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

İNSAN GÖBEK KORDONUNDAN KOLLAJENİN EKSTRAKSİYONU, KARAKTERİZASYONU VE HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

SELJAN MAMMADOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. HÜSEYİN AVCI

Eskişehir, 2026

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

İNSAN GÖBEK KORDONUNDAN KOLLAJENİN EKSTRAKSİYONU, KARAKTERİZASYONU VE HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

SELJAN MAMMADOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. HÜSEYİN AVCI

Eskişehir, 2026

Proje No: BAP TYL-2025-3442; TUBİTAK 1004-20AG031

ÖZET

Başlık: İnsan Göbek Kordonundan Kollajenin Ekstraksiyonu, Karakterizasyonu ve Hücreler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi.

Amaç: Bu projenin amacı, insan doku kaynaklı kolajenin hücresel proliferasyon ve etkileşimler üzerindeki etkilerini incelemektir. İlk olarak, insan göbek kordonundan elde edilen hücrelerden arındırılmış hücre dışı matris (dECM) ve kolajen matriksinin strüktürel özellikleri analiz edilmiş, ardından mezenkimal kök hücreler (MKH) ve ticari olarak edilen insan karaciğer kanseri hücre hattı, HepG2, bu matriks üzerine ekilip hücresel büyüme kinetikleri değerlendirilmiştir.

Yöntem: İnsan göbek kordonundan Wharton jeli, sadece deterjan (Det-Kol) ve ek olarak enzimatik metotlarla (Enz-Kol) hücresizleştirildikten sonra tuzla çöktürme yoluyla kolajen ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kolajen yapısı karakterizasyonu tamamlandıktan sonra hücreler, kolajen matriksine ekilerek 3 boyutlu (3B) kültür ortamında incelenmiştir.

Bulgular: Hücresizleştirme sonrası yapılan histolojik ve immünofloresan boyamalar ile DNA miktar tayini analizleri, hücre çekirdeklerinin gruplar arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Enz-Kol grubunda belirgin hücre azalması gözlenirken, kolajen yapısının kısmen korunduğu belirlenmiştir. SEM ve FTIR analizleri, yapının gözenekli ve lifli bir morfolojiye sahip olduğunu göstermiş; FTIR sonuçlarında Amide A, I, II ve III gruplarının varlığı tespit edilmiştir. Canlı/ölü boyama ve proliferasyon analizleri ise tüm gruplarda yüksek hücre canlılığı olduğunu ve Enz-Kol grubunda daha yüksek proliferasyon gözlendiğini göstermiştir.

Sonuç: Hücresizleştirme etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılan analizler sonucunda, Enz-Kol kolajen grubunun belirlenen kriterlere en uygun sonuçları verdiği görülmüştür. Kolajen karakterizasyonu incelendiğinde, örneklerin hem yüzey morfolojisi hem de kimyasal bileşimi açısından kolajen yapısına uygun özellikler sergilediği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, Enz-Kol grubunun hücreler üzerinde daha olumlu etkiler gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Wharton jeli, kolajen, hücrelerden arındırılmış hücre dışı matris, mezenkimal kök hücreler, HepG2.

ABSTRACT

Title: Extraction, Characterization, and Investigation of the Effects of Collagen on Cells from Human Umbilical Cord.

Objective: The aim of this project was to investigate the effects of human-derived collagen on cellular proliferation and interactions. First, the structural properties of the collagen matrix was analyzed, then cells (MSC and HepG2) were seeded onto this matrix and cellular growth kinetics was evaluated.

Method: Collagen was extracted from human umbilical cord using Wharton gel by only detergent (Det-Kol) and additionally enzymatic methods (Enz-Kol), followed by salt precipitation. After characterization of the collagen structure was completed, the cells was seeded onto the collagen matrix and investigated in a 3D culture environment.

Findings: After decellularization, histological and immunofluorescence staining and DNA quantification analyzes revealed that cell nuclei were differed between groups. In the Enz-Kol group, significant cell reduction was observed, while the collagen structure was partially preserved. SEM and FTIR analyzes showed that the structure has a porous and fibrous morphology; FTIR results revealed the presence of Amide A, I, II and III groups. Live/dead staining and proliferation analysis showed high cell viability in all groups and higher proliferation was observed in Enz-Col group.

Conclusion: Analyses performed to assess decellularization effectiveness revealed that the Enz-Kol collagen group yielded the most consistent results according to the established criteria. Collagen characterization revealed that the samples exhibited characteristics consistent with collagen structure in terms of both surface morphology and chemical composition. Based on the obtained data, it was concluded that the Enz-Kol group exhibited more positive effects on the cells.

Key Words: Wharton's gel, collagen, decellularized extracellular matrix, mesenchymal stem cells, HepG2.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....
ETİK BEYAN .....
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIMI BEYAN FORMU .....
TEŞEKKÜR .....
ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Biyomateryallerin Tanımı ve Önemi 4
2.2. Kolajen ve Özellikleri 4
2.2.1. Biyomedikal uygulamalarda kullanım alanları 7
2.3. Doku Mühendisliğinde Ekstraselüler Matriks 8
2.4. Wharton Jeli ve Yapısal Özellikleri 8
2.4.1. Wharton jeli tabanlı ekstraselüler matriks 9
2.4.2. Üretim yöntemleri ve işleme süreçleri 10
2.4.3. Biyomedikal uygulamalarda kullanım alanları 11
2.5. Kök Hücreler ve Kaynakları 13
2.5.1. Mezenkimal kök hücreler 15
2.5.2. MKH'lerin rejeneratif potansiyeli 17
2.6. Hepatoselüler Karsinom Hücre Hatları - HepG2 18
2.7. Hücre-Matriks Etkileşimleri ve Doku Mühendisliği 20
2.7.1. Matriksin hücre proliferasyonu ve adhezyonu üzerindeki etkisi 21
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER **24**
3.1. Deney Protokolü 24
3.2. İnsan Göbek Kordonundan Wharton Jeli İzolasyonu 24
3.3. Wharton Jeli Hücresizleştirilmesi 25
3.3.1. Hücresizleştirme işleminin etkinliği ve karakterizasyonu 27
3.3.1.1. Histolojik boyama 27

3.3.1.2. İmmunohistokimya *28*
3.3.1.3. DNA ölçümü *29*
3.3.1.4. Agaroz jel elektroforezi *30*
3.3.1.5. Hidroksipirolin tayini analizi *30*
3.4. ECM'den Kolajen Ekstraksiyonu 31
3.4.1. Kolajen karakterizasyonu 31
3.4.1.1. SEM (Taramalı elektron mikroskobu) *32*
3.4.1.2. FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi) *32*
3.5. Hücrelerin İzolasyonu, Kültür Edilmesi, Çoğaltılması ve Karakterizasyonu . 32
3.5.1. MKH'lerin izolasyonu ve kültüre edilmesi 32
3.5.2. WJ-MKH'lerin flow sitometri ile karakterizasyonu 33
3.6. Hücrelerin 3B Kültür Ortamında Ekilmesi ve Karakterizasyonu 34
3.6.1. Hücrelerin kolajen ve ECM matriksine ekilmesi 35
3.6.2. Hücrelerin matriks üzerindeki hücre canlılığı karakterizasyonu 36
3.6.2.1. Canlı/ölü boyama testi *36*
3.6.2.2. Proliferasyon testi *36*
4. BULGULAR 38
4.1. İnsan Göbek Kordonundan Wharton Jeli İzolasyonu 38
4.2. Wharton Jeli Hücresizleştirilmesi 38
4.2.1. Hücresizleştirme işleminin etkinliği ve karakterizasyonu 38
4.2.1.1. Histolojik boyama *38*
4.2.1.2. İmmunohistokimya *39*
4.2.1.3. DNA izolasyonu *40*
4.2.1.4. Agaroz jel elektroforezi *41*
4.3. Hidroksipirolin Analizi 41
4.4. Kolajen Karakterizasyonu 42
4.4.1. SEM (taramalı elektron mikroskobu) 42
4.4.2. FTIR (dönüşümlü fourier kızılötesi spektroskopi) 43
4.5. WJ-MKH'lerin Flow Sitometri Karakterizasyonu 44
4.6. Kolajenin Hücreler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi 45
4.6.1. Canlı/ölü boyama ile hücre canlılığı analizi 45
4.6.2. Proliferasyon analizi 48
5. TARTIŞMA 50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 58

