lezyonun her birinin çapının 3 cm'yi geçmediği klinik durumu ifade eder. Bu evrede, karaciğer fonksiyonu, Child-Pugh sınıflandırmasına göre değerlendirilmelidir ve hastalar yalnızca A ve B gruplarında yer almalıdır (Llovet et al. 1999). Erken evre hastalarda, portal hipertansiyonun varlığına dair bir belirti genellikle gözlemlenmez ve serum bilirubin seviyeleri normal sınırlarda kalır.

Tek lezyonlu hastalarda, cerrahi rezeksiyon için sağkalım, tümörün boyutuna bağlı olarak belirlenir. Bu bağlamda, Milano kriterleri genellikle karaciğer nakli için bir referans noktası olarak kabul edilmektedir. Milano kriterlerine göre, karaciğer nakli düşünülürken tek lezyonun çapının 5 cm'yi geçmemesi veya üç nodülün her birinin çapının 3 cm'yi aşmaması gerektiği belirtilmiştir (Otto et al.2013). Ancak, bu kriterlere uymayan durumlarda, alternatif tedavi yöntemlerinin etkinliği genellikle daha düşük seviyelerdedir. Ayrıca, tümör boyutunun artışı, damar invazyonu riskinin de belirgin şekilde artmasına yol açmaktadır (Sala et al. 2004).

Küratif bir karaciğer nakli uygulandığında, beş yıllık sağkalım oranı %50'nin üzerinde olabilir. Ancak, bu oran, hastanın klinik özellikleri, tümörün özellikleri ve tedaviye yanıtına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Mazzaferro et al. 2009; Arii et al. 2000).

Orta aşama hepatoselüler karsinom (BCLC B)

Orta aşama HCC, genellikle asimptomatik olan, multifokal hastalığı bulunan ve damar invazyonu ile ekstrahepatik metastazların görülmediği hastaları kapsamaktadır. Bu aşamada, lezyonlar genellikle büyük boyutlara ulaşabilir, ancak karaciğer fonksiyonu genellikle korunur (Child-Pugh A ve B sınıflamaları). Literatürde, orta aşama HCC'li hastaların ortalama hayatta kalma süresinin yaklaşık 16 ay olduğu bildirilmiştir.

Orta aşama HCC tedavisinde, transkateter arteriyel kemoembolizasyon (TACE), sağkalımı artıran etkili bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Yapılan randomize klinik çalışmaların ve meta-analizlerin, TACE'nin özellikle bu hastalar için sağkalımı artırdığına dair güçlü kanıtlar sunduğu görülmektedir (Llovet & Bruix 2003). Bununla birlikte, asit (portal hipertansiyon nedeniyle gelişen sıvı birikimi), TACE tedavisinin uygulanmasında önemli bir kontrendikasyon olarak tanımlanmış olup, bu durum bu hasta alt grubunda sağkalımı olumsuz etkileyen en önemli prognostik faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Cabibbo et al. 2010).

İleri aşama

İleri aşama HCC, hastalığın sistemik özellik kazandığı ve küratif tedavi seçeneklerinin büyük ölçüde ortadan kalktığı bir klinik evreyi temsil eder. Bu aşamada tedavi yaklaşımının temelini sistemik tedaviler oluşturmaktadır. Güncel BCLC yaklaşımına göre, özellikle immün kontrol noktası inhibitörleri ile anti-anjiyojenik ajanların kombinasyonları öncelikli tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır. Atezolizumab ve bevacizumab ya da durvalumab ve tremelimumab kombinasyonları bu kapsamda en sık tercih edilen rejimlerdir. Bu tedavilerin uygulanamadığı durumlarda ise tirozin kinaz inhibitörleri (örneğin sorafenib ve lenvatinib) veya tek ajan immünoterapiler alternatif olarak değerlendirilmektedir. Hastalık progresyonu ya da tedaviye intolerans gelişmesi halinde ikinci basamakta regorafenib, cabozantinib ve belirli hasta gruplarında ramucirumab gibi ajanlar

kullanılabilmektedir. Ayrıca, uygun hastalarda klinik araştırmalar da tedavi seçenekleri arasında önemli bir yer tutmaktadır (Reig & Bruix, 2022).

Moleküler sınıflandırma

Bir tümörün moleküler sınıflandırması, biyolojik alt sınıflandırmaların tanımlanmasına olanak tanıyarak, bu sınıflandırmalara yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesini sağlayabilir. Bu tür moleküler biyobelirteçler, HCC'nin evrelenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle AFP seviyeleri, hepatoselüler karsinomun prognozunu belirlemede kritik bir biyomarker olarak öne çıkmaktadır. Yüksek AFP seviyeleri, genellikle kötü prognozla ilişkilendirilmekte olup, HCC'nin karaciğerde ilerlemesi ile bağlantılıdır. Bununla birlikte, AFP için optimum kesme noktası henüz belirlenmemiştir; ancak mevcut veriler, yüksek AFP seviyelerinin, karaciğer nakli bekleyen hastalarda HCC'nin progresyon riskini arttırdığını göstermektedir (Llovet et al. 2012).

HCC rezeksiyonu sonrası perioperatif mortalite, sirotik hastalarda yaklaşık olarak %2-3 civarındayken, sirozu olmayan hastalarda bu oran daha düşük olabilmektedir. Genel bir kılavuz olarak, dekompanse siroz (kanama, asit veya portal hipertansiyon gibi) bulguları gösteren hastalarda, cerrahi rezeksiyonun uygunluğu sorgulanmalıdır. Bu hastalarda, hepatik rezervlerin yetersizliği nedeniyle cerrahi müdahale önerilmemektedir. İdeal olarak, rezeksiyon yalnızca tümör çapı $\leq$ 5 cm olan hastalarda düşünülmelidir. (Wong & Frenette 2011; Choi et al.2013). Ancak, son dönem çalışmaları, tümör boyutunun aday seçiminde tek başına yeterli bir kriter olmayabileceğini ortaya koymaktadır. Tümörün boyutu arttıkça, damar invazyonu riski ve metastaz/tekerrür oranları da artmakta ve 5 yıllık sağkalım oranı %70'lere kadar düşebilmektedir. (Roxburgh & Evans 2008. Zhong et al.2013; Liu et al.2014)

2.5. Hücresel Tedavi ve Deneysel Yaklaşımlar

Son yıllarda, hücre kültürü çalışmalarında klasik iki boyutlu yüzeylerin yerine destekleyici matriksler, geçirgen membranlar veya üç boyutlu iskelet yapıları üzerinde hücrelerin yetiştirilmesine yönelik araştırmalar giderek artmaktadır. Bu tür sistemler, hücrelerin doğal mikroçevresini daha iyi taklit ederek morfolojik ve fonksiyonel özelliklerinin korunmasına katkı sağlamaktadır.

Wang ve çalışma arkadaşları, Huh-7 5 hücre hattını kolajen I ve fibronectin ile kaplanmış mikroporlu iskelet sistemlerinde kültürlemiş ve bu koşulların

hücrelerin yüzeye tutunma kapasitesini, albümin sentezini ve karaciğer-spesifik aktivitelerini belirgin biçimde artırdığını bildirmiştir (Wang et al., 2016). Böylece üç boyutlu yapıların, düz kültür sistemlerine göre daha fizyolojik bir ortam sunduğu vurgulanmıştır. Benzer şekilde, Polidoro ve arkadaşlarının derleme çalışmasında EA.hy926 endotel hücreleri ile hepatoma kökenli hücre hatlarının geçirgen membranlar üzerinde birlikte kültürlenmesine yönelik modeller ele alınmıştır. Bu çalışmalar, hücreler arası iletişim ve mikroçevreye verilen yanıtın bu tür sistemlerde daha gerçekçi biçimde yansıtıldığını göstermiştir (Polidoro et al., 2021). Bu yaklaşımlar ışığında, hücresel tedavi ve deneysel tasarımlarda yalnızca hücre hattı seçimi değil, aynı zamanda kullanılan destek matriks veya iskelet sisteminin özellikleri de büyük önem taşımaktadır. 3B yapılar ve membran destekli sistemler, hücresel modellerin biyolojik geçerliliğini ve klinik araştırmalarla olan uyumunu artırmaktadır. Bu bağlamda, Huh-7 ve HepG2 hücre hatları, hepatokarsinom (karaciğer kanseri) ve çeşitli karaciğer hastalıklarının incelenmesinde en yaygın kullanılan *in vitro* modeller arasındadır. Huh-7 hattı, özellikle kronik viral enfeksiyonlar (örneğin Hepatitis C) ile ilişkili hepatokarsinom çalışmalarında tercih edilmektedir (Arzumanian et al., 2023). Buna karşılık**,** HepG2 hattı karaciğer metabolizması, ilaç toksisitesi, yağlanma ve metabolik bozukluklarla ilişkili karaciğer hastalıklarını inceleyen araştırmalarda kullanılmaktadır.”*Human in vitro models of non-alcoholic fatty liver disease*” başlıklı çalışmada, HepG2’nin NAFLD (alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı) modellerinde uygun bir hepatoma hücre hattı olduğu belirtilmiştir (Godoy et al., 2019). Her iki hücre hattı da, karaciğerin fibrozis veya siroz gibi sertleşmiş matriks koşullarını taklit eden üç boyutlu hidrojel sistemlerinde değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar, hücrelerin mekanik sertliğe karşı gösterdikleri morfolojik ve fonksiyonel tepkilerin, hastalıklı karaciğer dokusundaki patofizyolojik değişimleri yansıtabildiğini ortaya koymuştur (Li et al., 2023). Ayrıca, HepG2 hücreleri doku mühendisliği alanında da sıkça kullanılmaktadır. Desellularize edilmiş karaciğer iskeletleri üzerine yerleştirilen HepG2 hücrelerinin uzun süre canlı kaldığı, albümin sentezini sürdürdüğü ve karaciğer-özgü fonksiyonlarını koruduğu rapor edilmiştir (Takebe et al., 2013).

Sonuç olarak, Huh-7 hattı daha çok tümör ve viral enfeksiyon modelleri için uygun bir hücresel sistem sunarken, HepG2 hattı metabolik hastalıklar ve rejeneratif karaciğer modelleri için değerli bir araç oluşturmaktadır. EA.hy926 hattı ise

hepatoma hücreleriyle birlikte kullanıldığında endotel-tümör etkileşimini modellemek açısından önem taşımaktadır. Hücre hattı seçiminin yanı sıra kullanılan destek materyali ve kültür sistemi, elde edilen verilerin biyolojik doğruluğunu doğrudan etkilemektedir.

2.6. Karaciğer Kanserinde AFP ve PCNA'nın Biyolojik Rolleri

HCC, dünya genelinde en sık görülen malign tümörlerden biri olup, %5'in altında bir 5 yıllık sağkalım oranına sahip olmasıyla kanser kaynaklı ölümlerin ikinci en önemli sebebidir. (She et al., 2015. Cui et al., 2018) Çoğu HCC vakası, özgül biyolojik belirteçlerin eksikliği ve klinik semptomların belirgin olmaması nedeniyle ileri aşamalarda teşhis edilmektedir ve bu hastaların %80'inden fazlasının prognozu olumsuz yöndedir. HCC tanısında en yaygın kullanılan ve en önemli biyomarkörlerden biri AFP olarak kabul edilmektedir (Luo et al., 2019. Jing et al., 2020). Önceki araştırmalar, AFP'nin hücre proliferasyonunu destekleme potansiyeline sahip olduğunu ve karaciğer kanseri hücrelerinin *in vivo* ortamda bağışıklık yanıtlarından kaçabilme yeteneği gösterdiğini ortaya koymuştur; bu durum ise hastalığın prognozu açısından bağımsız bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir (Li et al., 2005). HCC'li hastalarda, çapı 3 cm'den küçük olan tümörlerin yalnızca %33-65'inde serum AFP seviyeleri yüksek bulunmuş (Wang et al., 2019. She et al., 2015), yaklaşık %30'unda ise AFP düzeyi normal seviyelerde kalmıştır (Lu et al., 2017). AFP'nin karaciğer kanseri taramasında biyolojik bir belirteç olarak kullanılması sınırlı olsa da, bu protein hala en yaygın başvurulan biyomarkördür. Bu bağlamda, AFP-negatif HCC'lerin tanı ve prognostik değerlendirmeleri için yeni biyomarkörlerin keşfi ve tümör gelişimindeki biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılması büyük bir önem taşımaktadır.

PCNA, hücre proliferasyonu, DNA onarımı ve hücre döngüsü düzenlemesinde önemli bir rol oynayan nükleer bir proteindir (Prosperi, 1997; Chang et al., 1991). PCNA, birçok farklı nükleer proteinle etkileşime girer ve transkripsiyon sonrası düzenleme mekanizmaları tarafından kontrol edilir. Bununla birlikte, DNA hasarına tepki olarak, transkripsiyonu p53'e bağımlı bir yol aracılığıyla tetiklenebilir (Shivakumar et al., 1995). Hücre döngüsünde, PCNA'nın iki farklı fraksiyonu, deterjan ekstraksiyonu ile tanımlanabilir: deterjanda çözünür ve deterjanda çözünmeyen/DNA'ya bağlı fraksiyonlar. İkinci fraksiyon, özellikle DNA replikasyonu ve sentezinde yer alan bölgelerle sıkı bir ilişki içindedir (Bravo &

MacDonald-Bravo, 1985.Bravo & MacDonald-Bravo, 1987; Celis & Celis, 1985). Özellikle, DNA'ya bağlı PCNA'nın seviyesi S fazı sırasında artar (Bravo & MacDonald-Bravo, 1985). Benzer şekilde, DNA onarım süreçlerinde, PCNA onarım bölgesine taşınır, DNA'ya sıkıca bağlanır ve bu nedenle deterjanda çözünmez (Toschi & Bravo, 1988).

Sirozlu hastalarda yüksek PCNA immün boyanması, hepatoselüler karsinom (HCC) gelişme riski ile ilişkilendirilmiştir (Ballardini et al., 1994. Donato et al., 2001). Ayrıca, HCC'li hastalarda yüksek PCNA düzeylerinin, hastalığın prognozunu olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (Kitamoto et al., 1993. Ng et al., 1994. Suehiro et al., 1995). Ancak, HCC ile ilgili mevcut literatürde, PCNA'nın hücre proliferasyonunun yanı sıra DNA onarımına da katılımı üzerinde yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bununla birlikte, PCNA'nın çok yönlü fonksiyonları, bu proteinin yalnızca hücre proliferasyonunun bir göstergesi olup olamayacağı konusunda bazı tartışmalara yol açmıştır (Ballardini et al., 1994. Donato et al., 2001. Kitamoto et al., 1993. Ng et al., 1994; Suehiro et al., 1995). Birçok araştırma, siroz ve neoplastik karaciğer dokularında DNA hasarı ve genetik dengesizliklerin varlığına dikkat çekmiştir; bu nedenle, PCNA'nın DNA onarımı süreçlerindeki rolü de göz önünde bulundurulmalıdır (Tsopanoumichalou et al., 1999; Nagai et al., 1997; Yeh et al., 2001).

2.7. Karaciğerin Rejenerasyonu ve Yenilenme Mekanizmaları

Karaciğer, telafi edici hiperplazi mekanizmasıyla kendisini yenileyebilir. Bu süreç, kaybolan karaciğer dokusunun yerine yeni hücrelerin üretilmesi ve mevcut karaciğer hücrelerinin çoğalması yoluyla gerçekleşir. Kalan karaciğer dokusu, organizmanın metabolik gereksinimlerini karşılamak amacıyla genişler ve bu genişleme, karaciğerin işlevsel kapasitesini eski haline getirmeye yardımcı olur. Ancak, bu genişleme sırasında, karaciğerin orijinal anatomik yapısının tam olarak eski haline dönmediği gözlemlenir. Gerçek bir rejenerasyon durumunda, karaciğerin eski haline dönmemesi, yalnızca doku hacminin artışıyla sınırlı olmayıp, organın mikroskobik yapısında da bazı farklılıklar olabilir (Farber & Gerson, 1984)

Kayıp hepatositlerin yerine geçen hücrelerin kökeni, karaciğerin rejenerasyonunu anlamada önemli bir faktördür. Gerçek rejenerasyondan farklı olarak, bazı durumlarda örneğin kısmi hepatektomi veya kimyasal karaciğer yaralanmalarında karaciğerin kütlesi, mevcut hepatositlerin çoğalmasıyla yerine

konur. Bu süreç, progenitör hücrelerin aktivasyonunu gerektirmez. Diğer bazı durumlarda ise, örneğin galaktozamin gibi kimyasal toksinlerin etkisiyle meydana gelen karaciğer hasarlarında, progenitör hücrelerin aktivasyonu ve bu hücrelerin çoğalması, organın tamir edilmesinde kritik bir rol oynar (Lemire, Shiojiri, & Fausto, 1991)

2.8. Huh-7 Hepatoselülür Karsinom Hücre Hattı (Huh-7)

Huh-7, 57 yaşındaki Japon erkek hastadan cerrahi olarak çıkarılan hepatoma dokusundan elde edilen kalıcı bir hepatoma hücre hattıdır (Kawamoto et al., 2020). Huh-7 hücrelerinin sodyum selenit ile desteklenen kimyasal olarak tanımlanmış ortamda sürekli çoğalabildiği bildirilmiştir (Nakabayashi et al., 1982). Bu hücre hattı, farklılaşmış hepatosit özelliklerini kısmen koruması, kültür koşullarına kolay adapte olması ve HCV replikasyon çalışmalarında yaygın kullanılması nedeniyle karaciğer hastalıkları ve HCC araştırmaları için önemli bir in vitro modeldir. Ayrıca Huh-7 hücrelerinin, HepG2 gibi yaygın kullanılan hepatoma hücre hatlarına alternatif olarak ilaç metabolizması ve ksenobiyotik yanıt çalışmalarında kullanılabileceği bildirilmektedir (Lin et al., 2012). Aynı zamanda Huh-7 hücre hattı, hepatosit benzeri morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini kısmen koruyabilmesi nedeniyle karaciğer biyolojisi araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücrelerin yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olması ve kültür koşullarına kolay adapte olabilmesi, uzun süreli in vitro çalışmalarda önemli avantaj sağlamaktadır. Ayrıca Huh-7 hücreleri, hepatit C virüsünün hücre içerisinde çoğalmasına izin veren yapısı sayesinde viral enfeksiyon mekanizmalarının araştırılmasında sık tercih edilmektedir. Bunun yanında TP53 gibi hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili genlerde mutasyonlar taşıması, Huh-7 hücre hattını tümör mikroçevresi, kanser progresyonu ve hücresel stres yanıtlarının incelenmesi açısından uygun bir deneysel model haline getirmektedir (Kawamoto et al., 2020).