7. KAYNAKLAR DİZİNİ..... 60
8. EKLER DİZİNİ 74
EK-1. Etik Kurul Onayı
EK-2. İntihal Raporu
9. ÖZGEÇMİŞ..... 78
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI 79

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Kolajen tiplerinin yapısal özellikleri ve kaynakları (Chuaychan, 2016; Mayne, 1993) 5

Tablo 2.2. Kök hücre tipleri ve kaynakları. 14

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kolajenin fibriler yapısı (voonkacollagen.com 2025). 4

Şekil 2. 2. GAG'ların disakkarit tekrarlayan birimlerinin yapıları (Tush et al., 2019). 7

Şekil 2. 3. Ekstrasellüler matriks yapısı ve bileşenleri (OpenStax Biology 2025) 8

Şekil 2. 4. Göbek Kordonu Kesiti: Damarlar ve Wharton Jeli (Watson et al., 2015) 9

Şekil 3. 1. Tez çalışmasının grafikal özeti..... 24

Şekil 3. 2. Göbek kordonundan wharton jeli izolasyonu (Gao et al., 2025). 25

Şekil 3. 3. Wharton jeli kaynağından hücresizleştirme aşamaları. 26

Şekil 3. 4. IF Boyama: Primer ve Sekonder Antikorların Bağlanması ve Sinyal Amplifikasyonu (Foot, 1933). 29

Şekil 4. 1. Kolajen grubları: Enz-Kol ve Det-Kol, kontrol grubu: WJ (Wharton Jeli) histolojik boyama görüntüleri..... 39

Şekil 4. 2. Kolajen grubları: Enz-Kol ve Det-Kol, kontrol grubu: WJ IF (COL I ve Fibronectin) boyama görüntüleri. 40

Şekil 4. 3. A) DNA miktarı sonuçları: WJ 168 ng/mg, Det-ECM 60 ng/mg ve Enz-ECM 20 ng/mg, 260/280 nm absorbans değerleri. B) Agaroz jel elektroforezi DNA fragmentinin uzunluğu (bç). 41

Şekil 4. 4. Hidroksipirolin miktarı: WJ (1.51 µg/mg), Enz-ECM (0.24 µg/mg), Det-ECM (0.28 µg/mg). 42

Şekil 4. 5. Enz-Kol ve Det-Kol, kolajen örneklerinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri. Farklı büyütmelerde: i ve ii (200um), iii ve iv (20um) porlu ve lifli yapılar görülmüştür. 43

Şekil 4. 6. Kolajen örneklerinin FTIR spektrumları. Enz-Kol: Amid A (3307 cm-1), Amid I (1635 cm-1), Amid II (1543 cm-1), Amid III (1237 cm-1). Det-Kol: Amid A (3302 cm-1), Amid I (1647 cm-1), Amid II (1549 cm-1), Amid III (1230 cm-1). 44

Şekil 4. 7. WJ MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD90 (99.84%), CD73 (90.88%), CD44 (99.95%), CD105 (59.04%) ve CD29 (99.85%) pozitifken, HLA-B-C(0.05%),CD69 (1.36%), CD34 (0.03%), CD25 (0.03%), CD19 (0.07%), CD45 (0.02%), CD14 (0.31%). 45

Şekil 4.8. MKH ve HepG2 hücrelerinin Ticari kolajen, Enz-Kol ve Det-Kol grupları ve dECM-Jeli matriksine ekiminin 1., 4. ve 7. günlerinde canlı ve ölü boyama sonuçlarının karşılaştırılması. 48

Şekil 4. 9. Hep G2 ve MKH hücrelerinin 5 günlik proliferasyon artımları. 49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ECM	:Ekstrasellüler Matriks
WJ	:Wharton Jeli
IF/IHC	:İmmünohistokimya
MKH	:Mezenkimal Kök Hücre
Hep G2	:Karaciğer Karsinom Hücre Hattı
DAPİ	:4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
EDTA	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
PSB	:Fosfat Salin Tampon
GAG	:Glikozaminoglikanlar
HYP	:Hidroksiprolin
SEM	:Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	:Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HE	:Hematoksilen-Eozin
MT	:Masson's Trikrom
FBS	:Fetal Sığır Serumu
COL I	:Kolajen I
ng	:Nanogram
mL	:Millilitre
µl	:Mikrolitre
bç	:Baz çifti

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Uzunluğu ve çapı yaklaşık 40 ve 1,5 cm olan göbek kordonu, plasentayı gelişmekte olan fetüse bağlayarak beslenmesini ve oksijenlenmesini sağlar. Göbek kordonu stroması Wharton jeli (WJ) adı verilen jelatinimsi madde içerir. Göbek kordonu esnekliğinin sağlanması, WJ'nin ana rolü, fetal gelişim sırasında göbek damarlarına uygulanan burulma ve basınç gerilmelerine karşı dirençtir (Pennati, 2001). Koruyucu rolüne ek olarak, Wharton jeli, zengin bir mezenkimal stromal hücre ve büyüme faktörü kaynağıdır ve önemli miktarda kolajen, hyaluronik asit ve çeşitli glikozaminoglikanlar gibi hücre dışı matriks (ECM) bileşenleri içerir (Nanaev et al., 1997; SoboleWski et al., 2005). İmmünolojik ayrıcalıklı statüsü sayesinde Wharton jeli, zor iyileşen yaralar için allogreft olarak güvenilir bir seçenek sunar. Bu doğrultuda, taze veya kriyoprezervan Wharton jeli yamaları, cilt grefti prosedürlerinde ve osteomiyelit ile komplike olmuş ayak ve diyabetik ülserlerin tedavisinde kanıtlanmış onarıcı etkileriyle klinik uygulamalarda kullanılmıştır (Caputo et al., 2016). Biyomekanik, immünolojik ve biyokimyasal özelliklerin bu kadar cazip bir kombinasyonu, Wharton jelini rejeneratif tıp alanında çok yönlü bir aday malzeme yapmaktadır (Dubus et al., 2022).

Belirtildiği üzere hücre dışı matriks en iyi kolajen kaynaklarından biri olarak bilinmektedir. İnsan dokusundan elde edilen tam ECM, doğal matriksler için ideal bir kaynak olabilir. Bu açıdan, patolojik olmayan tıbbi prosedürlerden elde edilen plasenta ve göbek kordonu gibi dokular değerli bir tedarik sağlamaktadır.

Birçok faydaya sahip olan Wharton jelinden ECM'yi izole etmek için farklı enzimatik yöntemler kullanılmaktadır (Dan et al., 2017). ECM'den kolajen çıkarmak için asidik veya enzimatik hidroliz metodu kullanılabilmektedir (Engel & Furthmayr, 1987).

Kolajen hücre dışı matrikste en bol bulunan protein yapılardan biri olmakla beraber doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında yaygın olarak çalışılmaktadır. Amino asit monomerlerinden oln kolajen, daha çok memelilerde bulunan ve yaygın olarak dağılan fonksiyonel proteindir. Çeşitli kolajen tipleri vardır. Yaygın tipleri tip I, II, III ve V olmak üzere birçok kolajen türü vardır. Bunlar arasında kolajen tip I, laboratuvar çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanıdır (Maher et al., 2022). Kolajenler, düşük immünojenisiteleri nedeniyle genellikle ilaç taşıyıcıları, doku

mühendisliği malzemeleri, emilebilir cerrahi sütürler, dolgu malzemeleri ve yara pansumanları olarak kullanılır. Ayrıca, bunlar ultraviyole ışınlama, λ-ışınlama ve termal çapraz bağlama gibi fiziksel modifikasyonlar yoluyla kolajen jelleri oluşturmak için kullanılabilabilmektedir (Yang et al., 2023).

Kolajen, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, glikoproteinler ve çeşitli büyüme faktörleri ile birlikte hücre dışı matriksi oluşturur. Farklı insan dokularından ECM hidrojelleri elde edilebilir, bunlar fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerine göre birbirinden farklıdırlar. Bu dokulardan cilt, kemik, yağ gibi kolajen kaynaklı dokuları gösterebiliriz (PatraWalla et al., 2023).

Rylander ve arkadaşları tarafından, kolajen konsantrasyonu, pH ve sıcaklığa dayalı olarak kolajen hidrojellerinin kapsamlı karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve bu parametreler ile kolajen gözenekliğini ve mekanik özelliklerini üzerine çalışılmıştır (Zuniga et al., 2021). Bu çalışmayı baz alarak ekstrakte edeceğimiz kolajen için, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) gibi karakterizasyon metotları kullanılmıştır.

Diğer taraftan, bugüne kadar, mezenkimal kök hücrelerin (MKH) hastalık tedavisindeki potansiyelini araştırmak amacıyla yüzlerce klinik çalışma kaydedilmiştir (Zhou et al., 2016). MKH'lerin tedavilerde kullanımına ilişkin karşılaşılan en büyük zorluklardan biri, MKH'leri fenotiplerini, özelliklerini ve işlevlerini koruyarak kültürde etkin bir şekilde genişletmenin yollarını bulmaktır. MKH'lerin çoğalması için hücre kültürü prosedürleri gereklidir, ancak bu süreç kaçınılmaz olarak kültürdeki hücrelerin özelliklerini değiştirebilecek faktörlere maruz bırakmaktadır. Bu sorunu aşmak için, araştırmacılar kültür koşullarını optimize etmeye yönelik çeşitli stratejiler geliştirmiştir; bunlar arasında büyüme faktörleri veya ECM proteinlerinin eklenmesi yer almaktadır. ECM yalnızca yapısal bir destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda MKH faaliyetlerini düzenlemek için fiziksel, mekanik ve kimyasal ipuçları da sağlar. Kolajen MKH`lerin gelişimi için potansiyel ECM proteinlerinden biri olduğu için ilerici tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağı görülmektedir (Zhou et al., 2016).

Bu tez çalışması, insan göbek kordonundan elde edilen Wharton jelinden hücrelerden arındırılmış hücre dışı matris (dECM) ve sonrasında kolajenin MKH ve karaciğer karsinom hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde canlılık, hücresel

proliferasyon, vb. gibi özellikleri üzerindeki etkilerini sistemik bir biçimde araştırmayı amaçlamaktadır. Bu bağlamda, deneylerde öncelikle insan göbek kordonundan deterjan ve enzimler kullanılarak dECM elde edilip kolajen matriksine dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen matriksin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri spektroskopik ve mikroskopik analizlerle detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Daha sonrasında, mezenkimal kök hücrelerin bu kolajen matriksine ekilmesi ve hücre-matriks etkileşimlerinin, hücresel büyüme kinetiği belirlenmesi amacıyla çeşitli biyolojik tekniklerle incelenmesi yapılmıştır. Bu değerlendirme süreci, mezenkimal kök hücrelerin doku matriksi içindeki konumlandırılması ve hücre proliferasyon sürecindeki rolünün daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu çalışma, doku mühendisliği ve regeneratif tıp alanlarındaki temel araştırmalara yeni bir bakış açısı getirmeyi ve ilerici tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunmayı hedeflemektedir.

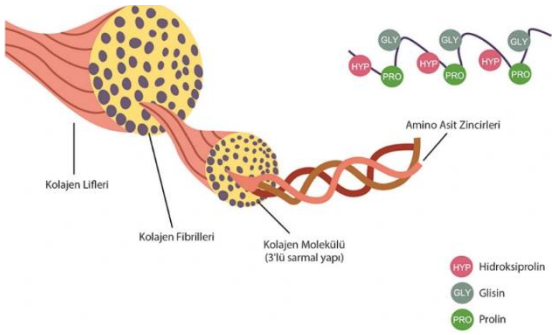
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyomateryallerin Tanımı ve Önemi

Biyomalzemeler alanı, ortaya çıkışından bu yana sürekli gelişerek yeni fikirler ve üretken alt dallar oluşturmuştur. Günümüzde biyomalzemeler, biyolojik tepkileri kontrol etmeyi ve iyileştirmeyi hedefleyen yüzey modifikasyonları, sinyal grubu immobilizasyonu, kontrollü ilaç ve hücre taşıyıcıları ile biyolojik olarak ilham alan malzemeleri kapsamaktadır. Ayrıca, karmaşık 3 boyutlu yapılar tasarlanarak doku mühendisliği ve biyoMEM'ler (biyolojik mikro-elektromekanik sistemler) gibi ileri teknolojiler geliştirilmiştir (Ratner & Bryant, 2004).

2.2. Kolajen ve Özellikleri

Biyomalzemelerin, doğal kolajen bazlı hücre dışı matriksi taklit ederek hücre iskeleleri yerine işlev görmesi amaçlanmaktadır. Doku mühendisliğinde kullanılan bu malzemelerin bileşimi ve özellikleri, doku yenilenmesi ve kolajen mühendisliğinin başarısını belirleyici rol oynamaktadır. Kolajenin yapısı, tipleri ve farklı bağ dokularındaki (kemik, kıkırdak, tendon, deri, kornea) işlevleri ile tip I kolajeni taklit eden nanofibriler sistemler ve sentetik peptitlerdir (Şekil 2.1.). Ayrıca, geleneksel kolajen bazlı biyomalzemelerin kullanımı ve yeni tasarımların geliştirilmesi, doku mühendisliğinde ileri biyoteknolojik ürünlerin oluşumunu desteklemektedir (Cen et al., 2008).



Şekil 2. 1. Kolajenin fibriler yapısı (voonkacollagen.com 2025).

Kolajen, omurgalı canlılarda en bol bulunan ve farklı tipleriyle geniş bir protein ailesini oluşturan temel yapısal proteindir (Shoulders & Raines, 2009). Günümüzde mekanik ve biyolojik özellikleri birbirinden farklı yaklaşık yirmi kolajen tipi tanımlanmıştır. Bazı kolajen türleri, yalnızca belirli dokularda bulunur; örneğin tip II

kolajen esas olarak kıkırdak dokusunda yer alır (Zhang et al., 2003). Tip I, II ve III kolajenler, dokulara çekme dayanıklılığı kazandıran fibrillerin ana bileşenlerini oluştururken; Tip IV, VII, IX, X ve XII gibi tipler, bazal lamina yapılarında veya fibrillerle ilişkili ağ benzeri yapılarda bulunur (Tablo 2.1.).