2.9. EA.hy926 Hücre Hattı (EA.hy926)

Karaciğerle ilgili araştırmalar için *in vitro* modellerin geliştirilmesinde, karaciğer hücrelerinin özelliklerini taklit edebilen hücre hatları ve diğer spesifik hücreler büyük bir öneme sahiptir. Bu hücrelere Kupffer hücreleri, endotel hücreleri

ve birincil insan hepatosit hücrelerini örnek verebiliriz. In vitro hücre kültürleri, karaciğerin normal ve hastalıklı durumlarındaki biyolojik süreçleri incelemek için güçlü bir araçtır. Örneğin, hepatositlerin lipit metabolizmasındaki rolünü incelemek için HepG2 veya Huh-7 hücre hattı kullanılırken, karaciğer fibrozu ve inflamasyon modellerinde Kupffer hücreleri, stellat hücreler ve endotel hücreleri gibi stromal hücre bileşenleri kullanılabilmektedir. EA.hy926 hücre hattı, hibrit hücreler arasında şu anda en iyi karakterize edilen hücre hattıdır (Bouis et al., 2001).

EA.hy926 hücre hattı, insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC) ile A549 akciğer karsinomu hücrelerinin füzyonu sonucu elde edilmiştir (Emeis & Edgell, 1988). Hibritoma doğası nedeniyle, bu hücreler primer kültürlere kıyasla çeşitli dış etkilere karşı daha az hassasiyet gösterebilir. EA.hy926 hücre hattı, endotel hücrelerinin *in vitro* modelleri arasında yaygın olarak kullanılmakta olup, hücrelerin belirli fonksiyonel özelliklerini koruyarak uzun süreli kültivasyonlara uygunluk göstermektedir.

Bu hücreler, von Willebrand faktörünü (VWF) ifade etmesine rağmen, uzun süreli kültivasyonlarda bu faktörün gen ekspresyon seviyelerinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. EA.hy926 hücre hattı, özellikle anjiyogenez gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerin araştırılmasında yaygın bir şekilde kullanılan *in vitro* bir modeldir (Bauer et al., 1992; Cieslak et al., 2002). Ayrıca, büyük miktarlarda doku tipi plazminojen aktivatörü (t-PA), plazminojen aktivatör inhibitörü tip 1 (PAI-1) ve düşük seviyelerde ürokinaz üretmektedir. Fibrinolitik özellikleri, hücrelerin en az 30 geçiş boyunca stabil kalmasını sağlar (Emeis & Edgell, 1988).

2.10. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Karaciğerle ilgili *in vitro* modellerde, MKH kullanımı, karaciğerin biyolojik özelliklerini taklit edebilme potansiyeli nedeniyle büyük önem taşımaktadır. MKH'ler, çok yönlülükleri ve hücresel farklılaşma kapasitesi sayesinde, karaciğerin çeşitli fonksiyonlarını ve patolojik süreçlerini *in vitro* ortamda modelleme açısından değerli bir kaynak olarak öne çıkmaktadır. Bu hücrelerin kullanımı, karaciğerin rejenerasyon, hücresel etkileşimler ve inflamasyon gibi biyolojik süreçlerini daha doğru bir şekilde simüle etmeye olanak sağlamaktadır (Gönen, Z. B., & Şahin, N. S. (2019).

MKH, farklı dokulardan izole edilebilen ve çeşitli hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahip yetişkin kök hücrelerdir. MKH'ler, bağışıklık sistemini düzenleyici özellikler gösterir ve özellikle bağ dokusuna ait hücre tiplerine farklılaşma yeteneği taşır (Salehinejad et al.2020). MKH'ler birçok farklı dokudan izole edilebilir. Kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu, plasenta, endometriyum, menstrual kan, sinoviyal membran ve diş pulpası MKH açısından zengin kaynaklar olup, klinik uygulamalara yönelik büyük bir potansiyele sahiptir (Ding et al., 2011). MKH'ler, belirli yüzey belirteçlerine sahiptir. CD73, CD90 ve CD105 pozitif olarak eksprese edilirken, hematopoietik kök hücre belirteçleri olan CD45, CD34, CD14 ve CD79 taşınmaz (Liu et al., 2022). MKH'ler, bağışıklık hücreleriyle etkileşime girerek bağışıklık sistemini düzenleyebilir. Makrofajların proinflamatuar M1 fenotipinden anti-inflamatuar M2 fenotipine dönüşümünü teşvik eder. Bu süreçte prostaglandin E2 (PGE2), TGF-β ve CCL2 gibi immünomodülatör moleküller salgılar (Liu et al., 2022). Bunun yanı sıra, MKH'ler T ve B hücreleri üzerinde de düzenleyici etkilere sahiptir. Treg (Regülatör T) hücre oluşumunu artırırken, efektör T hücrelerinin aktivasyonunu baskılar (Liu et al., 2022).

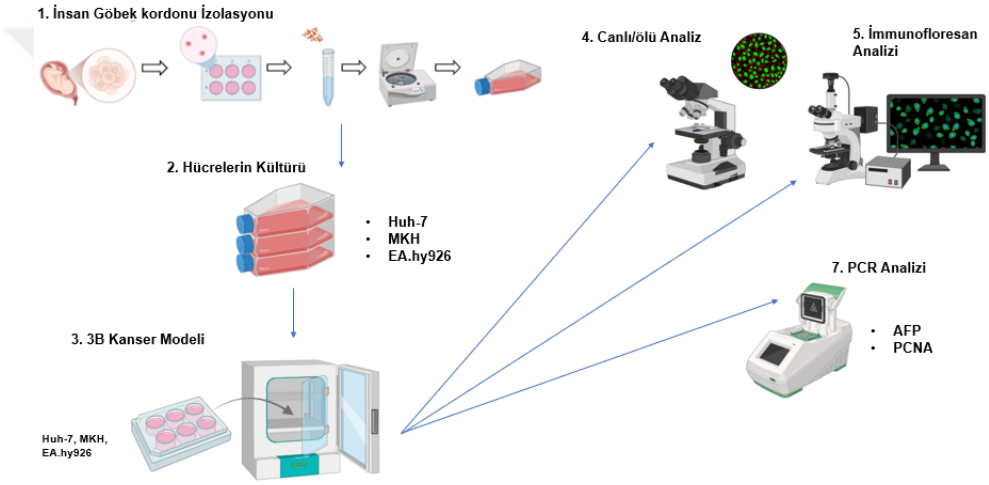
MKH'ler, doku yenilenmesi ve onarımı süreçlerinde aktif rol oynar. Ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri ve sitokinler salgılayarak hücresel rejenerasyonu destekler (Ding et al., 2011). Özellikle karaciğer, kemik, eklem kıkırdağı ve sinir dokusunun onarımında kullanımı üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Yağ dokusu kaynaklı MKH'ler, damar endotel hücreleriyle etkileşime girerek anjiyogenezi (damar oluşumunu) teşvik eder (Liu et al., 2022). MKH'lerin bir diğer önemli özelliği, hasarlı dokulara selektif olarak göç etme yeteneğidir. Bu süreç, stromal türevli faktör-1 (SDF-1) ve onun reseptörü CXCR4 gibi kemokinler aracılığıyla gerçekleşir (Ding et al., 2011). Hasarlı bölgelerde bulunan proinflamatuar sitokinler, MKH'lerin ilgili bölgeye yönlenmesini sağlar. Bu özellik, MKH'lerin hücre bazlı tedavilerde kullanımını daha da cazip hale getirmektedir (Ding et al., 2011). MKH'ler içinde bulunduğu mikroçevre ile sürekli etkileşim halindedir. Mikroçevredeki bileşenler, MKH'lerin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve işlevlerini doğrudan etkileyebilir. Örneğin, hipoksik (düşük oksijen) mikroçevre, MKH'lerin kendi kendini yenileme kapasitesini artırabilir ve osteojenik farklılaşmasını destekleyebilir (Liu et al., 2022).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Tasarımı ve Çalışma Grupları

Bu tez çalışması sadece *in vitro* hücre kültürü ortamında (insan ya da hayvan vücudu dışında) ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ), Tıp Fakültesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının karar iznin sayı numarası: E-25403353-050.04-250202182 sayılı ve No:39 21.11.25 tarihli etik kurul izni ile insan kaynaklı atık dokulardan elde edilmiş MKH'ler ve Huh-7 ve EA.hy926 ticari hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın deney planı grafiksel özet şekilde Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1. Çalışmamın grafiksel özeti.

Bu çalışmada, Huh-7 ve EA.hy926 ticari hücre hattı, atık insan göbek kordonundan izole edilmiş primer MKH hatları olmak üzere üç farklı hücre tipi kullanılmışır. Öncelikle tüm hücre hatları uygun kültür koşullarında çoğaltılmıştır. Ardından, hücreler kullanılarak bir ko-kültür karaciğer kanseri modeli oluşturulmuştur. Model kapsamında farklı hücre kombinasyonları birbirleriyle karşılaştırılmış, hücresel canlılık ve ölüm durumlarını değerlendirmek amacıyla İF boyama analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra, gen ekspresyon düzeylerini belirlemek için PCR analizleri uygulanmıştır. Bu yaklaşım sayesinde, oluşturulan modelde hücreler arası etkileşimlerin hücresel davranış ve fonksiyon üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, 3B statik kültür ortamlarında yapılan deneylerde Tablo 3.1.'de gösterildiği gibi 3 hücre tipi kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan kök hücre tipi ve diğer hücre hatları

Hücre İsmi	Hücre Tipi
Mezenkimal Kök Hücre (MKH)	Göbek kordonu Wharton jölesinden izole edilen mezenkimal kökenli hücreler
Huh-7	İnsan hepatokarsinomdan türetilmiş diferansiye epitel benzeri karaciğer hücresi
EA.hy926	HUVEC – İnsan umbikal ven endotel hücresi ve A549 füzyonundan türetilmiş damar endoteli hücre hattı

Burada 3B statik kültürde Tablo 3.2.'de gösterildiği gibi deney grupları oluşturulmuştur. İkili, tekli ve üçlü deney grupları olmak üzere 6 kuyucuklu plakalara hücrelerin ekimi yapılmıştır.

Tablo 3.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan farklı hücre kombinasyonları

Tekli Grup	Huh-7
İkili Grup	Huh-7 + EA.hy926
	Huh-7 + MKH
Üçlü Grup	Huh-7 + EA.hy926 + MKH

Hücrelerin biyolojik süreçlerini, örneğin hücrelerin çoğalması, büyümesi, migrasyonu ve apoptoz gibi temel aktivitelerinin izlenmesi amacıyla, uygulanan tedavinin etkinliğini ve uzun vadeli etkilerini değerlendirmek için deney sürecini yedi gün boyunca gözlemlenmiştir. Bu süreçte, 1., 4. ve 7. günlerde gerçekleştirilen gözlemlerle, hücre gruplarındaki biyolojik değişimlerin zaman içindeki seyrini inceleyebilmek için analizler yapılmıştır.

3.2. Hücre Kültürü Koşulları

Çalışmamızda, 3B statik kültür oluşturmak amacıyla kullanılan üç farklı hücre tipi- MKH, Huh-7 ve EA.hy926 kültüre edilmiş ve bu hücreler üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.3. Hücrelerin Temini, Çözdürülmesi ve Kültüre Edilmesi

3.3.1. İnsan wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iWJ-MKH) izolasyonu karakterizasyonu ve kültürü

Bu tez çalışmasında kullanılan MKH hücreleri, insan göbek kordonunun bağ dokusu olan Wharton Jeliden elde edilen hücreler olup izolasyonu, karakterizasyonu ve kültür işlemleri titizlikle gerçekleştirildi. İlk adım olarak, laboratuvara getirilen doku örneği %1 penisilin-streptomisin içeren HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak temizlenmiştir. Bu yıkama işlemi, doku örneğindeki yabancı maddelerden ve kontaminasyonlardan arındırmayı sağlamaktadır. Yıkama işlemi sonrasında, doku örneği makasla yaklaşık 1 cm^3 boyutlarında küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra, küçük parçalara ayrılan dokular %0,075 Type I kollajenaz solüsyonu ile işleme alınmıştır. Kollajenaz solüsyonu, hücreleri bağ dokudan serbest bırakmak için kullanılan enzimdir ve dokular bu solüsyon içinde 37 °C sıcaklıkta, çalkalama hareketiyle 60 dakika bekletilmiştir. Bu süre zarfında, kollajenaz enzimi doku yapısını çözer ve hücreler serbest hâle gelir. Enzimatik işleme sonrasında, 5 mL HBSS eklenerek doku çözeltisi 1800 rpm hızında 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında oluşan hücre pelletine 5 mL HBSS eklenmiş ve hücreler 70 µm boyutunda hücre süzgeci ile süzülerek büyük parçacıklardan ayrılmıştır. Ardından, süzülen hücre çözeltisi tekrar 500×g hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich Rotina 380R, Westphalian, Almanya). Bu işlem, hücrelerin daha saf bir şekilde ayrılmasını sağlamaktadır. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant atılmış ve pellete 5 mL lizis solüsyonu eklenmiştir. Lizis solüsyonu ile hücre zarları parçalanarak hücreler serbest bırakılır ve bu işlem oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. Lizis işlemi sonrasında, çözeltinin içeriği yeniden 5 mL HBSS ile seyreltilmiş ve 300 ×g hızında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemle hücreler tekrar çökeltilmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Son olarak, hücre pelletine kültür ortamının uygunluğu için %15 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri eklenerek, 75 cm^2'lik kültür kabına ekim yapılmıştır. Ekim sonrası, hücreler 37 °C, %5 CO_2 ve yüksek bağıl nem ortamında inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon koşulları hücrelerin çoğalması için gerekli ortamı sağlar.

Kültür süreci sırasında, hücrelerin sağlıklı büyümesini ve çoğalmasını sağlamak amacıyla, haftada iki kez besiyeri değişimi yapılmıştır. Besiyeri değişimi, hücrelerin besin ihtiyacını karşılamak ve atık ürünlerden arındırılmasını sağlamak için gereklidir. Hücrelerin büyümesi izlenmiş ve kültür kabının tabanı yaklaşık olarak %80 oranında hücrelerle kaplandığında (konfluent), tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilerek hücreler kültür ortamından ayrılmıştır. Bu işlemle, hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmış ve yeniden kültüre edilmiştir. Hücrelerin büyüme ve çoğalma süreçleri üçüncü pasaja kadar tekrarlanmıştır. Üçüncü pasajın sonunda, elde edilen hücreler üzerinde karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon için hücrelerin mezenkimal kök hücre özelliklerini doğrulamak üzere morfoloji ve plastiğe yapışma özellikleri; mkh kök hücrelere spesifik neqativ ve pozitif belirteçler ile immunofenotipik özellikleri ve farklılaşma potensiyelleri (Mezoderm kökenli en az üç farklı hücreye; adipojenik, kondrojenik ve osteojenik hücrelere) açısından analizleri yapılmışdır.

Hücre hattının MKH karakterinde olduğu doğrulandıktan sonra deneyler için gerekli sayıya ulaşıncaya kadar kültürde çoğaltılarak gelecekteki deneylerde kullanılmak üzere -152 ^{0}C'lik derin dondurucuda dondurularak saklandı (kriyoprezerve edildi). Deneylere başlamadan önce hücreler, uygun çözme (Thawing) koşullarına uyularak çözüldü ve çözülen mkh'lerin, dondurma-çözme sonrası MKH karakterini, canlılık ve proliferasyon özelliklerini koruyup korumadığı doğrulanmak üzere analiz edilerek deneylere başlandı.

3.3.1.1. iWJ-MKH'lerin deney öncesi canlılık ve proliferasyon analizi

Çözme sonrası deneylere başlamadan önce hücreler tripan blue ile boyanarak thoma lamında canlı-ölü hücreler sayılarak % canlılıkları belirlendi. Bu amaçla dondurulmuş hücre vialleri 37 °C su banyosunda hızlı şekilde çözdürülmüş ve steril koşullarda santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Hücrelerden kriyoprotektan uzaklaştırılması amacıyla santrifüj işlemi uygulanmış, elde edilen hücre pelleti uygun miktarda besiyeri ile yeniden süspanse edilmiştir. Canlılık analizi için hücre süspansiyonundan örnek alınarak Trypan Blue boyası ile karıştırılmış ve Thoma lamı kullanılarak canlı-ölü hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Canlı hücrelerin boyayı dışladığı, ölü hücrelerin ise mavi renkte boyandığı dikkate alınarak hücre canlılık oranı belirlenmiştir. Canlılık değerlendirmesi sonrasında hücreler uygun yoğunlukta flasklara ekilmiş ve kültür ortamı olarak DMEM High Glucose (DMEM-HG) ile

NutriStem besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37 °C, %5 CO_2 ve nemli inkübatör koşullarında kültüre edilmiştir. Kültür süreci boyunca hücre morfolojisi, yüzeye tutunma özellikleri ve konfluens durumları düzenli olarak takip edilmiştir. Hücreler uygun konfluens düzeyine ulaştığında tripsinizasyon işlemi uygulanarak pasajlanmış ve proliferasyon kapasiteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca kültür süreci boyunca düzenli besiyeri değişimleri gerçekleştirilmiş ve deneylerde kullanılmayacak hücreler tekrar kriyoprezerve edilmiştir.

3.3.2. İnsan karaciğer hepatoselüler karsinoma (Huh-7) hücrelerinin temin edilmesi, çözünmesi ve kültürü

Çalışmamızda, hepatoselüler karsinom (HCC) hücre hattı olarak yaygın bir şekilde kullanılan Huh-7 hücre hattı kullanılacaktır. Bu hücre hattı, ATCC'den (American Type Culture Collection) farklı bir proje kapsamında temin edilmiştir (ATCC HB-8065). Temin edilen hücreler, soğuk koşullarda muhafaza edilmiştir ve kültür öncesi uygun koşullarda çözündürülmeleri gerekmektedir. Huh-7 hücrelerinin çözündürülmesi için, önce hücreler -80 °C'de saklanan şekilde soğutulmuş kriyovialden çıkarılarak oda sıcaklığına getirilmiştir. Ardından, hücreler uygun bir besiyeri çözeltisi olan %10 fetal bovin serumu (FBS) içeren DMEM/F-12 besiyeri ile dikkatlice çözündürülmüştür. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra, hücrelerin sağlıklı bir şekilde kültür ortamına adapte olabilmesi için, çözündürme işleminden elde edilen hücre çözeltisi, düşük hızda (125×g) 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem, hücrelerin ölü hücrelerden ve besiyeri çözeltisindeki diğer kirleticilerden ayrılmasını sağlamaktadır. Santrifüj işlemi sonrasında, süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen hücre pelletine uygun besiyeri eklenerek, hücrelerin homojen şekilde süspanse edilmesi sağlanmıştır. Besiyeri olarak %10 FBS içeren 1X DMEM, hücrelerin çoğalmasını destekleyecek ve uygun bir kültür ortamı sağlayacak şekilde seçilmiştir. Bu hücre çözeltisi, 25 cm^2'lik kültür kaplarına ekilerek, hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli koşullar oluşturulmuştur. Huh-7 hücreleri, inkübasyonda %5 CO_2'lik atmosferde, %95 bağıl nemde ve 37°C ortamında kültür edilmiştir. Bu koşullar, hücrelerin optimal büyüme hızını ve sağlıklı gelişimini desteklemek amacıyla ayarlanmıştır. Hücrelerin yeterli çoğalma oranına ulaşabilmesi için kültür ortamı her iki günde bir taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücrelerin kültür koşulları altında büyüme gözlemi yapılmış ve hücrelerin morfolojisi düzenli olarak mikroskopla incelenmiştir. Hücreler kültür ortamında sağlıklı şekilde

çoğaldıklarında, %70-80 çoğalma oranına ulaştıklarında pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir. Pasaj işlemi, hücrelerin yeni kültür kaplarına aktarılması ve hücre yoğunluğunun kontrol edilmesi amacıyla yapılmıştır.

Sonuç olarak, Huh-7 hücre hattı, çalışmamızda kullanılacak olan temel hücre kaynağıdır ve doğru çözünme, kültür ve pasaj koşulları altında sağlıklı bir şekilde çoğaltılmaktadır. Bu prosedür, hücrelerin istikrarlı bir şekilde büyümesi ve deneysel koşullarda kullanılabilir hale gelmesini sağlamaktadır.

3.3.3. EA.hy926 endotel hücre hattının kültürü ve temini

Endotel hücre hattı olarak kullanılan EA.hy926 (ATCC CRL-2922, Manassas, ABD) hücre hattı farklı bir proje kapsamında ticari olarak temin edilmiştir. Soğuk koşullarda muhafaza edilen hücreler, uygun kültür koşullarında çözdürülüp 125×g hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya). Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen hücre pelletine DMEM High Glucose without L-Glutamine, with Sodium Pyruvate besiyeri eklenerek süspanse edilmiştir. Besiyerinde homojenize olan canlı hücre sayısı, hücreli besiyeri çözeltisi ile tripan mavisi 1:1 oranında karıştırılarak Thoma lamı yardımıyla sayılmıştır. Hücrelerin canlılık oranı belirlendikten sonra, hücre çözeltisi T75 kültür flasklarına ekilmiştir. Sonrasında hücrelerin kültürünü sağlamak için %5 CO_2'lik atmosfer, %95 bağıl nem ve 37 °C ortamda inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücreler yeterli çoğalma seviyesine ulaşana kadar her 2 günde bir besiyeri değiştirilmiştir. Mikroskopik inceleme sırasında hücreler %70 çoğalma oranına ulaştığında, pasaj işlemi gerçekleştirilip yeni T75 kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücrelerin pasajlanması sırasında, ölü hücrelerin ve atıkların uzaklaştırılması için Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen fosfat tamponu (PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi sonrasında hücreler 1 mL Tripsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) enzimi ile 37 °C'lik inkübatörde 2 dakika boyunca muamele edilmiştir. Hücrelerin kültür kabının tabanından ayrıldığından emin olduktan sonra PBS ile tripsinin inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada hücreler fosfat tamponu ile iki kez yıkanmıştır. Ardından hücre solüsyonu 15 mL'lik tüplere alınmış ve 125 × g hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sırasında hücreler besiyeri eklenerek kültür flasklarına ekilmiştir ve inkübatörde %5 CO_2'lik atmosferde inkübe edilmiştir. Hücrelerin

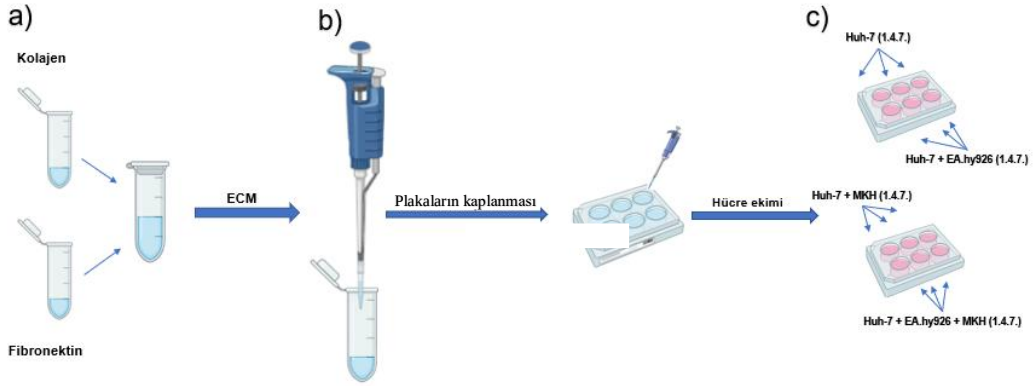
dondurulma işlemi sırasında, santrifüj sonrası süpernatantın uzaklaştırıldığı hücre pelletleri, +4°C'de bekletilen dondurma besiyeri ile sulandırılmış ve her kriyovialde en fazla 3 milyon hücre olacak şekilde -150°C'de (Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya) derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4. 6-kuyucuklu Plakalarda Ekstraselüler Matriks (ECM) Kaplanması

Hücreler, 6 kuyucuklu kültür plakalarında ko-kültür yöntemi kullanılarak hem ekstraselüler matriks (ECM) ortamında kültüre edilmiştir. İlk aşamada, 6 kuyucuklu plakalar 1 mL penisilin-streptomisin içeren PBS ile yıkanmış, ardından çözelti uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kollajen ve fibronektin karışımı ile ECM hazırlanmış ve bu karışım plaka yüzeylerine 400 µL kaplanarak 2 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda ECM solüsyonu uzaklaştırılmış ve hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Deneyler paralel olarak yürütülmüş olup her deney grubu için üç paralel kuyucuk kullanılmıştır (örn. 1., 4. ve 7. kuyucuklar).

3.5. Hücrelerin 6-kuyucuklu Plakalara Ekilmesi

ECM ile kaplama işlemi tamamlanan 6 kuyucuklu plakalar hücre ekimi için hazırlanmıştır. Hücre ekimi öncesinde Huh-7, MKH ve EA.hy26 hücreleri uygun konfluens düzeyine ulaştığında pasajlanarak taze kültür ortamına aktarılmıştır. Çalışmamızın plaka kaplanması ve hücre ekilme işlemleri Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 2. Hücrelerin 6-kuyucuklu plakalara ekilmesi ile ilgili şematik görünüm. a) ECM hazırlanması b) 6 kuyucuklu plakanın ECM ile kaplanması c) Hücrelerin 6 kuyucuklu plakaya ekilmesi

Deneysel gruplar aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

1. Yalnızca Huh-7 hücreleri,
2. Huh-7 + MKH (mezenkimal kök hücre) ko-kültürü,
3. Huh-7 + MKH + EA.hy926 üçlü kültürü,
4. Huh-7 + EA.hy926 ko-kültürü.

Her bir deney grubu ECM kaplı olmak üzere iki paralel koşul hazırlanmıştır. Her kuyucuğa 300.000 Huh-7 ve 300.000 EA.hy926 hücresi eklenmiş, MKH içeren gruplarda ek olarak 20.000 MKH hücresi ilave edilmiştir. Hücre ekimi sonrasında plakalar inkübatöre yerleştirilmiş ve 1., 4. ve 7. günlerde analiz edilmek üzere kültürlenmiştir.

Buharlaşmayı önlemek ve kültür ortamının nem dengesini korumak amacıyla plaka kuyucukları arasına 1 mL PBS veya Pen/Strep içeren PBS eklenmiştir. Hücre ekimi tamamlandıktan sonra deneysel süreç başlatılmış ve belirtilen zaman noktalarında hücrelerin morfolojik özellikleri ve davranış değişimleri mikroskobik olarak izlenmiştir.

3.6. Örneklerin Toplanması

Hücreler, her bir kuyucuğa toplam 4 mL yüksek glikozlu DMEM besiyeri içerisinde ekilmiştir. Kültür süresince her iki günde bir 2 mL besiyeri değiştirilmiştir. Gün sonunda gerçekleştirilen analizlerde, kuyucukların yarısı hücre kazıyıcı ile kazınarak hücreler tüplere aktarılmış, 5200 g'de 10 dakika santrifüj edilerek peletler elde edilmiştir. Bu peletler dondurularak PCR analizleri için saklanmıştır. Geriye kalan hücreler ise 1 mL canlı/ölü boyama solüsyonu ve besiyeri karışımı içerisinde değerlendirilmiş ve canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

3.7. Analiz Yöntemleri

3.7.1. Canlı–ölü boyama ile hücre canlılığının değerlendirilmesi

Hücre canlılığını niteliksel olarak değerlendirmek amacıyla memeli hücre kültürlerine yönelik Canlı/Ölü Boyama Kiti (L3224, Thermo Fisher, Paisley, ABD) kullanılmıştır. Bu kit, canlı ve ölü hücreleri ayırt etmeye yönelik farklı floresan sinyalleri veren Calcein-AM ve Etidyum Homodimer-1 (EthD-1) çözeltilerini içermektedir.

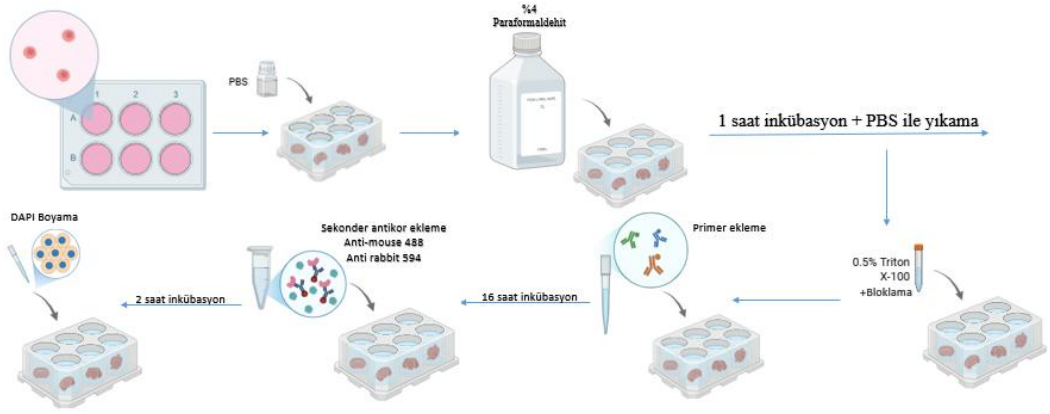
Calcein-AM (asetoksimetil ester), hücre içine nüfuz edebilen ve hücre içi esterazlar tarafından hidrolize edilerek floresan sinyali veren Calcein'e dönüşen,

başlangıçta floresan özelliği olmayan bir bileşiktir. Bu dönüşümün ardından Calcein hücre içerisinde birikerek 495/515 nm dalga boylarında floresan ışık yayar. Dolayısıyla membran bütünlüğü korunmuş canlı hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Buna karşılık, Etidyum Homodimer-1 (EthD-1) hücre membranından geçemediği için yalnızca membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelere girerek bu hücreleri kırmızı floresanla işaretler (Pasricha & Sachdev, 2017).

3.7.2. İmmünofloresan (İF) boyama yöntemi

Yedi gün boyunca sürdürülen deney gruplarında, her günün sonunda ilgili hücre tipleri İF boyama protokolüne tabi tutulmuştur. Hücre tiplerine özgü primer ve sekonder antikorlar Tablo 3.3.'de aynı zamanda inmmünofloresan boyama yönteminin grafiksel özeti Şekil 3.3.'de gösterdiği şekilde belirlenmiştir.

Her deney gününün sonunda altı kuyulu kültür plakalarındaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Plaka tabanına adherent olarak tutunan hücreler 1 mL fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmıştır. Ardından her bir kuyudaki hücreler 1 mL %4 paraformaldehit çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat süreyle fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemini takiben hücreler PBS ile yıkanmış ve hücre membran geçirgenliğini sağlamak amacıyla uygun permeabilizasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra nonspesifik bağlanmaları önlemek amacıyla bloklama çözeltisi ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bloklama aşamasının ardından, her hücre grubuna özgü primer antikorlar ilgili tabloda belirtilen konsantrasyonlarda uygulanmıştır.



Şekil 3. 3. İmmunofloresan çalışmamızın grafiksel özeti.

Tablo 3.3. İmmunofloresan çalışmasında kullanılan deney grupları ve kullanılan antikorlar

Deney Grupları	Kullanılan Antikorlar
Huh-7	ALB + MRP2
Huh-7 + EA.hy926	ALB + P Miyozin
Huh-7 + MKH	ALB + CD142
Huh-7 + EA.hy926 + MKH	ALB + P Miyozin
Huh-7 + EA.hy926 + MKH	ALB + CD142

Primer antikor inkübasyonu 16 saat süreyle +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler PBS ile beş kez yıkanmıştır. Tabloda belirtilen uygun floresan işaretli sekonder antikorlar hücrelere uygulanmış ve 2 saat süreyle oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Sekonder antikor olarak, Anti-mouse 488 (yeşil) ve Anti-rabbit 594 (kırmızı) kullanılmıştır. Sekonder antikor inkübasyonunun ardından hücreler PBS ile üç kez yıkanmıştır.

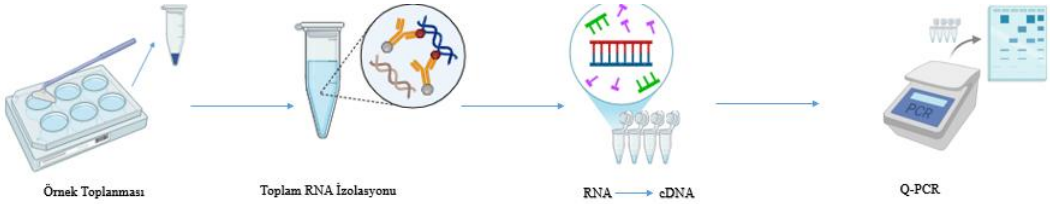
Son aşamada, çekirdek boyaması amacıyla DAPI çözeltisi uygulanmış ve 15 dakika inkübe edilmiştir. Fazla boya PBS ile uzaklaştırıldıktan sonra hücreler floresan mikroskop altında görüntülenmiştir.

Görüntüler, ESTEM bünyesinde bulunan Floresan Ataşmanlı Inverted Araştırma Mikroskobundan alınmıştır (Carl Zeiss Axio Observer D1, Oberkochen, Almanya).

3.7.3. Hedef genlerin ekspresyon düzeylerinin analizi (q-PCR)

Hepatoselüler karsinom ile ilişkili AFP ve PCNA genlerinin ekspresyon düzeyleri, bu genlere özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile analiz edilmiştir. Öncelikle deney gruplarından elde edilen hücrelerden total RNA, RNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel, Düren, Germany) kullanılarak izole edilmiştir. Saflaştırılan RNA sonuçları Tablo 3.4'de gösterilmiştir. Saflaştırılan RNA örneklerinden 200 ng RNA kullanılarak cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (ABM, Richmond, Canada) ile üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR analizleri SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak gerçek zamanlı PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı toplam 20 µL hacimde hazırlanmış olup, cDNA şablonu, ileri ve

geri primerler ile SYBR Green master mix içermiştir. PCR amplifikasyonu şu döngü koşullarında gerçekleştirilmiştir: başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5 dakika, ardından 40 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 30 saniye uzama aşamalarından oluşmuştur. q-PCR analizinin grafiksel özeti Şekil 3.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 4. q-PCR çalışmamızın grafiksel özeti.

Elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak AFP ve PCNA genlerine ait primerler ile qRT-PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu için internal kontrol geni olarak ACTB kullanılmıştır. qRT-PCR analizleri sonucunda elde edilen Ct değerleri, karşılaştırmalı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve deney grupları arasındaki gen ekspresyon farklılıkları kantitatif olarak belirlenmiştir. Tablo 3.4'de gösterildiği gibi nanodrop spektrofotometrik analiz sonuçlarına göre tüm örneklerde nükleik asit saflık oranlarının birbirine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. A260/280 oranlarının ~2.0 civarında olması, örneklerin protein kontaminasyonundan büyük ölçüde arındırılmış olduğunu göstermektedir. A260/230 oranlarının 2.0–2.3 aralığında bulunması, fenol ve tuz gibi organik kontaminantların minimal düzeyde olduğunu ortaya koymaktadır. Deney grupları arasında konsantrasyon değerlerinde farklılık gözlenmesine rağmen, saflık oranlarının benzer olması, tüm örneklerin aynı izolasyon protokolü ile benzer kalite standartlarında elde edildiğini göstermektedir. Deneyde kullandığımız primerler Tablo 3.5.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Farklı hücre kombinasyonlarının nanodrop ölçümleri

Deney Grupları	ng/uL	A260/230	A260/230
Huh-7 (1)	**34.7**	**2.15**	**1.92**
Huh-7 (4)	**175.5**	**2.11**	**2.22**
Huh-7 (7)	**270.8**	**2.18**	**2.27**
Huh-7 + EA.hy926 (1)	**63.2**	**2.14**	**2.25**
Huh-7 + EA.hy926 (4)	**215.5**	**2.14**	**2.30**
Huh-7 + EA.hy926 (7)	**193.5**	**2.16**	**2.34**
Huh-7 + EA.hy926 + MKH (1)	**138.7**	**2.13**	**2.40**
Huh-7 + EA.hy926 + MKH (4)	**180.5**	**2.14**	**2.25**
Huh-7 + EA.hy926 + MKH (7)	**124.5**	**2.20**	**2.17**
Huh-7 + MKH (1)	**75.6**	**2.17**	**2.10**
Huh-7 + MKH (1)	**126.7**	**2.13**	**2.31**
Huh-7 + MKH (7)	**199**	**2.16**	**2.32**

Tablo 3.5. q-PCR'da kullanılan primerler

İleri primer	GAAGGATTCCTATGTGGGCGA	**ACTB** NM_001101.5
Geri primer	AGCTCATTGTAGAAGGTGTGGT	
İleri primer	GCTTCCAAACAAAGGCAGCA	**AFP** NM_001134.3
Geri primer	ATGGCTTGGAAAGTTCGGGT	
İleri primer	ATTTGAAGCACCAAACCAGGAG	**PCNA** NM_182649.2
Geri primer	CAGGAAATTACAACAGCATCTCCA	

Bu tez için seçilen primerler EK-1'de görüldüğü üzere tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin uzunlukları qPCR analizleri için uygun aralıkta seçilmiştir. ACTB geni için kullanılan forward primer 22 baz, reverse primer yine 22 baz uzunluğundadır. AFP geni için kullanılan forward primer 20 baz, reverse primer 20 bazdır. PCNA geni için ise forward primer 22 baz, reverse primer 24 baz uzunluğundadır. Genel olarak qPCR çalışmalarında primer uzunluğu 18–25 baz arasında tercih edilir. Bunun temel nedeni, çok kısa primerlerin hedef dışı bölgelere bağlanma riskinin artması, çok uzun primerlerin ise bağlanma verimini düşürebilmesidir. Bu çalışmada kullanılan tüm primerler bu aralıkta yer almakta olup, hem özgüllük hem de amplifikasyon verimi açısından uygun özellik

göstermektedir. Forward ve reverse primerlerin birlikte kullanılmasının nedeni, DNA polimeraz enziminin yalnızca belirli bir başlangıç noktasından itibaren yeni DNA zinciri sentezleyebilmesidir. Forward primer hedef dizinin bir ucuna bağlanırken, reverse primer karşı zincirin diğer ucuna bağlanır. Bu sayede iki primer arasında kalan spesifik bölge seçici olarak çoğaltılır. qPCR sürecinde bu primerler, cDNA üzerinde yalnızca ACTB, AFP ve PCNA genlerine ait tamamlayıcı dizilere bağlanarak amplifikasyonu başlatmaktadır. ACTB geni normalizasyon amacıyla referans gen olarak kullanılırken, AFP ve PCNA genleri hedef genler olarak analiz edilmiştir. Primer tasarımında yalnızca hedef gene özgü bölgelerin seçilmesi büyük önem taşır. Bunun yanı sıra uygun primer uzunluğu, dengeli GC içeriği, benzer erime sıcaklıkları ve ikincil yapı oluşumunun engellenmesi gibi faktörler de dikkate alınmıştır. Genellikle primerlerin GC içeriği %40–60 aralığında seçilerek hedef DNA'ya stabil bağlanma sağlanır. Ayrıca forward ve reverse primerlerin erime sıcaklıklarının (Tm) birbirine yakın olması gerekir; çoğunlukla 55–65 °C aralığında ve aralarındaki fark 1–2 °C'yi geçmeyecek şekilde tasarlanır. Bu sayede annealing aşamasında her iki primerin de aynı koşullarda verimli şekilde bağlanması mümkün olur.