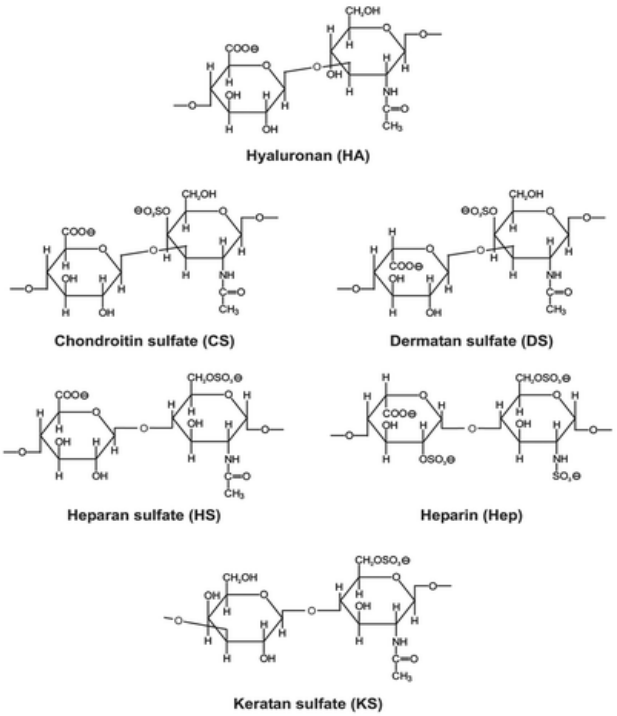
Kolajenler yalnızca mekanik dayanıklılıktan sorumlu değildir; aynı zamanda hücrelerin yüzeylere bağlanması, yayılması ve farklılaşması üzerinde de belirleyici bir rol oynar (Prasad et al., 2002). Bu etkileşimler, hücre davranışlarını yönlendirerek doku organizasyonunun oluşmasına katkı sağlar (Keely et al., 1995).

Tablo 2.1. Kolajen tiplerinin yapısal özellikleri ve kaynakları (Chuaychan, 2016; Mayne, 1993)

Tip	**Molekül Yapısı**	**Kaynak**
I	$[\alpha1(I)_2][\alpha2(I)]$	Deri, kemik, tendon, bağlar ve interstisyel dokular
II	$[\alpha1(II)_3]$	Omurlar arası disk, kıkırdak, camsı cisim
III	$[\alpha1(III)_3]$	Kardiyovasküler damar, rahim, deri, kas
V	$[\alpha1(V)][\alpha2(V)][\alpha3(V)]$	Tip I'e benzer şekilde, hücre kültürleri, fetal dokular; tip I ile ilişkilidir
XI	$[\alpha1(XI)][\alpha2(XI)][\alpha3(XI)]$	Kıkırdak, omurga kıkırdağı ve kemik minesi

Kolajenlerle birlikte, glikozaminoglikanlar (GAG'ler) da hücre dışı matrikste önemli bir yer tutar. GAG'lar, sülfat grupları içerebilen tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan doğal polisakkarit zincirleridir. En yaygın GAG türleri arasında sülfatlanmış kondroitin, keratan ve dermatan sülfatlar ile sülfatlanmamış hyaluronan bulunur. Hücre ve bazal membranlarla daha çok ilişkili olan heparan sülfatlar ise bir diğer önemli GAG grubunu oluşturur. Hyaluronan dışındaki tüm GAG'ler, protein omurgalarına kovalent olarak bağlanarak proteoglikan adı verilen kompleks yapıları meydana getirir.

Kolajen bazlı biyomalzemeler, deri, kemik, kıkırdak ve sinir dokusu (Jafari et al., 2020) gibi alanlarda kullanılarak, rejeneratif tıp alanında umut verici sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Bu biyomalzemeler, sadece yapısal destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre etkileşimlerini yönlendirerek iyileşme süreçlerini hızlandırabilir. Kolajen, biyolojik uyumluluğu sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında geniş bir kullanım alanına sahiptir ve gelecekte bu alandaki. gelişmeler, tıbbî tedavi ve iyileşme süreçlerinde önemli bir yer tutacaktır (Parenteau-Bareil et al., 2010). ECM'nin kolajen kısmı, yalnızca yapısal destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda dokuların su alımını da sınırlar. Kolajenin kolajenaz gibi enzimlerle parçalanması su içeriğini artırırken, kolajenin içeriği tip I kolajen, GAG'lar ve hidroksiapatit gibi mineral bileşenlerden oluşur. Kolajen tip I, üç sarmal zincirden oluşan çubuk benzeri bir yapıya sahiptir; her bir zincir yaklaşık 1020 amino asit kalıntısı içerir, toplam moleküler ağırlığı yaklaşık 300 kDa, uzunluğu 280 nm ve çapı 1,4 nm'dir (Gelse et al., 2003; Schrieber & Gareis, 2007; Sorushanova et al., 2021). GAG'lar, ECM'de bulunan uzun, dallanmamış ve polidispers polisakkarit zincirleridir. Normalde D-glukuronik asit (GlcUA) veya L-iduronik asit (IdoUA) ve D-glukozamin (GlcNAc) veya D-galaktozamin (GalNAc) kalıntılarından oluşan tekrarlayan disakkarit üniteleri içerirler. Tek GAG olan hyaluronan (HA) sülfatlanmamış ve basit bir yapıya sahipken, diğer GAG'lar kondroitin sülfat (CS), dermatan sülfat (DS), heparan sülfat (HS) ve keratan sülfat (KS) gibi çeşitli biyosentetik modifikasyonlara uğrar. Bu modifikasyonlar, sülfatlanma, epimerizasyon ve de-asetilasyon gibi yollarla zincire eklenir ve GAG'ların biyolojik işlevlerini belirler. Keratan sülfat (KS), diğer GAG'lara kıyasla daha az bulunur ve üronik asit yerine galaktoz içerir. Kondroitin sülfat A/C ve dermatan sülfat (CS B) disakkaritleri sülfatlanma konumlarıyla farklılık gösterir ve bu heterojen yapı, GAG'ların spesifik işlevlerini sağlar. Heparin (Hep) ve heparan sülfat (HS) ise güçlü negatif yüklü ve yüksek sülfatlanma derecesine sahip GAG'lardır, fakat ECM'de daha az bol bulunurlar (Şekil 2.2.). GAG'lar, kolajen ile birlikte ECM'de dokuların su tutulumunu, viskoelastik özelliklerini ve biyomekanik dayanıklılığını düzenler. Bu sayede doku sağlığı ve fonksiyonunun korunmasında kritik rol oynarlar (Tush et al., 2019).



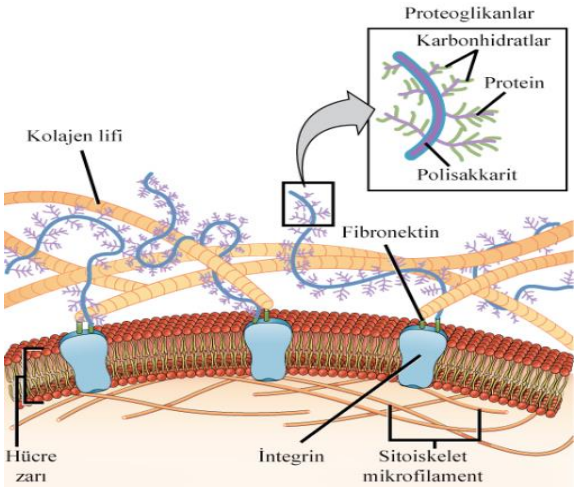
Şekil 2. 2. GAG'ların disakkarit tekrarlayan birimlerinin yapıları. (Tush et al., 2019).