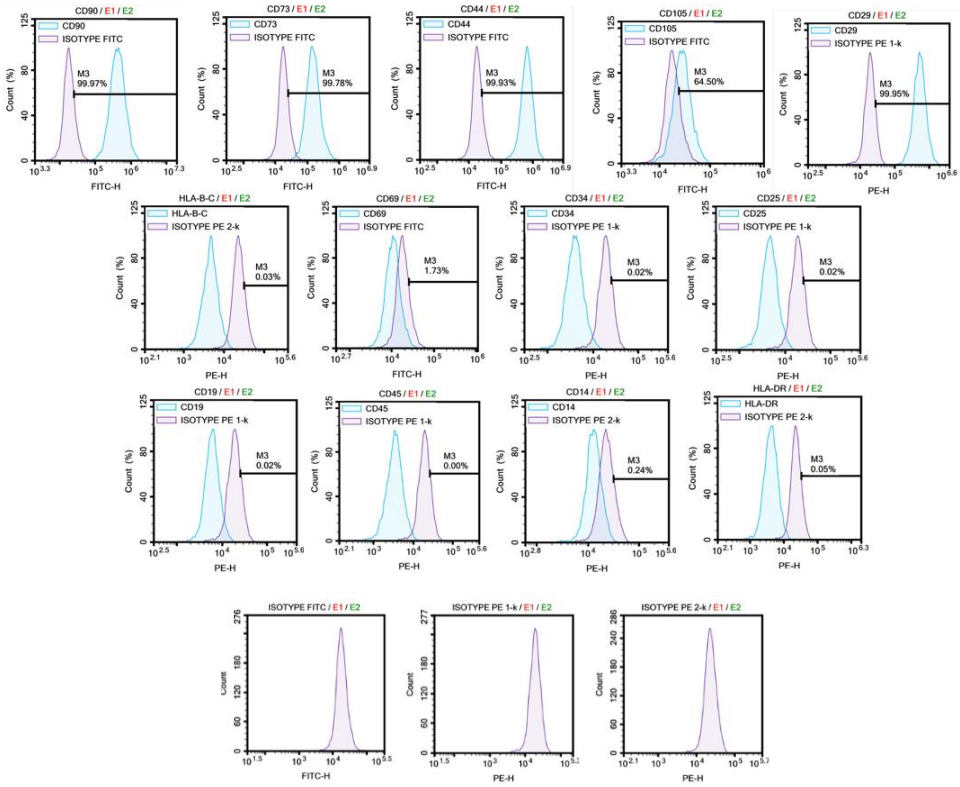
3.8. İstatiksel Analiz

Her deney en az üç kez tekrar edilmiştir. Araştırma verileri, standart sapma (± SD) dikkate alınarak sunulmuştur. Deney sürecinde grup içi ve gruplar arasındaki farklılıklar gibi tüm aşamalarda elde edilen verilerin analizi uygun istatistiksel yöntemlerle, örneğin tek değişkenli istatistikler, iki değişkenli ilişkiler ve grafiksel yöntemler kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. iWJ-MKH'lerin Flow Sitometri Karakterizasyonu

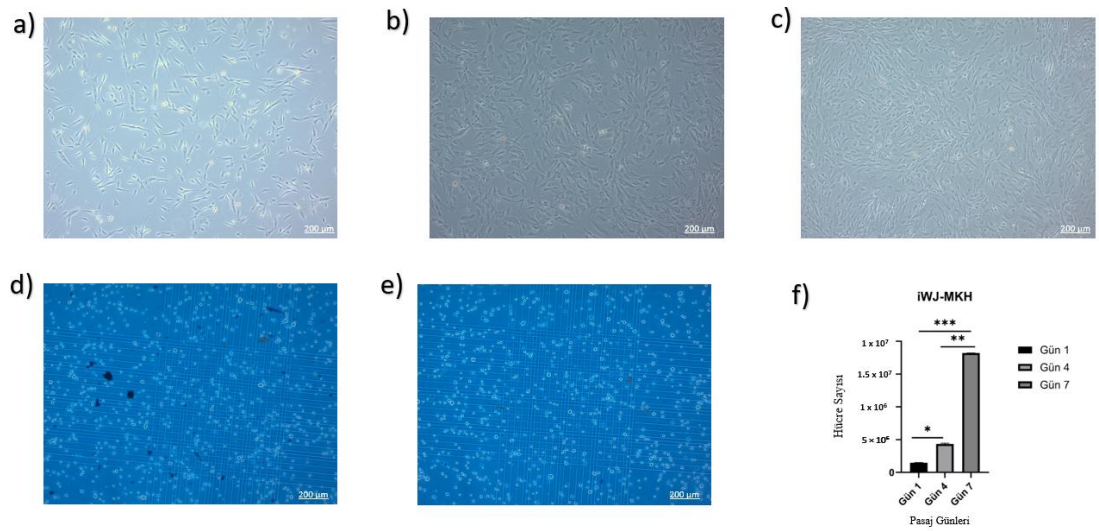
İzole edilen dokular kültüre alındıktan sonra hücresel aktivite, günlük olarak invert faz kontrast mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında, eksplant yöntemiyle gerçekleştirilen izolasyon sonrası ilk hücre çıkışı 17. günde gözlemlenmiştir. Kültürde gelişim gösteren hücrelerin fibroblast-benzeri morfolojide, iğ ya da yıldızsı yapıda olduğu belirlenmiştir. Gözlemler, Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunda kullanılan yöntemin, hücre çıkış süresi ve morfolojik özellikler üzerinde belirleyici rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Şekil 4.1.'de gösterildiği gibi iWJ-MKH'lerin immunofenotipik olarak karakterize edilmiştir. CD105 pozitifliği %64.50, CD90 pozitifliği %99.97, CD73 %99.78; CD44 %99.93, CD29 %99.95 HLA-A-B-C %0.03, negatifliği CD69 %1.73, CD45 %0.00, CD25 %0.02, CD34 %0.02, CD19 %0.02, HLA-DR %0.05, CD14 % 0.24 olarak belirlendi. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. iWJ-MKH'lerin immunofenotipik olarak karakterize edilmesi. 3.pasaj'da iWJ-MKH'lerin flow sitometri ile karakterizasyonu.

4.2. iWJ-MKH'lerin Canlılık ve Proliferasyon Analiz Değerlendirilmesi

Kriyoprezervasyondan sonra yeniden canlandırılan iWJ-MKH'lerin morfolojik özellikleri, canlılıkları ve çoğalma kapasiteleri değerlendirilmiştir. Hücrelerin kültüre alınmasını takiben 2, 3. ve 4. günlerde elde edilen mikroskobik görüntüler incelendiğinde, hücrelerin plastik yüzeye başarılı şekilde tutunduğu ve karakteristik fibroblast benzeri iğsi morfolojilerini koruduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2.). İlk gün görüntülerinde hücrelerin kültür yüzeyine yeni adapte olduğu, hücre yoğunluğunun düşük olduğu, kültür alanının sınırlı bir kısmını kapladığı ve %25-30 konfluens düzeyinde olduğu görülmüştür. Dördüncü günde hücre sayısında belirgin artış meydana gelmiş, hücrelerin çoğalarak daha geniş alanları kapladığı ve konfluensinin %55 olduğu gözlenmiştir. Yedinci gün görüntülerinde ise hücrelerin yüksek yoğunluğa ulaştığı, kültür yüzeyinin büyük kısmını kapladığı ve yaklaşık %80-85 konfluens düzeyine eriştiği belirlenmiştir. Bu bulgular, hücrelerin çözündürme işlemi sonrasında proliferatif özelliklerini koruduğunu göstermektedir. 1 ve 2. pasaj zamanı hücreler tripsinizasyon ile flask yüzeyinden kaldırılmış ve Trypan Blue boyama yöntemi kullanılarak Thoma lamında sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Sayım sonucunda canlı hücrelerin boyayı dışladığı, ölü hücrelerin ise mavi renkte boyandığı gözlenmiştir. Mikroskobik incelemelerde canlı hücre oranının yüksek olduğu ve hücre popülasyonunun sağlıklı bir şekilde çoğalmaya devam ettiği belirlenmiştir. Grafik sonuçları değerlendirildiğinde, hücre sayısının kültür süresi boyunca istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görülmektedir. Birinci günde yaklaşık $1,3 \times 10^6$ hücre bulunan kültürde, dördüncü günde hücre sayısı yaklaşık $4,7 \times 10^6$'ya yükselmiştir. Yedinci günde ise hücre sayısı yaklaşık $18,5 \times 10^6$'ye ulaşmıştır. Birinci ve dördüncü günler arasındaki artışın istatistiksel olarak oldukça anlamlı olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde dördüncü ve yedinci günler arasındaki artış ile birinci ve yedinci günler arasındaki artışın da anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kriyoprezervasyondan sonra yeniden canlandırılan MKH'lerin yüksek canlılık oranına sahip olduğunu, kültür ortamına başarıyla adapte olduğunu ve zamanla güçlü bir proliferasyon kapasitesi gösterdiğini ortaya koymaktadır. Hücre sayısında gözlenen yaklaşık 18 katlık artış, kullanılan kültür koşullarının hücre büyümesi için uygun olduğunu ve sonraki deneysel çalışmalar için yeterli sayıda canlı hücre elde edildiğini göstermektedir.



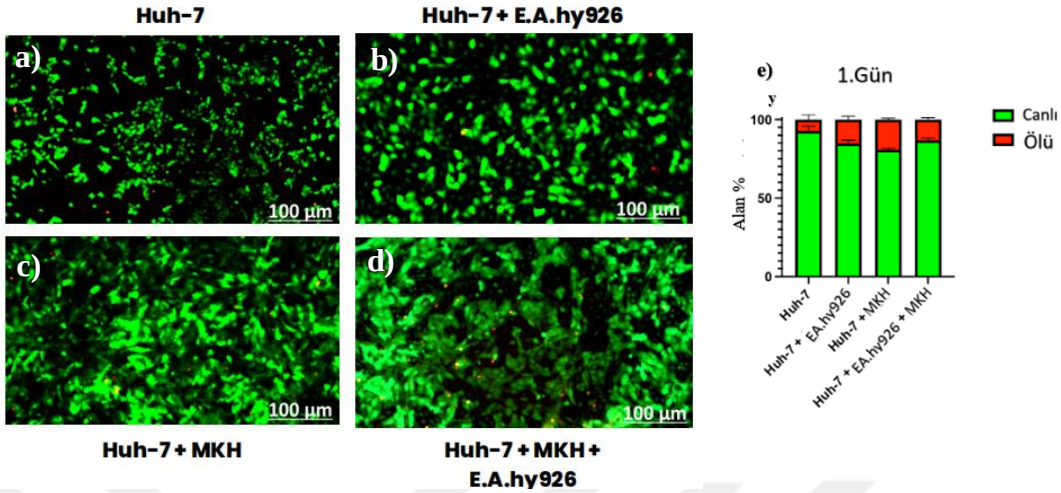
Şekil 4. 2. Çözülen V4P4 MKH'lerin morfolojik kontrollerinden elde edilen faz kontrast mikroskobik görüntüleri. a) MKH hücrelerinin 2. gün mikroskopik görüntüsü b) MKH hücrelerinin 3. gün mikroskopik görüntüleri c) 4. gün mikroskopik görüntüsü. d) ve e) Çözülen hücrelerin canlılık analizi için thoma lamı üzerine alınmış ve Tripan blue ile boyanmış ışık mikroskopik örnek görüntüleri. f) Çözülen MKH' lerin çözündürme işlemi sonrasındaki hücre sayıları ile 1. ve 2. pasajlar sonrasında elde edilen hücre miktarları değerlendirilmiştir.

4.3. Canlı–ölü Boyama ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Şekil 4.3.'de sunulan canlı/ölü hücre boyama analizine ait 1.gün verileri incelendiğinde, tüm deney gruplarında genel olarak yüksek hücre canlılık oranlarının korunduğu görülmektedir. En yüksek canlılık düzeyinin Huh-7 grubunda olduğu belirlenmiştir. Huh-7 + EA.hy926 ko-kültür grubunda canlılık oranının Huh-7 grubuna kıyasla hafif bir azalma gösterdiği gözlenmekle birlikte, bu azalmanın istatistiksel veya biyolojik açıdan anlamlı olmadığı anlaşılmaktadır. Huh-7 + MKH grubunda da benzer şekilde sınırlı bir canlılık azalması tespit edilmiş olup, üçlü ko-kültür modeli olan Huh-7 + MKH + EA.hy926 grubunun canlılık düzeyinin Huh-7 + EA.hy926 grubu ile büyük ölçüde benzerlik gösterdiği görülmüştür.

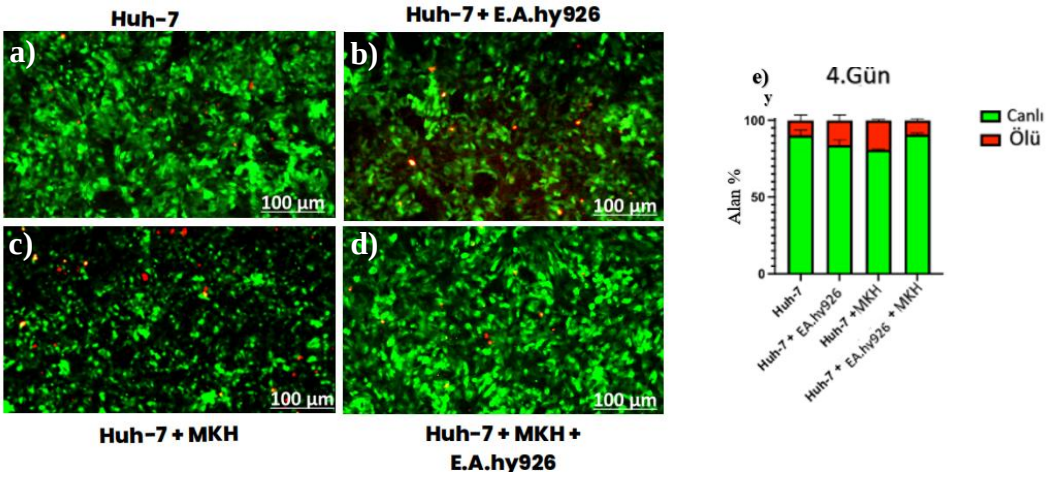
Genel olarak değerlendirildiğinde, elde edilen bulgular gruplar arasında belirgin bir sitotoksik etkinin bulunmadığını ve farklı hücre kombinasyonlarının erken kültür döneminde hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, oluşturulan ko-kültür modellerinin 1.gün

koşullarında hücre yaşamını desteklediğini ve deneysel sistemin biyouyumluluk açısından uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 3. Farklı hücre kombinasyonlarının 1.gün canlı/ölü analiz sonuçları. a) Huh-7, b) Huh-7 + EA.hy926, c) Huh-7 + MKH ve d) Huh-7 + EA.hy926 + MKH, e) 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği, y ekseni Alan%.

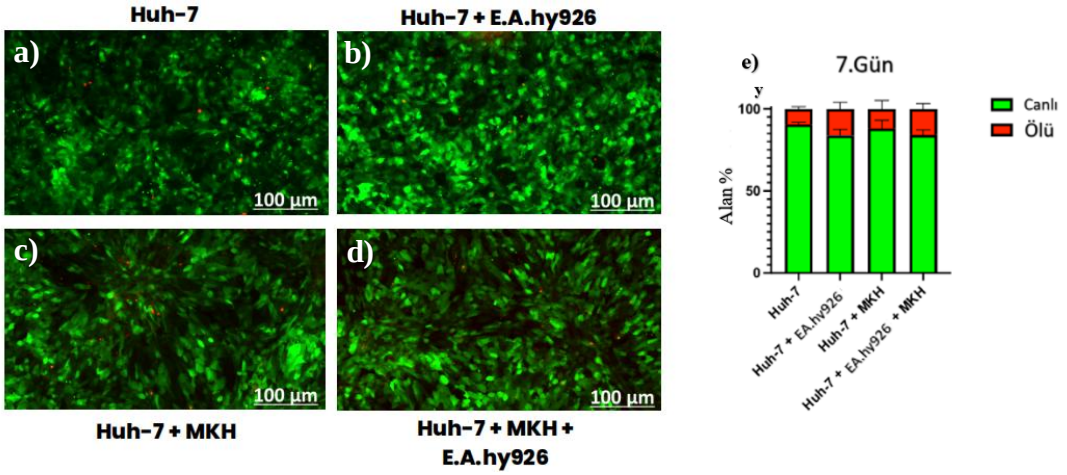
Şekil 4. 4.'te sunulan canlı/ölü hücre boyama sonuçlarına ait 4. güne ilişkin grafiği incelendiğinde, 1. güne kıyasla bazı gruplarda sınırlı düzeyde azalma olduğu gözlenmiştir. Huh-7 grubu ile üçlü ko-kültür grubunun canlı hücre oranlarının birbirine oldukça benzer olduğu ve yüksek seviyede korunduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, Huh-7 + EA.hy926 ve Huh-7 + MKH gruplarında canlılık oranının nispeten daha düşük olduğu dikkat çekmektedir. Üçlü ko-kültür grubu Huh-7 + EA.hy926 + MKH ise yüksek canlılık oranı hücreler arası etkileşimlerin zamanla dengeleyici bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Genel değerlendirmede, 4. günde de tüm gruplarda hücre canlılığının büyük ölçüde bir-birine benzer olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 4. Farklı hücre kombinasyonlarının 4.gün canlı/ölü analiz sonuçları. a) Huh-7, b) Huh-7 + EA.hy926, c) Huh-7 + MKH ve d) Huh-7 + EA.hy926 + MKH, e) 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği, y ekseni Alan%.

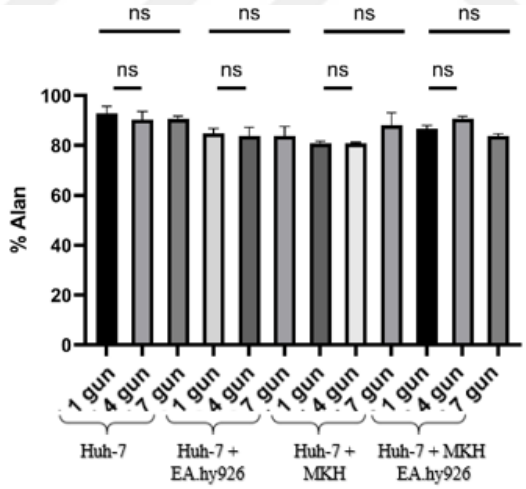
Şekil 4.5.'de sunulan canlı/ölü hücre boyama sonuçlarına ait 7. güne ilişkin grafik incelendiğinde, tüm deney gruplarında canlı hücrelerin büyük ölçüde varlığını sürdürdüğü, Huh-7 kontrol grubunda canlılık oranı diğer gruplara kıyasla daha yüksek seviyede korunurken, Huh-7 + EA.hy926 grubunda canlı hücre oranının nispeten daha düşüktür. Huh-7 + MKH grubunda canlılık oranının Huh-7 grubuna yakın olduğu, üçlü ko-kültür grubunda Huh-7 + EA.hy926 + MKH ise canlılık düzeyinin Huh-7 + EA.hy926 grubuna benzer şekilde seyrettiği görülmektedir.

Genel olarak 1., 4. ve 7. günleri bir-birleri ile karşılaştırdığımızda bütün günlerde Huh-7 grubunda yüksek canlılık gözlemlendiğini, Huh-7 + EA.hy926 grubunda her 3 günde Huh-7'e rağmen hafif azaldığını, Huh-7 + MKH grubunda 1. ve 4. günde azalma gözlemlensede 7. günde Huh-7 ile benzer canlılık oranı gözlemlenmektedir. Sonra olarak üçlü ko-kültür grubuna baktığımızda en yüksek canlılık 4.günde en az canlılık ise 7. günde görülmüktedir ancak yine de bütün deney gruplarının canlı/ölü analiz sonuçları %80 ve üzeri olduğu ve birbirine yakın gözükmektedir.



Şekil 4. 5. Farklı hücre kombinasyonlarının 7.gün canlı/ölü analiz sonuçları. a) Huh-7, b) Huh-7 + EA.hy926, c) Huh-7 + MKH ve d) Huh-7 + EA.hy926 + MKH, e) 7.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği, y ekseni Alan%.

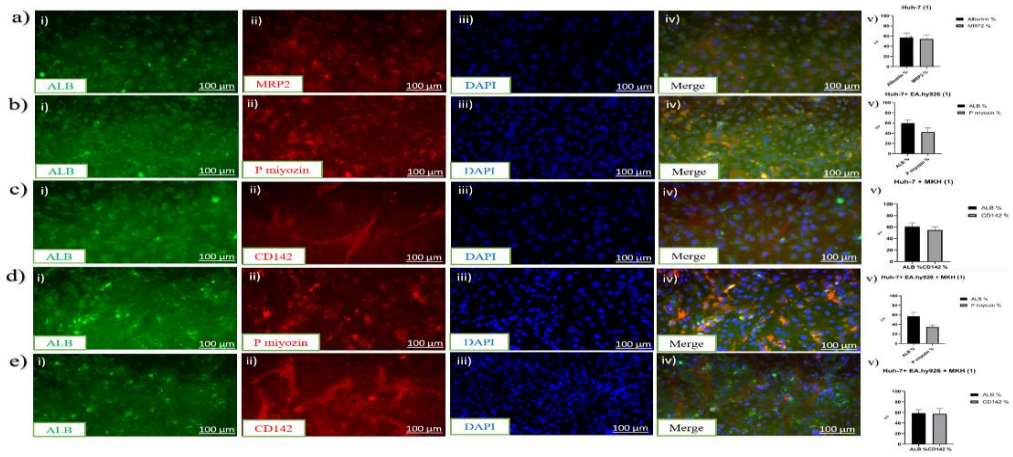
Şekil 4. 6.'te tüm zaman noktalarına ait verilerin birlikte sunulduğu grafik yer almaktadır. Elde edilen sonuçlara göre, tüm deney gruplarında ve tüm zaman noktalarında hücre canlılığının yüksek düzeyde korunduğu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4. 6. Deney gruplarının ko-kültür modellerinde canlı/ölü analiz sonuçlarının karşılaştırılması.

4.4. İmmünofloresan Analiz Sonuçları

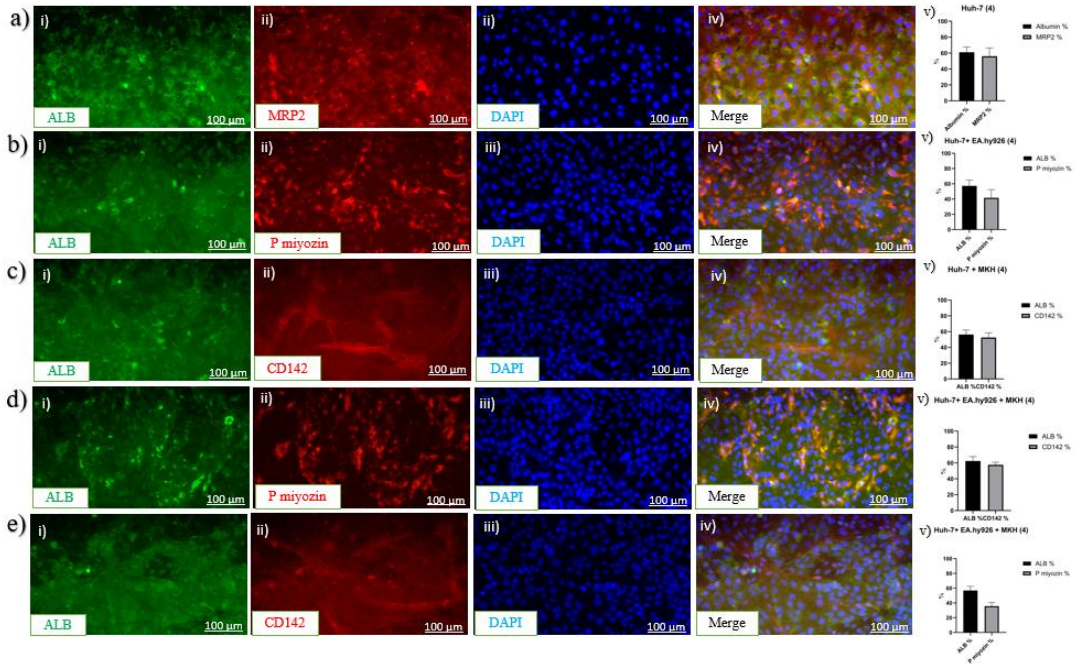
Şekil 4.7.'da immunofloresan boyama sonuçlarına ait 1.güne ilişkin grafik incelendiğinde görüldüğü gibi Huh-7 grubunda, ALB ve MRP2 ekspresyonlarının yüksek düzeyde olduğu ve hücrelerin hepatosit benzeri özelliklerini koruduğu belirlenmiştir. Huh-7 + EA.hy926 grubunda ise, ALB ekspresyonunun yüksek devam ettiği, ancak P miyozin ekspresyonunun nispeten daha düşük olduğu görülmüştür. Huh-7 + MKH grubunda ALB ve CD142 ekspresyonlarının benzer seviyelerde dağılım gösterdiği gözlemlenmektedir. Üçlü ko-kültür grubu ise CD142 ve P miyozin ile boyanmıştır. Bu grupta ALB ve CD142 ekspresyonlarının yüksek olduğu, P miyozin ekspresyonunun ise daha düşük seviyede kaldığı görülmektedir. Genel olarak, 1. gün sonuçları tüm gruplarda incelenen markerların varlığını ortaya koymakta ve farklı hücre tiplerine ait belirteçlerin birlikte görüntülenebildiğini göstermektedir.



Şekil 4. 7. Hücre kombinasyonlarının İF boyama ile elde edilen 1.gün floresan mikroskop görüntüleri. (a) Huh-7 ALB (i) + MRP2 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), (b) Huh-7 + EA.hy926 ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), c) Huh-7 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), d) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), e) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 1.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v) hücre gruplarını kapsamaktadır.

Şekil 4.8.'de sunulan immünofloresan analiz sonuçlarına ait 4.gün grafiklerine göre, tüm deney gruplarında hücresel belirteç ekspresyonlarının genel olarak korunduğu gözlemlenmiştir. Huh-7 grubunda ALB ve MRP2 ekspresyonlarının yüksek ve birbirine yakın seviyelerde devam ettiği, bu durumun hepatosit benzeri fenotipin sürdürüldüğünü desteklediği görülmektedir. Huh-7 + EA.hy926 ko-kültür grubunda ALB ekspresyonunun korunduğu, buna karşın P miyozin ekspresyonunun ALB'ye kıyasla daha düşük düzeyde olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, hücresel yapı ve kontraktil protein ekspresyonunda sınırlı bir farklılaşmaya işaret edebilir. Huh-7 + MKH grubunda ALB ve CD142 ekspresyonlarının birbirine yakın seviyelerde seyrettiği gözlenmiştir. Bu bulgu, her iki markerın da 4. günde stabil şekilde ifade edildiğini göstermektedir. Üçlü ko-kültür grubunda (Huh-7 + EA.hy926 + MKH), ALB ekspresyonunun her iki analizde de benzer düzeylerde korunduğu görülmektedir. CD142 ekspresyonunun ALB ile yakın seviyede olduğu, buna karşılık P miyozin ekspresyonunun ALB'ye göre daha düşük kaldığı dikkat çekmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, 4.günde tüm gruplarda hücresel fenotipin büyük ölçüde korunduğu, ancak özellikle ko-kültür gruplarında bazı markerlar arasında relatif ekspresyon farklılıklarının ortaya çıktığı görülmektedir.

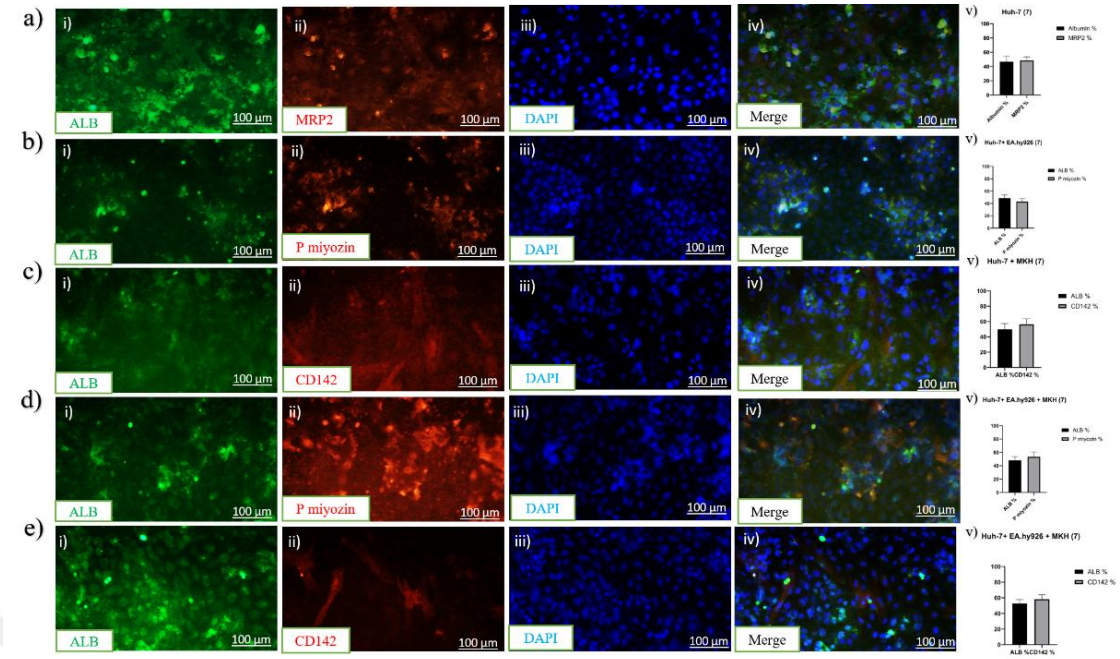


Şekil 4. 8. Hücre kombinasyonlarının İF boyama ile elde edilen 4.gün floresan mikroskop görüntüleri. (a) Huh-7 ALB (i) + MRP2 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), (b) Huh-7 + EA.hy926 ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), c) Huh-7 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), d) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), e) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 4.gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v) hücre gruplarını kapsamaktadır.

Şekil 4.9.'de sunulan immünofloresan analiz sonuçlarına ait 7.gün grafiklerine göre, tüm deney gruplarında hücresel marker ekspresyonlarının genel olarak korunduğu, ancak gruplar arasında ekspresyon düzeylerinde sınırlı farklılıklar bulunduğu gözlemlenmiştir. Huh-7 grubunda ALB ve MRP2 ekspresyonlarının benzer düzeylerde devam ettiği, ancak önceki zaman noktalarına kıyasla her iki markerda da hafif bir azalma eğilimi olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, uzun süreli kültürde hücresel fonksiyonların kısmen zayıflayabileceğine işaret etmektedir. Huh-7 + EA.hy926 ko-kültür grubunda ALB ve P miyozin ekspresyonlarının korunduğu ve birbirine yakın seviyelerde seyrettiği görülmektedir. Bu bulgu, endotelyal hücre varlığının hepatosit benzeri hücrelerin yapısal ve fonksiyonel

stabilitesini desteklediğini düşündürmektedir. Huh-7 + MKH grubunda ise CD142 ekspresyonunun ALB'ye kıyasla nispeten daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum, mezenkimal kök hücrelerin ko-kültür ortamında hücreler arası sinyalizasyonu ve mikroçevre etkileşimlerini artırabileceğini göstermektedir. Üçlü ko-kültür grubunda (Huh-7 + EA.hy926 + MKH) ALB ekspresyonunun sürdüğü, buna ek olarak CD142 ve P miyozin ekspresyonlarının birlikte ve dengeli bir şekilde ifade edildiği belirlenmiştir. Bu yapı, daha kompleks hücresel etkileşimlerin bulunduğu bir mikroçevrede fenotipik özelliklerin daha bütüncül şekilde korunduğunu göstermektedir.

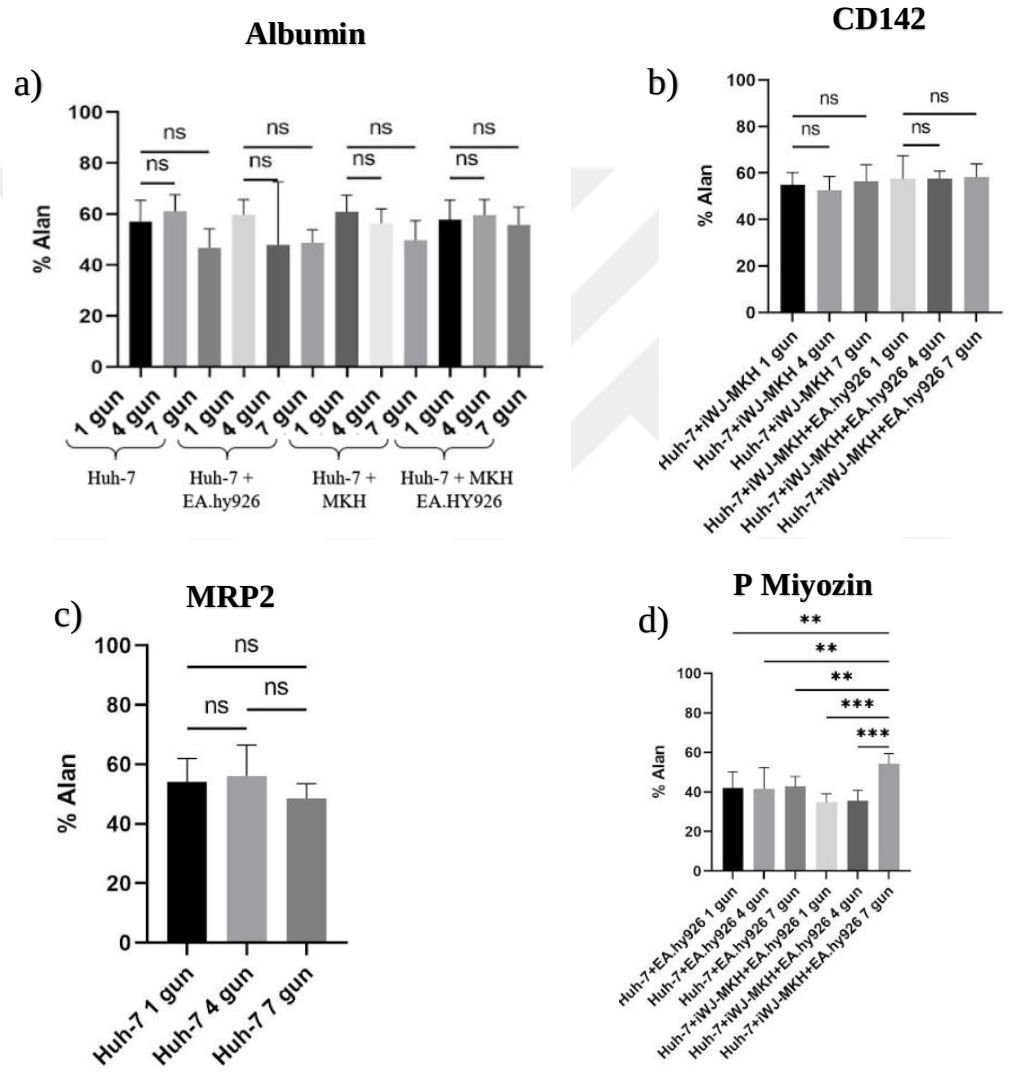
Genel olarak değerlendirildiğinde, 7. günde tüm gruplarda hücresel fenotipin büyük ölçüde korunduğu, ancak kültür süresinin uzamasına bağlı olarak mikroçevresel faktörler yani, hücre yoğunluğu, besin dağılımı ve hücreler arası rekabet nedeniyle marker ekspresyonlarında hafif düzeyde değişiklikler meydana geldiği sonucuna varılmaktadır.