2.2.1. Biyomedikal uygulamalarda kullanım alanları

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, hasarlı veya hastalıklı dokuların yerine işlevsel doku ve organlar geliştirmeyi amaçlamaktadır. 20. yüzyılın başından beri hücreler izole edilip kültürlense de, bu kültürler genellikle 2B yapıda kalmıştır. Oysa çok hücreli organizmalar, yapısal bütünlüğün yanı sıra işlevsel sınırların ve mikro ortamların oluşumu için 3B bir çerçeveye ihtiyaç duyar. Bu nedenle, hücre biyolojisi ile malzeme biliminin entegrasyonu ve hücrelerin 3B ortamlarda büyütülmesi gereklidir. Son yıllarda doku mühendisliğindeki ilerlemeler, hücre davranışını yönlendiren biyomalzemelerin geliştirilmesi ve hücrelerin biyolojik olarak parçalanabilir 3B iskelelerle birleştirilerek yeni dokuların oluşturulmasına dayanmaktadır (Hussey et al., 2018). Biyomalzemeler, tıpta, özellikle implantlar, protezler, doku mühendisliği ve ilaç taşıma sistemlerinde vazgeçilmez bir yer tutmaktadır. Avrupa Biyomalzemeler Topluluğu'na göre biyomalzemeler, organ fonksiyonlarını iyileştirmek veya tedavi etmek için vücuda yerleştirilebilen, biyolojik uyumlu malzemelerdir. Bu malzemeler, hem sentetik hem de doğal kökenli olabilir ve vücut tarafından kabul edilmelerini sağlayan çeşitli özelliklere sahip olabilirler (Oleksy et al., 2023).

2.3. Doku Mühendisliğinde Ekstraselüler Matriks

ECM, hücrelerin çevresini saran, doku yapısının temelini oluşturan biyolojik bir yapıdır. İnsan kaynaklı ECM kullanımı, doku mühendisliğinde önemli bir yöntemdir. Bu matriksi elde etmek için, insan dokularından hücreler çıkarılır, böylece doğal ECM, biyolojik uyumluluk sağlayan bir malzeme olarak kullanılabilir. ECM, vücudun doğal iyileşme süreçlerini destekler, bu nedenle yara iyileşmesi ve doku onarımı gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılır (Chen & Liu, 2016). Doku mühendisliği iskeleleri, hücrelerle etkili bir şekilde etkileşime girebilmek için doğal ECM yapısal ve biyokimyasal özelliklerini taklit edecek şekilde tasarlanmaktadır. ECM; kolajen, fibronektin, laminin ve proteoglikan gibi çok sayıda makromolekül içerir ve bu bileşenler aracılığıyla biyolojik aktivitesini sürdürür (Şekil 2.3.). Özellikle ECM üzerindeki belirli protein dizileri, integrin adı verilen hücre yüzeyi reseptörleri tarafından tanınarak hücre adezyonunu ve sinyal iletimini başlatır. Bu etkileşimler, hücre davranışlarını, farklılaşmayı ve gen ekspresyonunu doğrudan etkileyen karmaşık biyokimyasal yolları harekete geçirir. Dolayısıyla, belirli bir dokuda bulunan ECM proteinlerinin bileşimi, o dokudaki hücrelerin morfolojisi ve fonksiyonunun belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Place et al., 2009).

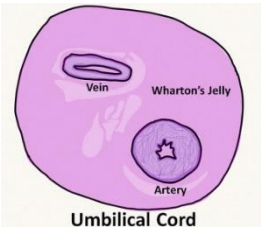


Şekil 2. 3. Ekstrasellüler matriks yapısı ve bileşenleri (OpenStax Biology 2025).

2.4. Wharton Jeli ve Yapısal Özellikleri

İnsan göbek kordonu, invaziv olmayan elde edilişi, yüksek hücre verimi ve mezenkimal stromal hücrelerle benzer fenotipi nedeniyle hücre tedavisinde önemli bir kaynak haline gelmiştir. Klinik ve klinik öncesi çalışmalarda yaygın olarak

kullanılmakta, terapötik potansiyeli giderek daha fazla vurgulanmaktadır (Davies et al., 2017). Doğum sonrası gelişimi destekleyen bu dokular genellikle tıbbi atık olarak değerlendirilir. Ancak bu dokulardan kök hücre elde etmek, terapötik açıdan değerli hücrelere ulaşmak için güvenli ve invaziv olmayan bir yöntemdir. Bu kaynaklar arasında amniyon, amniyotik sıvı, göbek kordonu kanı, plasenta, göbek kordonu damarları ve Wharton jeli (göbek kordonu dokusu) yer alır (Taghizadeh et al., 2011). Plasentalı memelilerde göbek kordonu, plasentayı fetüse bağlayarak besin ve gaz alışverişini sağlar. İnsanlarda doğumda yaklaşık 45–60 cm uzunluğunda ve 1–2 cm kalınlığındadır. Üç damardan (bir toplardamar, iki atardamar) olan bu yapı, mukoid bağ dokusu olan Wharton jeli (WJ) ile çevrilidir ve tek katlı amniyotik epitel ile kaplanmıştır (Şekil 2.4.). Wharton jeli damarları destekler, kıvrılmayı önler ve damar dışı ya da sinir ağı içermez. Türler arası yapısal farklılıklar nedeniyle, göbek kordonundan hücre izolasyonunda kullanılan yöntemler hücre popülasyonlarında değişkenlik oluşturabilir. Wharton Jeli, insan göbek kordonunda damarları çevreleyen mukoid bağ dokusudur ve kordonun yapısal bütünlüğünü koruyarak damarların bükülmesini önler. Hücre açısından zengin bu doku, mezenkimal stromal hücrelerin (MSC) önemli bir kaynağı olarak doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta büyük ilgi görmektedir (Davies et al., 2017).



Şekil 2. 4. Göbek Kordonu Kesiti: Damarlar ve Wharton Jeli (Watson et al., 2015)

2.4.1. Wharton jeli tabanlı ekstraselüler matriks

Son yıllarda, göbek kordonunun bir parçası olan hücresizleştirilmiş Wharton jeli (dWJ) kaynaklı ekstraselüler matriksin, doku mühendisliğinde iskele materyali olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Beiki et al., 2017; Jadalannagari et al., 2017). Göbek kordonu damarlarını çevreleyen mukoid bir bağ dokusu olan Wharton jeli, kolajenler, GAG'ler (Franc et al., 1998) ile insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri açısından zengin bir ECM bileşenidir (BańkoWski et al., 1996). Yapılan çalışmalar, dWJ'den elde edilen iskelelerin biyouyumlu özellikte olduğunu ve hücre yapışması,

penetrasyonu, büyümesi ile çoğalmasını destekleyen uygun mekanik özellikler sergilediğini ortaya koymuştur (SoboleWski et al., 2005). Hücre dışı matriks temelli hidrojeller, rejeneratif tıpta biyouyumlu ve doku yenilenmesini destekleyici özellikleri nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. Anlatıldığı üzere Wharton jeli, insan göbek kordonunda yer alan ve ECM açısından zengin, jel benzeri bir dokudur. Hayvansal kaynaklı ECM'lere göre daha ince fibril yapısına sahip olan WJ-ECM, daha düşük sertlik, azalmış geçirgenlik ve daha az sinerez gösterir. Ayrıca hemostatik özellikleri güçlüdür, oksidatif stresi azaltır ve makrofajlarda anti-inflamatuar bir yanıtı destekler. İn vivo olarak yüksek biyouyumluluk ve düşük immün yanıt göstermesi, WJ-ECM'yi rejeneratif tıp, hücre kültürü ve yara iyileşmesi uygulamaları için sürdürülebilir ve klinik açıdan değerli bir biyomalzeme haline getirmektedir (Lavrand et al., 2025; Penolazzi et al., 2020). Özellikle damar doku mühendisliğinde, mezankimal kök hücrelerin endotelyal hücrelere dönüşümünü kolaylaştırarak fonksiyonel damar yapılarının oluşumuna katkı sağlar. Doğal ve biyouyumlu bir kaynak olması, toksik kimyasallar kullanılmadan elde edilebilmesi ve anti-inflamatuar etkileriyle WJ-ECM, rejeneratif tıp uygulamalarında güvenli ve etkili bir biyomateryal olarak önemli bir potansiyel taşımaktadır (Dan et al., 2017).