Şekil 4. 9. Hücre kombinasyonlarının İF boyama ile elde edilen 7. gün floresan mikroskop görüntüleri. (a) Huh-7 ALB (i) + MRP2 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7. gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), (b) Huh-7 + EA.hy926 ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7. gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), c) Huh-7 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7. gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), d) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + P miyozin (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7. gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v), e) Huh-7 + EA.hy926 + MKH ALB (i) + CD142 (ii), DAPI (iii), merge (iv), 7. gün deney gruplarının karşılaştırmalı grafiği (v) hücre gruplarını kapsamaktadır.

Şekil 4.10.'da farklı ko-kültür modellerinde Albümin, CD142, MRP2 ve P miyozin ekspresyonlarının zamana bağlı değişimi karşılaştırılmıştır. Albümin ekspresyonunun tüm gruplarda ve zaman noktalarında benzer düzeylerde seyrettiği ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmektedir (ns). Benzer şekilde, CD142 ekspresyonu da hem farklı ko-kültür modelleri hem de zaman noktaları arasında anlamlı bir değişim göstermemiştir (ns). MRP2 ekspresyonunda 1., 4. ve 7.günler arasında sınırlı dalgalanmalar gözlenmesine rağmen, bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (ns). Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, Albümin, CD142 ve MRP2 belirteçlerinin farklı ko-kültür koşullarında ve zaman noktalarında genel olarak stabil bir

ekspresyon profili sergilediği anlaşılmaktadır. Buna karşılık, P miyozin ekspresyonunda diğer belirteçlerden farklı bir eğilim gözlenmiştir. İkili ko-kültür grubunda P miyozin düzeylerinin zaman boyunca benzer kaldığı görülürken, üçlü ko-kültür grubunda 1. ve 4.günlerde daha düşük seviyelerde olan ekspresyonun 7. günde belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. Özellikle 7. gün üçlü ko-kültür grubunun, diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek P miyozin ekspresyonuna sahip olduğu görülmektedir (**p < 0.01, ***p < 0.001).

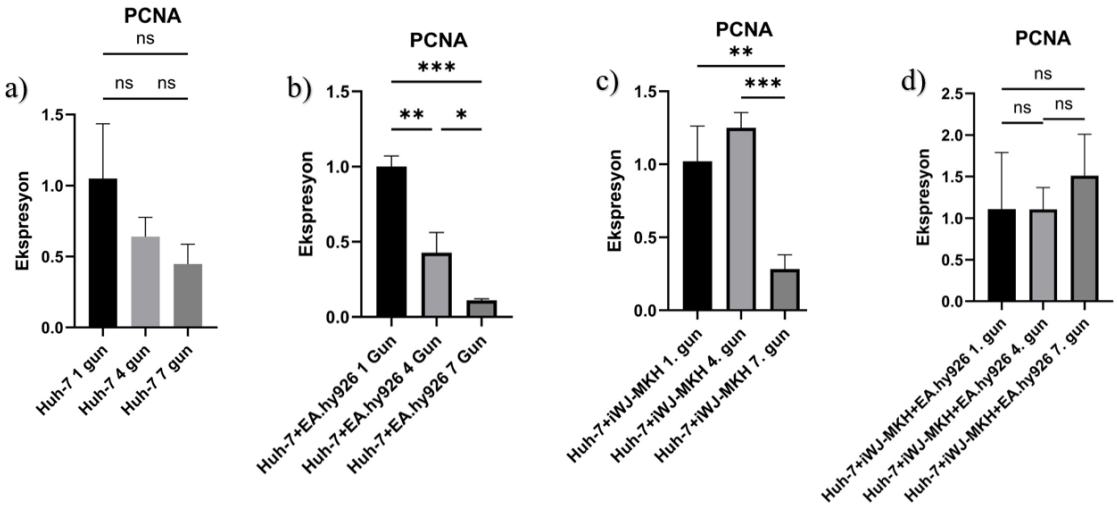


Şekil 4. 10. Farklı ko-kültür modellerinde a) Albümin, b) CD142, c) MRP2 d) P miyozin ekspresyonları grafikleri.

4.5. Gen Ekspresyonu Analizleri (AFP ve PCNA)

Şekil 4.11.'da PCNA gen ekspresyonunun farklı kültür gruplarında 1., 4. ve 7.günlerdeki değişimi değerlendirilmiştir. Huh-7 tekli kültür grubunda PCNA ekspresyonunun zamanla azalma eğilimi gösterdiği görülmekle birlikte, bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (ns). Huh-7 + EA.hy926 ko-kültür grubunda ise PCNA ekspresyonu zamanla belirgin şekilde azalmıştır. Özellikle 1.gün ile 4.gün ve 1.gün ile 7.gün arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$). Bu sonuç, EA.hy926 hücreleri ile oluşturulan ko-kültür koşullarında proliferatif aktivitenin zamanla azaldığını göstermektedir. Huh-7 + MKH grubunda PCNA ekspresyonu 4.günde 1.güne kıyasla artış gösterirken, 7.günde belirgin şekilde azalmıştır. Özellikle 4.gün ile 7.gün arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir (**$p < 0.01$, ***$p < 0.001$). Bu bulgu, MKH varlığında proliferatif aktivitenin erken dönemde artabileceğini, ancak uzun süreli kültürde azalma eğilimine girdiğini düşündürmektedir. Üçlü ko-kültür grubunda ise PCNA ekspresyonunun 1., 4. ve 7.günler arasında sınırlı değişiklik gösterdiği ve bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (ns).

Genel olarak değerlendirildiğinde, PCNA ekspresyonu tekli kültür ve üçlü ko-kültür gruplarında belirgin bir zamana bağlı değişim göstermezken, ikili ko-kültür gruplarında daha belirgin olarak gözlenmiştir. Özellikle Huh-7 + EA.hy926 grubunda zamanla azalma, Huh-7 + MKH grubunda ise 4.günde artış ve 7.günde düşüş eğilimi dikkat çekmektedir. Bu sonuçlar, hücresel mikroçevrenin PCNA ekspresyonu ve proliferatif aktivite üzerinde hücre kombinasyonuna bağlı farklı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir.

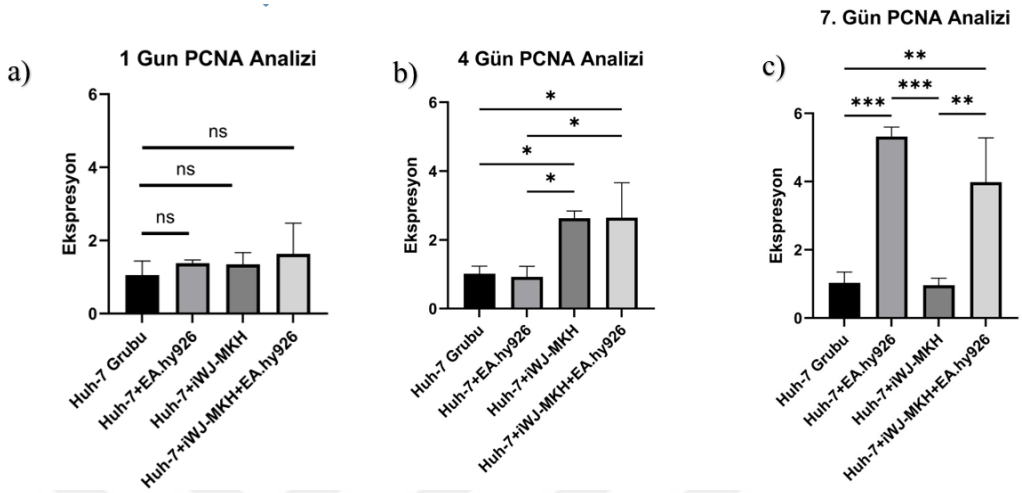


Şekil 4. 11. Gerçek zamanlı PCR analizi ile PCNA gen ekspresyonunun her bir deney grubunda 1., 4. ve 7.günlere göre değerlendirilmesi. a) Huh-7 grubu, b) Huh-7 + EA.hy926 grubu, c) Huh-7 + MKH grubu, d) Huh-7 + MKH + EA.hy926 grubu.

Gerçek zamanlı PCR analizi ile PCNA gen ekspresyonunun 1., 4. ve 7.günlerde farklı deney grupları arasında karşılaştırılması Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. 1.günde gruplar arasında PCNA ekspresyonu açısından belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum, erken kültür döneminde proliferatif aktivitenin tüm gruplarda benzer düzeylerde olduğunu göstermektedir. 4.günde ise Huh-7 + MKH ve üçlü ko-kültür gruplarında PCNA ekspresyonunun Huh-7 ve Huh-7 + EA.hy926 gruplarına kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olması, özellikle MKH içeren ko-kültür koşullarında proliferatif aktivitenin bu zaman noktasında desteklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. 7.günde PCNA ekspresyonunda daha belirgin grup farklılıkları ortaya çıkmıştır. Huh-7 + EA.hy926 grubunda PCNA ekspresyonunun en yüksek seviyeye ulaştığı, üçlü ko-kültür grubunda da yüksek düzeyde seyrettiği görülmektedir. Buna karşılık Huh-7 ve Huh-7 + MKH gruplarında ekspresyon daha düşük kalmıştır. Bu bulgular, 7.günde özellikle EA.hy926 içeren ko-kültür modellerinde proliferatif aktivitenin daha belirgin olduğunu göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, PCNA ekspresyonu 1.günde gruplar arasında benzer düzeylerdeyken, 4. ve 7.günlerde hücre kombinasyonuna bağlı

farklılıklar ortaya çıkmıştır. Özellikle MKH içeren gruplarda 4.günde, EA.hy926 içeren gruplarda ise 7.günde PCNA ekspresyonunun daha yüksek olması, ko-kültür mikroçevresinin proliferasyon dinamiklerini zamana ve hücre tipine bağlı olarak etkileyebileceğini göstermektedir.

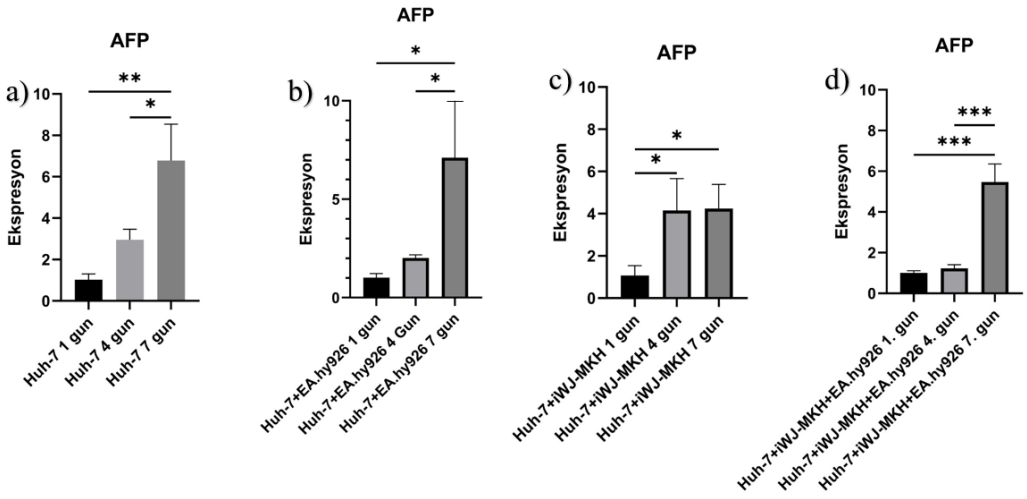


Şekil 4. 12. Gerçek zamanlı PCR analizi ile PCNA gen ekspresyonunun 1., 4. ve 7.günlerde farklı deney grupları arasında karşılaştırılması. a) 1.gün PCNA gen ekspresyonu, b) 4.gün PCNA gen ekspresyonu, c) 7. Gün PCNA gen ekspresyonu. Ekspresyon düzeyleri referans grup olarak Huh-7'e göre normalize edilerek relatif olarak ifade edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ns: anlamsız).

Şekil 4.13.'de Gerçek zamanlı PCR analizi ile AFP gen ekspresyonunun 1., 4. ve 7.günlerde farklı kültür gruplarında zamana bağlı değişimi değerlendirilmiştir. Huh-7 tekli kültür grubunda AFP ekspresyonunun 1.günden 7.güne doğru kademeli olarak arttığı görülmektedir. Özellikle 4. gün ve 7.gün değerlerinin 1.güne kıyasla daha yüksek olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu durum, zamanla AFP gen ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Huh-7 + EA.hy926 ko-kültür grubunda da benzer bir eğilim gözlenmiştir. AFP ekspresyonunun 1.günde düşük seviyede olduğu, 4.günde arttığı ve 7.günde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir. 1.gün ile 7.gün arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olması, bu grupta AFP ekspresyonunun zamana bağlı olarak arttığını ortaya koymaktadır. Huh-7 + MKH grubunda AFP ekspresyonunun 4.günde belirgin şekilde yükseldiği ve 7.günde bu yüksek seviyenin devam ettiği görülmektedir. 1.gün ile sonraki günler arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olması, MKH

içeren ko-kültür koşullarında AFP ekspresyonunun erken dönemde arttığını göstermektedir. Üçlü ko-kültür grubunda (Huh-7 + EA.hy926 + MKH) AFP ekspresyonunun 1. ve 4.günlerde nispeten düşük seviyelerde olduğu, ancak 7.günde belirgin bir artış gösterdiği görülmektedir. Özellikle 7.gün değerinin diğer zaman noktalarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olması, bu grupta AFP ekspresyonunun geç dönemde belirgin şekilde arttığını göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, AFP ekspresyonunun tüm gruplarda zamanla artış eğilimi gösterdiği, ancak bu artışın hücre kombinasyonuna bağlı olarak farklı zaman noktalarında daha belirgin hale geldiği anlaşılmaktadır. Ko-kültür sistemlerinde gözlenen yüksek ekspresyon düzeyleri, hücre ve mikroçevrenin AFP gen ekspresyonunu artırıcı yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir.

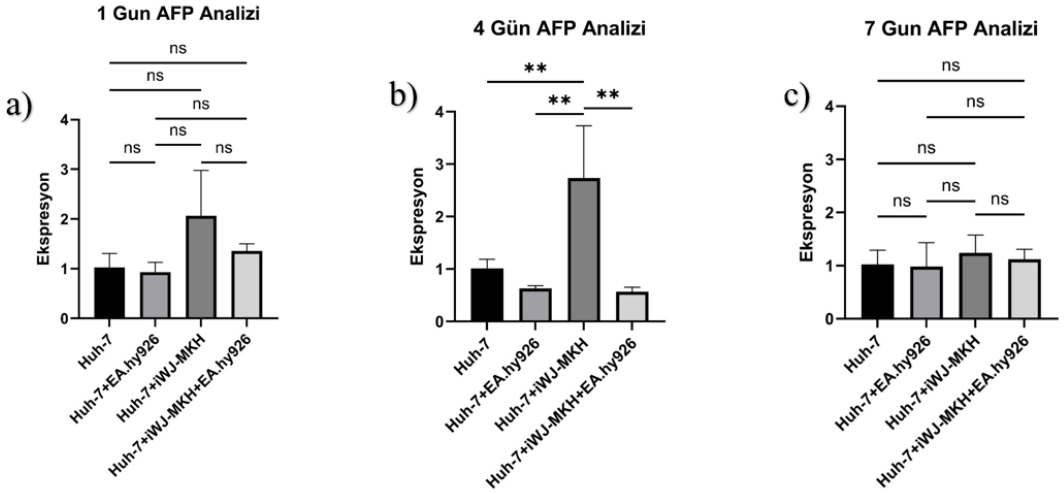


Şekil 4. 13. Gerçek zamanlı PCR analizi ile AFP gen ekspresyonunun her bir deney grubunda 1., 4. ve 7.günlere göre değerlendirilmesi. a) Huh-7 grubu, b) Huh-7 + EA.hy926 grubu, c) Huh-7 + MKH grubu, d) Huh-7 + MKH + EA.hy926 grubu

Gerçek zamanlı PCR analizi ile AFP gen ekspresyonunun 1., 4. ve 7.günlerde farklı deney grupları arasında karşılaştırılması Şekil 4.14'de gösterilmiştir. 1.günde gruplar arasında AFP ekspresyonu açısından belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Tüm gruplarda ekspresyon düzeylerinin birbirine yakın olduğu ve karşılaştırmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir (ns). Bu durum, erken dönemde hücre kombinasyonlarının AFP ekspresyonu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığını göstermektedir. 4.günde ise gruplar arasında anlamlı

farklılıklar ortaya çıkmıştır. Özellikle Huh-7 + MKH grubunda AFP ekspresyonunun diğer gruplara kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir (**p < 0.01). Buna karşılık Huh-7, Huh-7 + EA.hy926 ve üçlü ko-kültür gruplarında AFP ekspresyonunun daha düşük seviyelerde kaldığı dikkat çekmektedir. Bu bulgu, 4. günde MKH içeren ko-kültür koşullarının AFP ekspresyonunu artırıcı yönde etkileyebileceğini göstermektedir. 7.günde gruplar arasında AFP ekspresyon düzeylerinde kısmi artış ve azalışlar gözlenmekle birlikte, bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (ns). Bu durum, gruplar arasında sayısal farklılıklar bulunsa da bu değişimlerin biyolojik olarak belirgin bir ayrışmaya işaret etmediğini göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, AFP ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar yalnızca 4.günde gözlenmiş olup, bu farkın özellikle Huh-7 + MKH grubundan kaynaklandığı görülmektedir. Diğer zaman noktalarında ise hücre kombinasyonlarının AFP ekspresyonu üzerinde belirgin bir farklılaştırıcı etkisi bulunmamaktadır.



Şekil 4. 14. Gerçek zamanlı PCR analizi ile AFP gen ekspresyonunun 1., 4. ve 7. günlerde farklı deney grupları arasında karşılaştırılması. a) 1. gün AFP gen ekspresyonu, b) 4. gün AFP gen ekspresyonu, c) 7. gün AFP gen ekspresyonu. Ekspresyon düzeyleri referans grup olarak Huh-7'e göre normalize edilerek relatif olarak ifade edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ns: anlamsız).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada geliştirilen 3 boyutlu ko-kültür modellerinin Huh-7 hücreleri üzerindeki etkileri, hücre canlılığı, fenotipik özellikler, hücresel organizasyon ve gen ekspresyon profilleri açısından kapsamlı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, hücresel davranışın yalnızca zamanla değil, aynı zamanda mikroçevrenin yapısal ve hücresel kompleksliği ile doğrudan ilişkili olduğunu açık şekilde ortaya koymaktadır. Literatürde, çok hücreli 3B organoid sistemlerinin hücreler arası etkileşimleri artırarak daha heterojen ve fizyolojik olarak anlamlı mikroçevreler oluşturduğu, bu sayede hücresel fonksiyonların, proliferasyonun ve tümör benzeri davranışların daha gerçekçi şekilde gözlemlenebildiği bildirilmiştir (El-Defy et al., 2024). Bu çalışmada da özellikle ko-kültür ve üçlü kültür sistemlerinde hücrelerin daha organize ve kompleks yapılar oluşturduğu gözlenmiş olup, bu durum söz konusu literatür bulgularını desteklemektedir.