2.4.2. Üretim yöntemleri ve işleme süreçleri

Hücre dışı matriks, hücreleri çevreleyen ve onlara yapısal destek sağlayan protein, polisakkarit ve diğer biyopolimerlerden oluşan karmaşık bir ağdır. Vücutta doku bütünlüğünü, elastikiyeti ve dayanıklılığı korur. Genellikle doğal dokulardan enzimatik veya kimyasal işlemlerle hücrelerin uzaklaştırılması (hücresizleştirme) yoluyla elde edilir. ECM, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta, hücrelerin tutunması ve yeni doku oluşumunu destekleyen biyolojik bir iskele olarak kullanılır. Ancak yapay olarak üretilen ECM'lerin biyomekanik özellikleri, doğal ECM kadar etkili olamayabilmektedir (Tush et al., 2019).

Hücresizleştirme, dokudaki hücreleri ve nükleer materyali (DNA ve RNA) çıkarırken, ECM'nin doğal yapısını ve bileşenlerini koruma işlemidir. Bu sayede kolajen, elastin, proteoglikanlar ve GAG'ler gibi yapılar dokunun mekanik ve biyolojik işlevini sürdürür. İşlem genellikle yıkama, durulama ve sterilizasyon aşamalarını içerir; yıkamada deterjan veya enzimlerle hücreler parçalanır, durulamada artık maddeler temizlenir ve sterilizasyonda antijenik bileşenler uzaklaştırılır. Hücresizleştirilmiş ECM, ya tam bir organ iskeleti ya da saflaştırılmış doku formunda

elde edilir ve kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için uygun bir mikro ortam sağlar. Bu yöntem, organ yapısının korunmasını sağlayarak yeniden hücreleştirme ve nakil gibi ileri uygulamalara imkan tanır (Choudhury et al., 2020).

Hücresizleştirme, dokulardaki hücrelerin ve nükleer materyalin uzaklaştırılması işlemi olup, ECM'nin doğal yapısını korumayı amaçlar. Bu süreçte kullanılan genel yöntemler fiziksel, kimyasal ve enzimatik olarak sınıflandırılabilir. Fiziksel yöntemler, ani dondurma, doğrudan basınç, sonikasyon ve çalkalama gibi tekniklerle hücre zarlarını parçalayarak hücre lizisine yol açar; ECM'nin üç boyutlu mimarisi genellikle korunur. Kimyasal yöntemler ise alkali ve asitler, non-iyonik, iyonik ve zWitteriyonik deterjanlar, tri(n-bütil)fosfat (TBP) ve hipotonik/hipertonik çözeltilerle hücresel materyali uzaklaştırır; bazı kimyasallar, özellikle GAG ve bazı proteinler üzerinde kısmi etkiler gösterebilir. Enzimatik yöntemler tripsin veya nükleazlar kullanarak hücreleri ve DNA/RNA'yı parçalar; doğru süre ve konsantrasyonla ECM'nin kolajen ve lifli yapısı korunabilir. Hücresizleştirme sırasında proteaz inhibitörleri eklenerek ECM'nin proteolitik hasarı önlenir, ayrıca antibiyotikler kullanılarak kontaminasyon riski azaltılır. Tüm bu adımların amacı, dokunun doğal mekanik ve biyokimyasal özelliklerini koruyarak, hücresiz fakat biyolojik olarak işlevsel ECM elde etmektir (Gilbert et al., 2006; Kalyuzhnaya et al., 2020)

2.4.3. Biyomedikal uygulamalarda kullanım alanları

Wharton's Jelly kaynaklı ECM, çok çeşitli biyomedikal uygulamalar için güçlü bir temel sunmaktadır. Bu alanlar, doku mühendisliği, yara iyileşmesi, kök hücre tedavileri ve diğer yenilikçi tedavi yöntemlerini içermektedir. WJ ECM'nin biyolojik ve biyomekanik özellikleri, hücresel etkileşimleri ve doku entegrasyonunu optimize ederek, gelecekteki tedavi yaklaşımlarının şekillenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Biyomedikal uygulamalarda kullanım alanlarına bazı örnekler gosterile bilir: Wharton's Jelly kaynaklı ECM, vasküler doku mühendisliğinde önemli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Vasküler hastalıklar, batı dünyasında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve vasküler greftler, bu hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Ancak, mevcut sentetik greftler çoğu zaman iyileşme süreçlerinde zorluklarla karşılaşmaktadır. WJ türevli ECM, vasküler greft uygulamalarında mükemmel iyileşme özellikleri göstermiştir. Yapılan hayvan deneyleri, WJ-ECM'nin erken kılcal penetrasyon ve tam endotelizasyon gibi histolojik özelliklerle, normal kan

damarlarına benzer bir iyileşme sağladığını ortaya koymuştur. Bu özellikler, WJ-ECM'nin biyoinertlik ve biyobozunurluk gibi kritik özelliklerini sergileyerek vasküler doku mühendisliğinde umut verici bir malzeme kaynağı olduğunu göstermektedir (Bakhtyar et al., 2018).

Deri yaralanmalarının tedavisinde de WJ-ECM kullanımı potansiyel taşımaktadır. Cilt ikameleri, yara iyileşmesinde önemli bir yere sahiptir, ancak mevcut ikameler çoğu zaman sınırlı donör kaynakları, enfeksiyon riski veya uyumsuzluk gibi sorunlar yaşar. WJ türevli ECM, özellikle cilt yenilenmesi konusunda büyük bir umut vadetmektedir. Biyolojik ve bileşimsel özellikleri nedeniyle, WJ-ECM'nin tam kalınlıktaki cilt yaralarında biyomimetik bir iskele olarak kullanılması, yara iyileşme sürecini hızlandırabilir. Dondurarak kurutulmuş WJ-ECM'den üretilen süngerimsi iskeleler, fibroblastların bağlanmasını, penetrasyonunu ve çoğalmasını iyileştirerek yara iyileşmesini hızlandırabilir (Bakhtyar et al., 2018).

Eklem kıkırdağı hasarının tedavisi, tıbbi bir zorluk teşkil etmektedir. Kıkırdak, sınırlı rejenerasyon kapasitesine sahip bir dokudur ve bu nedenle doku mühendisliği uygulamaları bu tür yaralanmaların tedavisinde önemli bir yer tutmaktadır. WJ-ECM, kıkırdak hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyerek eklem kıkırdağının yenilenmesinde kullanılabilecek bir biyomimetik iskele olarak umut vermektedir. WJ-ECM, özellikle kondrositlerin düzenlenmesinde rol oynayan ECM bileşenleri içerdiği için, kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında etkili bir çözüm olabilir (Gupta et al., 2021).