Tekli Huh-7 kültür modeli incelendiğinde, 1. günde elde edilen %92.75 canlılık oranı hücrelerin 3B ortama hızlı ve başarılı bir şekilde adapte olduğunu göstermektedir. Bu yüksek canlılık oranı, hücrelerin erken dönemde belirgin bir stres yanıtı göstermediğini ve mikroçevre ile uyumlu bir şekilde etkileşime girdiğini düşündürmektedir. İmmünofloresan analizlerinde saptanan ALB ve MRP2 pozitiflikleri, hücrelerin hepatositlere özgü fonksiyonel proteinleri ifade ettiğini göstermektedir. Albuminin hepatosit diferansiyasyonu ve fonksiyonunun temel göstergelerinden biri olduğu, MRP2'nin ise safra asidi ve organik anyonların taşınmasında görev alan önemli bir membran transport proteini olduğu literatürde bildirilmiştir (Niwa et al., 1996; Kawai et al., 2001). Bu doğrultuda, gözlenen pozitif boyanma bulguları hücrelerin hepatosit-benzeri fenotipik özelliklerini sürdürdüğünü desteklemektedir. Bu bulgu, 3B kültür sistemlerinin hücresel diferansiyasyonu desteklediğini ve hücrelerin *in vivo* benzeri davranış sergilemesine olanak sağladığını bildiren çalışmalar ile uyumludur (Edmondson et al., 2014). Zaman ilerledikçe (4. ve 7. günlerde), hücre canlılığının yüksek seviyelerde korunması (%90 civarı), 3B mikroçevrenin hücreler için sürdürülebilir bir yaşam alanı sağladığını göstermektedir. Bu durum, 3B kültür sistemlerinin hücresel homeostazı destekleyici rolünü vurgulamaktadır. PCR analizlerinde AFP ekspresyonunun zamanla artış göstermesi, hücrelerin hepatosit ilişkili özelliklerini koruduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık PCNA ekspresyonunun zamanla azalması veya düşük seviyede

seyretmesi, hücrelerin proliferatif fazdan çıkarak daha stabil ve diferansiye bir fenotipe yöneldiğini düşündürmektedir. Literatürde de 3B kültür sistemlerinde hücrelerin başlangıçta proliferatif bir faz gösterdiği, ancak zamanla fonksiyonel stabilizasyon ve diferansiyasyon sürecine girdiği bildirilmiştir (Edmondson et al., 2014).

Huh-7 + EA.hy926 ko-kültür modeli değerlendirildiğinde, endotel hücrelerinin varlığının hücresel organizasyon ve fenotipik özellikler üzerinde etkili olduğu görülmektedir. 1. günde gözlenen nispeten daha düşük canlılık (%84.75), hücrelerin ko-kültür ortamına adaptasyon süreci ile ilişkili olabilir. Literatürde Huh-7 hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu kültür modelinde, hücrelerin 3B ortamda yeniden organize olarak daha in vivo benzeri davranış sergilediği ve karaciğer fonksiyonlarının değişebildiği gösterilmiştir (Sainz et al., 2009). Bu bağlamda, erken dönemde gözlenen canlılık değişimlerinin hücresel yeniden organizasyon süreci ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. İmmünofloresan analizlerinde gözlenen P miyozin ekspresyonu, sitoskeletal organizasyon ve hücreler arası etkileşimlerin varlığına işaret etmektedir. Benzer şekilde, literatürde yapılan bir çalışmada hepatosit ve endotelyal hücrelerin birlikte kültüre edildiği sistemlerde hücreler arası etkileşimlerin arttığını ve bunun hepatik fonksiyonları desteklediğini göstermiştir (Zhang et al., 2016). Bu doğrultuda, elde edilen bulgular hücreler arası etkileşimlerin hücresel organizasyonu etkileyebileceğini düşündürmektedir. Zamanla hücre canlılığının stabilize olması ve fenotipik markerların korunması, ko-kültür ortamının hücreler için uygun bir mikroçevre sağlayabildiğini göstermektedir. Literatürde hücre davranışının mikroçevre, hücre-hücre etkileşimleri ve fiziksel sinyaller tarafından düzenlendiğini bildirmiştir (Bhatia & Ingber, 2014). Bu durum, elde edilen bulguların mikroçevresel etkiler ile uyumlu olduğunu göstermektedir. PCR analizleri incelendiğinde, AFP ekspresyonunun zamanla artış göstermesi hüresesel fonksiyonların sürdürüldüğünü düşündürmektedir. Literatürde üç boyutlu kültür sistemlerinde hepatosit benzeri hücrelerde diferansiyasyon ve fonksiyonel maturasyonun desteklendiğini bildirmiştir (Sharma et al., 2019). Buna karşılık PCNA ekspresyonunun bazı zaman noktalarında düşük seviyelerde seyretmesi, proliferatif aktivitenin sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, hücrelerin zamanla hepatosit ilişkili fonksiyonel özelliklerini korurken proliferatif aktivitelerinde değişimler meydana gelebileceği

düşünülmektedir. Huh-7 + MKH grubunda, immünofloresan analizlerinde ALB ve CD142 ekspresyonlarının zamana bağlı olarak büyük ölçüde korunduğu görülmektedir. Bu durum, mezenkimal kök hücrelerin bulunduğu ortamlarda hepatosit benzeri hücrelerin fenotipik özelliklerini sürdürebildiğini düşündürmektedir. Literatürde de mezenkimal kök hücrelerin parakrin sinyaller ve hücre-hücre etkileşimleri yoluyla çevre hücrelerin fonksiyonlarını desteklediği ve mikroçevreyi modüle edebildiği bildirilmiştir (Yin et al., 2019; Campbell et al., 2015). CD142 ekspresyonunun bazı alanlarda ALB'ye kıyasla nispeten daha yüksek gözlenmesi, MKH'lerin hücresel mikroçevre ve hücreler arası etkileşim süreçlerinde aktif rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, mezenkimal kök hücrelerin doku organizasyonu ve hücresel etkileşim süreçlerinde düzenleyici rol oynadığını gösteren çalışmalar ile uyumlu olarak değerlendirilebilir (Yin et al., 2019). PCR analizleri incelendiğinde, AFP ekspresyonunun zamanla artış göstermesi hücresel fonksiyonların sürdürüldüğünü düşündürmektedir. Buna karşılık PCNA ekspresyonunun bazı zaman noktalarında düşük seviyelerde seyretmesi, proliferatif aktivitenin sınırlı olabileceğine işaret etmektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, MKH içeren sistemlerde hücrelerin proliferasyondan ziyade fonksiyonel stabiliteyi korumaya yönelik bir eğilim sergileyebileceği düşünülmektedir. Literatürde de üç boyutlu ko-kültür sistemlerinde mezenkimal kök hücrelerin hücresel diferansiyasyon ve fonksiyonel maturasyonu destekleyebildiği bildirilmiştir (Campbell et al., 2015).

Üçlü ko-kültür modeli (Huh-7 + E.A.hy926 + MKH), bu çalışmanın en dikkat çekici bulgularını ortaya koymaktadır. Bu sistemde hücresel etkileşimlerin sinerjik etkisi ile daha kompleks ve fizyolojik olarak anlamlı bir mikroçevre oluştuğu gözlenmiştir. Literatürde, hepatositlerin endotel ve stromal hücrelerle birlikte kültürlenmesinin fonksiyonel kapasiteyi artırdığı ve *in vivo* benzeri yapılar oluşturduğu bildirilmiştir (Wang et al., 2018; Takebe et al., 2013). 4.günde gözlenen AFP ve PCNA artışı, hücrelerin hem proliferatif hem de fonksiyonel olarak aktive olduğu bir geçiş fazını temsil etmektedir. Literatürde yapılan bir çalışmada, Huh-7 hücrelerinin HUVEC ile ko-kültüründe proliferasyonun arttığını göstermiştir. Bu bulgular, çalışmamızda gözlenen aktivasyon fazı ile uyumludur (Jung et al., 2017). 7.günde AFP ekspresyonunun yüksek seviyede kalması ve PCNA'nın dengelenmesi, hücrelerin proliferatif fazdan fonksiyonel diferansiyasyona geçtiğini göstermektedir.

PCNA'nın hepatoselüler karsinomda proliferasyon ile ilişkili önemli bir belirteç olduğu bilinmektedir (Li et al., 2025). Bu nedenle PCNA'nın dengelenmesi, hücrelerin kontrolsüz proliferasyondan uzaklaşıp daha fizyolojik bir duruma geçtiğini düşündürmektedir. AFP ekspresyonundaki zamana bağlı değişimler ise hepatoselüler karsinomun heterojen yapısı ile açıklanabilir. Literatürdeki bir çalışmada, HCC'de marker ekspresyonunun zaman ve mikroçevreye bağlı olarak değişebileceğini bildirmiştir (Hoshida et al., 2009). Bu bağlamda çalışmamızda gözlenen dinamik AFP değişimleri literatür ile uyumlu ve biyolojik olarak anlamlıdır.

Genel olarak tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, hücrelerin zamanla üç temel fazdan geçtiği görülmektedir. 1.gün – homeostatik adaptasyon, 4.gün – proliferatif ve fonksiyonel aktivasyon, 7.gün – fonksiyonel maturasyon ve proliferasyonun dengelenmesi. Bu süreç üçlü ko-kültür modelinde gözlenmiş olup, bu modelin hücresel davranışı yönlendiren mikroçevreyi sağladığını göstermektedir. Sonuç olarak, Huh-7 + MKH + E.A.hy926 üçlü ko-kültür modeli; hücresel canlılığı koruyan, hepatosit fenotipini sürdüren ve hücreleri proliferatif durumdan fonksiyonel diferansiyasyona yönlendiren gelişmiş bir sistemdir. Bu model, ileri in vitro karaciğer modelleri, hastalık modellemeleri ve ilaç geliştirme çalışmaları için güçlü ve fizyolojik olarak anlamlı bir platform sunmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan tüm analizler (canlı/ölü, immünofloresan ve qRT-PCR) açısından elde edilen sonuçlar, başlangıç hipotezleri ile büyük ölçüde uyumlu bulunmuştur. Canlı/ölü analizleri açısından, 3B ko-kültür sistemlerinin hücre canlılığını desteklemesi ve uzun süreli kültürde stabilite sağlaması beklenmekteydi. Elde edilen sonuçlar bu beklentiyi doğrulamış; tüm gruplarda 7.güne kadar %80'in üzerinde canlılık korunmuş ve özellikle üçlü ko-kültür sisteminde yüksek canlılık oranlarının devam ettiği gözlenmiştir. Bu durum, kompleks mikroçevrenin hücresel stresin azaltılmasına ve hücre yaşamının desteklenmesine katkı sağladığını göstermektedir. IF analizleri açısından, hepatosit fenotipinin korunması ve ko-kültür sistemlerinde hücresel organizasyonun artması beklenmekteydi. Bulgular bu beklenti ile uyumlu olarak, ALB ve MRP2 gibi hepatosit markerlarının tüm zaman noktalarında korunduğunu ve özellikle ko-kültür sistemlerinde daha organize ve kompleks yapıların oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca endotel ve MKH içeren gruplarda sitoskeletal organizasyonun (P miyozin vb.) daha belirgin hale gelmesi,

hücreler arası etkileşimin arttığını ortaya koymuştur. qRT-PCR analizleri açısından, AFP ve PCNA gen ekspresyonlarının zaman ve mikroçevreye bağlı olarak değişmesi beklenmekteydi. AFP için beklenti, 3B ve özellikle ko-kültür sistemlerinde artış göstermesi yönündeydi ve elde edilen sonuçlar bu beklentiyi doğrulamıştır. AFP ekspresyonu özellikle 4. ve 7.günlerde artış göstermiş ve hepatosellüler fonksiyonların sürdüğünü ortaya koymuştur. Buna karşılık PCNA açısından başlangıçta artış beklenmekteydi, çünkü 3B mikroçevre ve ko-kültür sistemlerinin hücre proliferasyonunu teşvik edebileceği öngörülmüştür. Nitekim özellikle 4.günde bazı gruplarda proliferatif aktivitede artış gözlenmiştir. Ancak 7.günde PCNA ekspresyonunun azalması veya dengelenmesi, başlangıç beklentisinden farklı olarak hücrelerin proliferatif fazdan çıkarak daha stabil ve fonksiyonel bir fenotipe yöneldiğini göstermiştir. Bu durum, 3B kültür sistemlerinde zamanla proliferasyonun baskılanarak diferansiyasyonun ön plana çıktığını bildiren literatür ile uyumludur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının temel amacı, Huh-7 hücreleri kullanılarak oluşturulan üç boyutlu mono, ikili ve üçlü ko-kültür modellerinin hücresel davranış, fenotipik özellikler ve fonksiyonel aktiviteler açısından değerlendirilmesi ve bir karaciğer mikroçevresinin *in vitro* olarak modellenmesidir. Elde edilen sonuçlar, 3B kültür sistemlerinin hücrelerin yalnızca canlılığını sürdürmekle kalmayıp aynı zamanda fonksiyonel özelliklerini koruyarak daha gerçekçi bir doku benzeri yapı oluşturduğunu açıkça ortaya koymuştur. Çalışma kapsamında tüm deney gruplarında hücrelerin kültür ortamına başarılı şekilde adapte olduğu ve yüksek canlılık oranlarının korunduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, özellikle ko-kültür sistemlerinde hücreler arası etkileşimlerin artmasıyla birlikte hücresel organizasyonun daha düzenli hale geldiği ve hepatosit benzeri fonksiyonların güçlendiği gözlenmiştir. İmmünofloresan analizlerinde ALB ve MRP2 gibi hepatosit belirteçlerinin korunması, hücrelerin fenotipik stabilitesini sürdürdüğünü göstermektedir. Gen ekspresyon analizleri değerlendirildiğinde, AFP ekspresyonundaki artış hücrelerin fonksiyonel aktivitesinin devam ettiğini gösterirken, PCNA düzeylerindeki görece azalma hücrelerin proliferatif fazdan fonksiyonel stabilizasyona yöneldiğini düşündürmektedir. Bu durum, 3B ko-kültür sistemlerinin klasik 2B kültürlere kıyasla daha fizyolojik bir denge sağladığını ve hücrelerin farklılaşma-benzeri bir davranış sergileyebileceğini göstermektedir. Özellikle üçlü ko-kültür modelinin, hem hücre canlılığı hem de fonksiyonel ve fenotipik göstergeler açısından dengeli ve gelişmiş mikroçevreyi sunduğu belirlenmiştir. Mezenkimal kök hücreler ve endotel hücrelerinin birlikte varlığı, hücreler arası sinyalleşmeyi artırarak hepatosit fonksiyonlarının sürdürülmesine sinerjik katkı sağlamıştır. Bu bulgu, çok hücreli sistemlerin karaciğer doku mühendisliği ve hastalık modelleme çalışmalarında kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma MKH içeren 3B ko-kültür sistemlerinin Huh-7 hücreleri için daha fizyolojik, fonksiyonel ve sürdürülebilir bir mikroçevre sunduğunu ortaya koymuş ve özellikle üçlü ko-kültür modelinin *in vitro* karaciğer modelleri açısından iyi bir aday olduğunu göstermiştir.

Gelecek çalışmalarda, kültür süresinin uzatılması ve uzun dönem stabilitenin değerlendirilmesi, farklı hücre oranlarının optimize edilmesi ve ek karaciğer

fonksiyon testlerinin (üre üretimi, sitokrom P450 aktiviteleri vb.) yapılması önerilmektedir. Ayrıca, bu modelin ilaç toksisite testleri, hastalık modelleme çalışmaları ve çip üzerinde organ platformları veya mikroakışkan çip ile entegre edilerek kullanılması, ELISA veya başka analizlerle değerlendirilmesi sistemin translasyonel değerini önemli ölçüde artıracaktır. Bunun yanında, primer hepatositler veya hasta kaynaklı hücrelerle yapılacak çalışmalar modelin klinik uygulanabilirliğini daha da güçlendirecektir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdel-Misih SZ, Bloomston M. Liver Anatomy. Surg Clin North Am. 2010;90(4):643–53

Alamri, Z. Z. (2018). The role of liver in metabolism: an updated review with physiological emphasis. Int J Basic Clin Pharmacol, 7(11), 2271-2276.

Allen AM, Kim WR. Epidemiology and healthcare burden of acute- on-chronic liver failure. Semin Liver Dis. 2016;36(2):123-6.

Allen SE.The liver: Anatomy, Physiology, Disease and Treatment. 2002 North Eastern University Press, USA.

Allen, S.E. (2002).The liver: Anatomy, Physiology, Disease and Treatment. North Eastern University Press, USA.

Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojiro M, Makuuchi M, Nakamura Y, Okita K, Yamada R. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. Hepatology 2000; 32: 1224-1229

Arroyo V, Moreau R, Kamath PS, et al. Acute-on-chronic liver fail- ure in cirrhosis. Nat Rev Dis Primers. 2016

Arzumanian, V. R., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2023). Comparative transcriptomic analysis of three common liver cell lines. International Journal of Molecular Sciences, 24(10), 8791.

Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. Journal of hepatology, 70(1), 151-171.

Ballardini G, Groff P, Zoli M, Bianchi GP, Giostra F, Francesconi R, et al. Increased risk of hepatocellular development in patients with cirrhosis and with high hepatocellular proliferation. J Hepatol 1994; 20:218–222

Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., et al. (2009). Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. Journal of Hepatology, 51(2), 219–228.

Bauer J, Margolis M, Schreiner C, Edgell CJ, Azizkhan J, Lazarowski E and Juliano RL: In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. J Cell Physiol 153: 437-449, 1992.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Bauer J, Margolis M, Schreiner C, Edgell CJ, Azizkhan J, Lazarowski E and Juliano RL: In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. J Cell Physiol 153: 437-449, 1992.

Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. Lancet 1981; 2: 1129-1133

Bell, C. C., Hendriks, D. F. G., Moro, S. M. L., et al. (2016). Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury. Archives of Toxicology, 90, 1–15.

Bhatia, S. N., & Ingber, D. E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. Nature Biotechnology, 32, 760–772.

Bismuth H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. World J Surg. 1982;6(1):3–9. 3.

Bouis D, Hospers GA, Meijer C, Molema G and Mulder NH: Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. Angiogenesis 4: 91- 102, 2001.

Bravo R, MacDonald-Bravo H. Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. EMBO J 1985;4:655–661.

Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/ proliferating nuclear cell antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. J Cell Biol 1987;105:1549–1554.

Byass P. The global burden of liver disease: a challenge for methods and for public health. BMC Med. 2014;12:159

Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxì A, Cammà C. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. Hepatology 2010; 51: 1274-1283

Campbell, S. B., et al. (2015). Engineering liver tissue models using stem cell co-culture systems. Stem Cell Research & Therapy, 6, 1–12.

Chang CD, Phillips P, Lipson KE, Cristofalo VJ, Baserga R. Senescent human fibroblasts have a post-transcriptional block in the expression of the proliferating cell nuclear antigen gene. J Biol Chem 1991;266:8663–8666

Celis JE, Celis A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S-phase. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:3262–3266

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Chen CF, Lee WC, Yang HI, Chang HC, Jen CL, Iloeje UH, Su J, Hsiao CK, Wang LY, You SL, Lu SN, Chen CJ. Changes in serum levels of HBV DNA and alanine aminotransferase determine risk for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2011; 141: 1240-1248, 1248.e1-e2

Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, You SL, Lu SN, Wang LY, Su J, Sun CA, Liaw YF, Chen CJ. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. Gastroenterology 2010; 138: 1747-1754

Choi SH, Choi GH, Kim SU, Park JY, Joo DJ, Ju MK, Kim MS, Choi JS, Han KH, Kim SI. Role of surgical resection for multiple hepatocellular carcinomas. World J Gastroenterol 2013; 19: 366-374

Cieslak M, Niewiarowska J, Nawrot M, Koziolkiewicz M, Stec WJ and Cierniewski CS: DNAzymes to beta 1 and beta 3 mRNA down-regulate expression of the targeted integrins and

Cui DJ, Wu Y, Wen DH. CD34, PCNA and CK19 expressions in AFP-hepatocellular carcinoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018;22(16):5200–5205.

Dai Y, Li C, Wen TF, Yan LN. Comparison of liver resection and transplantation for Child-pugh A cirrhotic patient with very early hepatocellular carcinoma and portal hypertension. Pak J Med Sci 2014; 30: 996-1000

Delhaye, M. · Louis, H. · Degraef, C. Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis Hepatology. 1996; 23:1003-1011

Dennis J. E.; Carbillet J. P.; Caplan A. I.; Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. Cells Tissues Organs 170(2–3): 73–82; 2002.

Devarbhavi, H., Asrani, S. K., Arab, J. P., Nartey, Y. A., Pose, E., & Kamath, P. S. (2023). Global burden of liver disease: 2023 update. Journal of hepatology, 79(2), 516-537.

Ding D. C.; Shyu W. C.; Lin S. Z.; Li H. Current concepts in adult stem cell therapy for stroke. Curr. Med. Chem. 13(29): 3565–3574; 2006.

Ding D. C.; Shyu W. C.; Lin S. Z.; Li H. The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases. Cell Transplant. 16(3): 273–284; 2007.

Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal Stem Cells. Cell Transplantation. 2011;20(1):5-14.

Donato MF, Arosio E, Del Ninno E, Ronchi G, Lampertico P, Morabito A, et al. High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity. Hepatology 2001; 34:523–528

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Du, Y., Li, N., Yang, H., et al. (2020). Long-term culture and maintenance of liver functions in co-culture systems. Biofabrication, 12(2), 025001.

E. Wisse, F. Braet, D. Luo, R. De Zanger, D. Jans,E. Crabbe, and A. Vermoesen, Toxicol. Pathol. 24,100–111 (1996).

Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. Assay and Drug Development Technologies, 12(4), 207–218.

El-Defy, A. M., Khedr, M. A., Ghoneim, N. I., Gaber, M. M., Khater, S. M., & El-Badri, N. (2024). Plasma-derived extracellular matrix for tumor-free and cost-effective organoid modeling for hepatocellular carcinoma. Journal of Translational Medicine, 22(1), 437.

El–Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology, 132(7), 2557-2576.

Emeis JJ and Edgell CJ: Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926). Blood 71: 1669-1675, 1988.

F. Hamel, M. Grondin, F. Denizeau, D. A. Averill-Bates, and F. Sarhan, Biotechnol. Bioeng. 95, 661–670(2006).

Farber JL, Gerson RJ. Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals. Pharmacol Rev 1984;36:71S–5S.

Gaskell, H., Sharma, P., Colley, H. E., et al. (2016). Characterization of a functional C3A liver spheroid model. Toxicology Research, 5(4), 1053–1065.

Gines P, Graupera I, Lammert F, et al. Screening for liver fibrosis in the general population: a call for action. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2016;1(3):256-260

Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., et al. (2019). Human in vitro models of non-alcoholic fatty liver disease. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 8(1), 219–237.

Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., et al. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells. Archives of Toxicology, 87, 1315–1530

Gönen, Z. B., & Şahin, N. S. (2019). Mesenchymal stem cell production for clinical usage. Akd Med J, 5(2), 169-175.

H. L. Wang, C. A. Thorling, X. W. Liang, K. R. Bridle,J. E. Grice, Y. A. Zhu, D. H. G. Crawford, Z. P. Xu,X. Liu, and M. S. Roberts, J. Mater. Chem. B 3, 939–958 (2015).

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

H. Nakabayashi, , K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane and J. Sato, "Growth of Human Hepatoma Cells Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium," Cancer Research, Vol. 42, No. 9, 1982, pp. 3858- 3863.

Hiatt JR, Gabbay J, Busuttil RW. Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases. Ann Surg 1994;220:50–52

Hoshida, Y., Nijman, S. M. B., Kobayashi, M., Chan, J. A., Brunet, J. P., Chiang, D. Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M., et al. (2009). Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma.Cancer Research, 69(18), 7385–7392.

J. J. Alexander, E. M. Bey, E. W. Geddes and G. Lecatsas, "Establishment of a Continuously Growing Cell Line from Primary Carcinoma of the Liver," Sout African Medical Journal, Vol. 50, No. 54, 1976, pp. 2124-2128

J. Lin, L. Schyschka, R. Muhl-Benninghaus, J. Neumann, L. Hao, et al., "Comparative Analysis of Phase I and II Enzyme Activities in 5 Hepatic Cell Lines Identifies Huh-7 and HCC-T Cells J. Wu and M. A. Zern, J Gastroenterol. 35, 665–672(2000).

Jing W, Peng R, Zhu M, et al. Differential expression and diagnosticsignificance of pre-albumin, fibrinogen combined with D-dimer inAFP-negative hepatocellular carcinoma. Pathol Oncol Res. 2020

Jung, H. R., Kang, H. M., Ryu, J. W., Kim, D. S., Noh, K. H., Kim, E. S., ... & Jung, C. R. (2017). Cell spheroids with enhanced aggressiveness to mimic human liver cancer in vitro and in vivo. Sci. Rep., 7(1), 10499.

Kawai, H., et al. (2001). Characterization of alpha-fetoprotein-producing human hepatoma cell lines. Hepatology Research, 19(1), 1–12.

Kawamoto, M., Yamaji, T., Saito, K., Shirasago, Y., Satomura, K., Endo, T., ... & Osada, N. (2020). Identification of characteristic genomic markers in human hepatoma HuH-7 and Huh7. 5.1-8 cell lines. Frontiers in genetics, 11, 546106.

Khetani, S. R., & Bhatia, S. N. (2008). Microscale culture of human liver cells for drug development. Nature Biotechnology, 26(1), 120–126.

Kitamoto M, Nakanishi T, Kira S, Kawaguchi M, Nakashio R, Suemori S, et al. The assessment of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemical staining in small hepatocellular carcinoma and its relationship to histologic characteristics and prognosis. Cancer 1993;72:1859–1865.

Leite, S. B., et al. (2016). Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. Biomaterials, 78, 1–10.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Li MS, Ma QL, Chen Q, et al. Alpha-fetoprotein triggers hepatomacells escaping from immune surveillance through altering the expres-sion of Fas/FasL and tumor necrosis factor related apoptosis-inducingligand and its receptor of lymphocytes and liver cancer cells. WorldJ Gastroenterol. 2005

Li, X., et al. (2022). 3D liver models for studying hepatocyte proliferation and differentiation balance. Advanced Science, 9(5), 2104388.

Li, Y., Liu, X., Chen, X., Zhou, Q., & He, J. (2023). Hydrogel stiffness regulates hepatic tumor cell behavior in 3D culture models of fibrosis and cirrhosis. Scientific Reports, 13, 27997.

Li, Z., Zhang, H., Rehman, M. U., & Zhang, Y. (2025). PCNA as a potential prognostic biomarker and therapeutic target in hepatocellular carcinoma. Cancer Cell International, 25, 12.

Lin, C., et al. (2017). Co-culture systems and their influence on hepatocyte proliferation and differentiation. Tissue Engineering Part A, 23(9–10), 1–12.

Liu J, et al. Mesenchymal stem cells and their microenvironment. Stem Cell Research & Therapy. 2022;13:208.

Liu PH, Lee YH, Hsu CY, Hsia CY, Huang YH, Chiou YY, Lin HC, Huo TI. Surgical resection is better than transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma beyond Milan criteria independent of performance status. J Gastrointest Surg 2014; 18: 1623-1631

Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. Hepatology 2003; 37: 429-442

Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. Hepatology 1999; 30: 1434-1440

Llovet JM, Peña CE, Lathia CD, Shan M, Meinhardt G, Bruix J. Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 2012; 18: 2290-2300

Lu LH, Zhang YF, Wei W, Shi M, Guo RP. Preoperative carbohydrateantigen 19-9: its neglected role in alpha-fetoprotein-negative hepato-cellular carcinoma patients. J Gastrointest Surg. 2017

Luo CL, Rong Y, Chen H, et al. A logistic regression model fornoninvasive prediction of AFP-negative hepatocellular carcinoma.Technol Cancer Res Treat. 2019

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

March, S., et al. (2009). Co-culture of hepatocytes and endothelial cells improves liver-specific functions in vitro. Hepatology, 50(3), 920–928.

Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Roayaie S, Schwartz ME, Grazi GL, Adam R, Neuhaus P, Salizzoni M, Bruix J, Forner A, De Carlis L, Cillo U, Burroughs AK, Troisi R, Rossi M, Gerunda GE, Lerut J, Belghiti.

Mendoza, M., et al. (2018). PCNA as a marker of proliferation in cancer cells. Journal of Molecular Biology Research, 8(1), 15–22.

Mitra, V., & Metcalf, J. (2012). Metabolic functions of the liver. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 13(2), 54-55.

Molina-Jimenez, F., Benedicto, I., Dao Thi, V. L., et al. (2012). Matrigel-based 3D culture of Huh-7 cells reproduces bile canaliculi formation and hepatocyte polarity. Journal of Hepatology, 57(2), 430–436.

Moore, K.L. and Dalley, A.F. (2006). Clinically Oriented Anatomy. 5th Edition Lippincott Williams and Wilkins. 1209 pp.

Myojin, Y., Hikita, H., Sugiyama, M., Sasaki, Y., Fukumoto, K., Sakane, S., ... & Takehara, T. (2021). Hepatic stellate cells in hepatocellular carcinoma promote tumor growth via growth differentiation factor 15 production. Gastroenterology, 160(5), 1741-17

Nagai H, Pineau P, Tiollais P, Buendia MA, Dejean A. Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. Oncogene 1997; 14:2927–2933.

Nishizawa, H.; Iguchi, G.; Murawaki, A.; Fukuoka, H.; Hayashi, Y.; Kaji, H.; Yamamoto, M.; Suda, K.; Takahashi, M.; Seo, Y.; et al. Nonalcoholic fatty liver disease in adult hypopituitary patients with gh deficiency and the impact of GH replacement therapy. Eur. J. Endocrinol. 2012, 167, 67–74

Niwa, H., Yamamura, K., & Miyazaki, J. (1996). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene, 108(2), 193–199.

Otto G, Schuchmann M, Hoppe-Lotichius M, Heise M, Weinmann A, Hansen T, Pitton MP. How to decide about liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: size and number of lesions or response to TACE? J Hepatol 2013; 59: 279-284

Ozougwu, J. C. (2017). Physiology of the liver. International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences, 4(8), 13-24.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Papatheodoridis GV, Lampertico P, Manolakopoulos S, Lok A. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide therapy: a systematic review. J Hepatol 2010; 53: 348-356

Peek CB, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Nutrient sensing and the circadian clock. Trends Endocrinol Metab. 2012 Jul 1;23(7):312-8.

Polidoro, M. A., Parente, E., Mancini, A., & Cavallini, C. (2021). Experimental liver models: From cell culture techniques to scaffold-based systems. Liver International, 41(6), 1334–1350.

Proctor, W. R., Foster, A. J., Vogt, J., et al. (2017). Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. Archives of Toxicology, 91, 2849–2863.

Prosperi E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. Progress Cell Cycle Res 1997;3:193–210.

Ramaiahgari, S. C., den Braver, M. W., Herpers, B., et al. (2014). A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties. Toxicology and Applied Pharmacology, 279(1), 124–132.

Reig, M., & Bruix, J. (2022). Reply to:"Correspondence on the< BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update>". Journal of Hepatology, 76(5), 1240-1241.

Reinke H, Asher G. Circadian clock control of liver metabolic functions. Gastroenterol. 2016 Mar1;150(3):574-80.

Rochling F, Van Hoek B, Majno P. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. Lancet Oncol 2009; 10: 35-43

Roxburgh P, Evans TR. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: are we making progress? Adv Ther 2008; 25: 1089-1104

Sainz, B., Jr., TenCate, V., & Uprichard, S. L. (2009). Three-dimensional Huh-7 cell culture system for the study of liver function and hepatitis C virus infection. Journal of Cellular Physiology, 219(3), 727–737.

Sala M, Llovet JM, Vilana R, Bianchi L, Solé M, Ayuso C, Brú C, Bruix J. Initial response to percutaneous ablation predicts survival in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology 2004; 40: 1352-1360

Salehinejad P, Moshrefi M, Eslaminejad T. An overview on mesenchymal stem cells derived from extraembryonic tissues: supplement sources and isolation methods. Stem Cells Cloning. 2020.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Sharma, A., et al. (2019). Three-dimensional culture systems promote hepatocyte differentiation and functional maturation. Stem Cell Research & Therapy

She S, Xiang Y, Yang M, et al. C-reactive protein is a biomarker ofAFP-negative HBV-related hepatocellular carcinoma. Int J Oncol.2015;47(2):543–554.

Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. Semin Liver Dis 2010; 30: 3-16

Shivakumar CV, Brown DR, Deb S, Deb SP. Wild-type human p53 transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. Mol Cell Biol1995;15:6785–6793

Sibulesky, L. (2013). Normal liver anatomy. Clinical liver disease, 2, S1-S3

Singh I. Textbook of Human Histology with colour Atlas. 2007, 5th Edition Jay Pee Brothers Medical Publishers Ltd. 365 pp.

Sirica, A. E., & Pitot, H. C. (1979). Characteristics of microsomal enzyme controls in primary cultures of rat hepatocytes. Archives of Biochemistry and Biophysics, 192(1), 61–72.

Suehiro T, Matsumata T, Itasaka H, Yamamoto K, Kawahara N, Sugimachi K. Clinicopathologic features and prognosis of resected hepatocellular carcinoma of varied sizes with special reference to proliferating cell nuclear antigen. Cancer 1995;76: 399–405.

Takahashi, Y. (2017). The role of growth hormone and insulin-like growth factor-I in the liver. International journal of molecular sciences, 18(7), 1447.

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. Nature, 499, 481–484.

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. Nature, 499,

Torensma R.; ter Brugge P. J.; Jansen J. A.; Figdor C. G. Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. Clin. Oral Implants Res. 14(5): 569–577; 2003.

Toschi L, Bravo R. Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. J Cell Biol 1988; 107:1623–1628.

Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. Lancet. 2014;383(9930):1749-61.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Tsopanoumichalou M, Kouroumalis E, Ergazaki M, Spandilos DA. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human nonneoplastic hepatic lesions. Liver 1999;19:305–311.

Underhill, G. H., & Khetani, S. R. (2018). Bioengineered liver models for drug testing and cell differentiation studies. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 5(3), 426–439.

Wang X, Mao M, He Z, et al. Development and validation ofa prognostic nomogram in AFP-negative hepatocellular carcinoma.Int J Biol Sci. 2019;

Wang, G., Zheng, Y., Wang, Y., Cai, Z., Liao, N., Liu, J., & Zhang, W. (2018). Co-culture system of hepatocytes and endothelial cells: Two approaches for enhancing liver-specific functions of hepatocytes.

Wang, Y., Cui, C. B., Yamauchi, M., Miguez, P., Roach, M., Malavarca, R., & Oertel, M. (2016). ECM proteins in a microporous scaffold influence Huh-7.5 cell behaviour. Scientific Reports, 6, 37427.

Wanson JC, Bernaert D, May C. Morphology and functional properties of isolated and cultured hepatocytes. Progress in Liver Diseases 1979, 6: 1 - 22.

Ware, B. R., et al. (2015). Liver-on-a-chip models for drug discovery and toxicology. Biotechnology Advances, 33(8), 1–10

Wazir H, Abid M, Essani B, Saeed H, Ahmad Khan M, Nasrullah F, Qadeer U, Khalid A, Varrassi G, Muzammil MA, Maryam A, Syed ARS, Shah AA, Kinger S, Ullah F. Diagnosis and Treatment of Liver Disease: Current Trends and Future Directions. Cureus. 2023 Dec 4;15(12):e49920. with the Highest Potential to Study Drug metabolism," Archives of Toxicology, Vol. 86, No. 1, 2012, pp. 87-95.

Wong R, Frenette C. Updates in the management of hepatocellular carcinoma. Gastroenterol Hepatol (N Y) 2011; 7: 16-24

Yakar, S.; Liu, J.L.; Fernandez, A.M.; Wu, Y.; Schally, A.V.; Frystyk, J.; Chernausek, S.D.; Mejia, W.; Le Roith, D. Liver-specific IGF-I gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. Diabetes 2001, 50, 1110–1118.

Yeh SH, Chen PJ, Shau WY, Chen YW, Lee PH, Chen JT, et al. Chromosomal allelic imbalance evolving from liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2001;121:699–709.

Yin, C., et al. (2019). Hepatocyte–stem cell interactions in liver regeneration and tissue engineering. Journal of Hepatology, 70(2), 1–12.

Zhang, B., et al. (2016). Endothelial cell–hepatocyte interactions in co-culture systems enhance liver-specific functions. Biomaterials, 87, 1–13.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Zhang, Y., et al. (2021). Endothelial–hepatocyte interactions regulate liver-specific functions in co-culture systems. Acta Biomaterialia, 124, 1–12.

Zhong JH, Xiang BD, Gong WF, Ke Y, Mo QG, Ma L, Liu X, Li LQ. Comparison of long-term survival of patients with BCLC stage B hepatocellular carcinoma after liver resection or transarterial chemoembolization. PLoS One 2013; 8: e68193