Kemik doku mühendisliği, doku mühendisliğinin önemli bir dalıdır ve başarılı bir tedavi için uygun hücre kaynakları, iskeleler ve büyüme faktörlerinin bir arada kullanılması gerekmektedir. Wharton Jeli türevi ECM, kemik doku mühendisliğinde de önemli bir yer tutmaktadır. WJ-ECM, tip I kolajen gibi kemikle benzer bileşenler içerdiğinden, kemik dokusunun rejenerasyonunu teşvik edebilir.

Wharton Jeli kaynaklı ekstraselüler matriks, biyomedikal uygulamalarda geniş bir potansiyele sahiptir. Vasküler, deri, kıkırdak ve kemik doku mühendisliği gibi alanlarda WJ türevli ECM kullanımı, doku iyileşmesini ve rejenerasyonunu hızlandırmak ve iyileştirmek için etkili bir yöntem sunmaktadır. Ayrıca, WJ-ECM'nin biyouyumluluğu, biyobozunurluğu ve içerdiği biyoaktif moleküller, bu malzemenin doku mühendisliğinde önemli bir alternatif olduğunu kanıtlamaktadır. Gelecekteki

araştırmalar, WJ-ECM'nin bu alanlardaki uygulamalarını daha da geliştirebilir ve biyomedikal tedavi alanında devrim yaratabilir (Gupta et al., 2021).

2.5. Kök Hücreler ve Kaynakları

Kök hücreler, rejeneratif tıbbın çeşitli uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kök hücrelerin farklı kaynaklardan (Tablo 2.2.) elde edilmesine yönelik geliştirilen yenilikçi yöntemler, hücre tabanlı tedaviler için yeni alternatifler sunduğunu düşündürmektedir (Hipp & Atala, 2008). Kök hücreler, iki temel özelliğe sahiptir: farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneği ve kendilerini yenileyebilme kapasitesi. İki ana kök hücre türü bulunmaktadır: Embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler. Embriyonik kök hücreler (ESC), blastosistin iç hücre kütlesinden elde edilir ve tümör oluşumu riski taşıyabilir; ayrıca insan ESC'lerinin kullanımı etik ve yasal tartışmalara yol açmaktadır. Buna karşılık, erişkin kök hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler (ayrı bir başlık altında incelenmiştir), bu tür etik ve yasal sorunlar açısından daha güvenli ve uygulanabilir bir kaynaktır (Ding et al., 2011).

Embriyonik kök hücreleri, preimplantasyon blastosistten iç hücre kütlesi kullanılarak türetilir ve üç germ tabakasına farklılaşabilme yeteneğine sahiptir, yani pluripotenttirler. Fare ES hücreleri besleyici fibroblastlarla kültürde farklılaşmadan çoğaltılabilirken, insan ES hücreleri temel fibroblast büyüme faktörü ile matrigel/laminin üzerinde kültür gerektirir. İnsan ES hücreleri, teratom testi ile pluripotentliklerini doğrular ve SSEA-3/4 antijenlerini ifade eder. ES hücreleri, embriyonik gelişim, pluripotensi ve hücre soyunu in vitro incelemek için önemli araştırma araçlarıdır. İnsan ES hücreleri terapötik kullanım için hayvansız sistemlerde yetiştirilmektedir. Somatik nükleer transfer yoluyla insan ES hücreleri üretmek teknik olarak mümkün olsa da etik ve pratik kısıtlar nedeniyle sınırlıdır (Rippon & Bishop, 2004).

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler, İndüklenmiş pluripotent kök (iPS) hücreleri, Takahashi ve Yamanaka'nın öncülüğünde geliştirilen yeniden programlama teknolojisi ile çeşitli somatik hücre tiplerinden türetilir (Takahashi & Yamanaka, 2006) ve ES hücrelerine benzer pluripotent özellikler gösterir. Pluripotentlik, üç germ katmanından (ektoderm, mezoderm, endoderm) hücreler üretebilme kapasitesini ifade eder ve teorik olarak tüm organizmayı oluşturabilme potansiyelini de kapsar. iPS hücreleri ve ES hücreleri işlevsel olarak birçok açıdan eşdeğer olsa da, kökenleri ve

türetilme yöntemleri nedeniyle bazı ince farklılıklar taşırlar ve araştırmalarda tamamlayıcı roller oynarlar. Pluripotent kök hücreler, erken embriyonik gelişimi incelemek, hastalık modelleri oluşturmak ve potansiyel olarak hücre terapisi uygulamaları geliştirmek için önemli bir araçtır. İnsan iPS hücrelerinin ES hücreleriyle karşılaştırmalı çalışmaları, her iki hücre tipinin özelliklerini daha iyi anlamayı ve farklı uygulamalar için uygunluklarını değerlendirmeyi sağlar. Bu hücreler, araştırmalarda etik kaygıları azaltan ve kişiye özel tedavi potansiyeli sunan bir alternatif olarak öne çıkar (Robinton & Daley, 2012).

Amniyotik sıvı kök hücreleri (hAFSC), son yıllarda rejeneratif tıp alanında artan ilgi gören pluripotent hücre kaynaklarından biridir. Amniyotik sıvı, fetüsün genetik ve konjenital hastalıkları için güvenli bir tarama aracı olarak uzun süredir kullanılmakla birlikte, çeşitli progenitör hücreler de içerir. Bu hücreler, miyojenik, nöronal, adipojenik, hepatik, osteojenik ve endotelyal soy hücrelerine farklılaşabilir ve her üç germ katmanına ait hücre tiplerini türetebilir. hAFSC'ler, embriyonik kök hücreler kadar çoğalabilir ve geniş farklılaşma potansiyeline sahip olmalarına rağmen, etik kaygılar ve teratom riski oluşturmaz. İnsan amniyotik sıvısındaki kök hücreler, mezenkimal ve hematopoetik progenitör hücreleri de içerir ve fetüsün gelişim sürecine bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Bu hücreler, böbrek, kalp ve beyin gibi organlar için protein ve genetik belirteçler ifade edebilir. hAFSC'ler, in vitro olarak farklı hücre hatlarına yönlendirilebilir ve in vivo uygulamalarda doku rejenerasyonu için umut verici sonuçlar göstermektedir. Araştırmalar, amniyotik sıvı kök hücrelerinin kapsamlı karakterizasyonunu ve klinik uygulama potansiyelini geliştirmeye devam etmektedir (Perin et al., 2008).

Tablo 2.2. Kök hücre tipleri ve kaynakları.

Hücre Tipi	Kısaltma	Kaynak
Embriyonik kök hücre	ESC (Embryonic Stem Cell)	Blastosistin iç hücre kütlesinden elde edilir.
Erişkin kök hücre	ASC (Adult Stem Cell)	Vücut dokularından (kemik iliği, yağ dokusu, kas, deri vb.) elde edilir.

Tablo 2.3. Kök hücre tipleri ve kaynakları (devam ediyor).

Mezenkimal kök hücre	MSC (Mesenchymal Stem Cell)	Kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu, plasenta, diş pulpası gibi mezenkimal dokulardan elde edilir.
Hematopoetik kök hücre	HSC (Hematopoietic Stem Cell)	Kemik iliği, periferik kan ve göbek kordon kanından elde edilir.
İndüklenmiş pluripotent kök hücre	iPSC (Induced Pluripotent Stem Cell)	Somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla laboratuvar ortamında elde edilir.
Amniyotik sıvı kök hücresi	hAFSC (Human Amniotic Fluid Stem Cell)	Gebelik sırasında alınan amniyotik sıvıdan elde edilir.

2.5.1. Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), ilk kez 1970'lerde Friedenstein ve arkadaşları tarafından kemik iliğinde tanımlanmış, plastik yüzeye tutunan iğ şeklinde hücre kolonileri oluşturan hücrelerdir (Friedenstein et al., 1976). Mezoderm kökenli olup kemik, kıkırdak ve yağ gibi farklı dokulara farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler. "MKH" terimi, hem in vivo doğal kök hücreleri hem de kültür ortamında elde edilen hücreleri kapsar. Kültürde MKH'ler, kök hücrelerden olgun stromal hücrelere kadar uzanan heterojen bir hücre grubudur (HorWitz et al., 2005). Son çalışmalar, bazı MKH'lerin embriyonik nöro-epitelyal hücrelerden türediğini göstermiştir. Başlangıçta kemik iliğinde tanımlanan MKH'ler, daha sonra pek çok dokuda ve damar duvarındaki perisitlerde de saptanmıştır (Crisan et al., 2008).

Uluslararası Hücre Terapisi Derneği (ISCT), mezenkimal kök hücreleri üç temel özellik ile tanımlar: plastiğe yapışma yeteneği, belirli yüzey belirteçlerinin

(CD73, CD90, CD105) pozitif; hematopoietik belirteçler CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR'nin ise negatif ekspresyonu ve osteojenik, kondrojenik ve adipojenik hatlara farklılaşabilme kapasitesi. Bu özellikler tüm kültüre edilmiş MKH'ler için geçerli olmakla birlikte, doku kökenine bağlı bazı farklılıklar görülebilir. Örneğin, yağ dokusundan türetilen MKH'ler CD34 ve CD54 yüzey antijenlerini de eksprese etmektedir (Crisan et al., 2008).

Mezenkimal kök hücreler, in vitro koşullarda osteoblastlara veya kondrositlere farklılaşabildiği gibi, benzer şekilde in vivo ortamda da bu hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahiptir. MKH'lerin fonksiyonel osteoblastlara farklılaşarak hayvan modellerinde ve insanlarda kemik dokusuna katkı sağladığı gösterilmiş; bu durum, osteogenezis imperfekta ve kemik kaybı tedavilerinde umut verici sonuçlar doğurmuştur (HorWitz et al., 2002; Quarto et al., 2001). Ayrıca MKH'ler, hematopoietik kök hücre nişlerinin bir parçası olup, özellikle CD146 eksprese eden kemik iliği sub-endotelyal hücreleri hematopoietik mikro ortamın yeniden oluşumuna katkıda bulunur (Sacchetti et al., 2007).

MKH'lerin çok yönlü karakteri ve mezodermal soylar arasındaki plastisiteleri, soy belirlenimiyle desteklenmektedir (Delorme et al., 2009). Ancak, iskelet kası veya miyokardiyal hücreler gibi diğer mezodermal hatlara farklılaşma potansiyelleri hâlâ tartışmalıdır ve bu yetenek, büyük ölçüde hücrenin kaynaklandığı dokuya bağlı görünmektedir. Örneğin, yağ dokusundan elde edilen MKH'ler kardiyomiyosit benzeri hücrelere dönüşebilmektedir (Planat-Benard et al., 2004).

1990'lardan bu yana yapılan birçok çalışma, tartışmalara rağmen, MKH'lerin mezoderm dışı hücre tiplerine (örneğin nöron, hepatosit veya epitel hücreleri) dönüşebilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Woodbury et al., 2000). Farklılaşma öncesi dönemde MKH'lerin βIII-tubulin gibi nöro-epitelyal belirteçleri eksprese ettiği bildirilmiştir. Bu durum, Dov Zipori'nin öne sürdüğü kök hücre esneklik modeli veya MKH'lerin embriyonik kökeni ile ilişkili olabilir; ancak nöroektoderm kaynaklı dokulara doğrudan farklılaşma kapasiteleriyle ilişkili olmayabilir (Zipori, 2004).

Mezenkimal kök hücreler, sahip oldukları çeşitli özgün özellikler nedeniyle belirgin bir alloreaktivite oluşturmazlar. İnsan MKH'leri, majör histouyumluluk kompleksi (MHC) sınıf I antijenlerini düşük düzeyde ifade ederken, MHC sınıf II ve

yardımcı uyarıcı moleküller olan CD40, CD80 ve CD86'yı eksprese etmez (Tse et al., 2003). Bu durum, MKH'leri alloreaktif doğal öldürücü (NK) hücre aracılı lizise karşı korur (Rasmusson et al., 2003). Ayrıca insan MKH'leri, HLA-G adı verilen klasik olmayan bir MHC sınıf I antijenini ifade eder; bu antijen, MKH'lere karşı gelişebilecek bağışıklık yanıtını baskılayabilir. Ancak HLA-G ekspresyonunun kültür ortamında azaldığı gözlemlenmiştir (Nasef et al., 2007).

Hayvan kaynaklı MKH'ler üzerinde yapılan çalışmalarda ise bazı çelişkili bulgular bildirilmiştir. Hem in vitro hem de in vivo koşullarda, fare kaynaklı allojenik MKH'lerin immünokompetan farelerde bağışıklık yanıtı oluşturabildiği gösterilmiştir (Eliopoulos et al., 2005). MKH'lerin immünojenik özelliklerinin kültür koşullarından etkilendiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, allojenik insan MKH'leriyle tedavi edilen hastalarda anti-MSC antikorlarının gelişmediği ve T hücresi aracılı bir immün yanıtın gözlenmediği rapor edilmiştir (Sundin et al., 2007).

2.5.2. MKH'lerin rejeneratif potansiyeli

MKH'lerin uygulama alanları geniş olmakla birlikte, çeşitli kaynaklardan elde edilen MKH'lerin özelliklerindeki farklılıklar, bu hücrelerin kullanımında bazı zorluklara neden olabilir. Bu zorluklar, hücrelerin izole edilme yöntemleri, kültür koşulları, donör yaşındaki farklılıklar ve kaynakların doğası gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, MKH'lerin rejeneratif tıp ve hücre terapisi alanlarındaki potansiyeli hala büyük bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir (BroWn et al., 2019).

Günümüzde mezenkimal kök hücrelerin allojenik hematopoietik kök hücre (HSC) nakillerinde iki temel klinik uygulama alanı bulunmaktadır: greft-konak hastalığının (GvHD) önlenmesi veya tedavisi ve nakil sonrası hücre tutunmasının artırılması.

Doku nakli ve otoimmünite üzerindeki MKH etkilerini incelemek amacıyla çeşitli hayvan modelleri kullanılmıştır. Fare modellerinde, böbrek kapsülü altına nakledilen allojenik veya ksenojenik HSC'lerle birlikte MKH uygulaması, sitotoredüktif ön işlemler yapılmadan bile uzun süreli donör toleransı ve düşük GvHD insidansı ile sonuçlanmıştır (Bingaman et al., 2000; Gurevitch et al., 1999). Benzer şekilde, allojenik HSC'ler ve insan MKH'lerinin birlikte rahim içine nakledildiği fetal koyun modellerinde hızlı ve etkili hematopoietik yeniden yapılanma gözlenmiştir

(Liechty et al., 2000). Ayrıca, yağ dokusundan elde edilen MKH'ler kullanılarak yapılan çalışmalarda, haplo-özdeş HSC nakli yapılan farelerde ölümcül GvHD'nin baskılandığı, ancak etkinin devamı için tekrarlayan MKH infüzyonlarına ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Yañez et al., 2006).

MKH'lerin HSC tutunmasını artırıcı etkisinin doğrudan immünomodülatör özelliklerinden mi kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. MKH'lerin salgıladığı sitokinler, hücrelerin kalıcılığına gerek kalmadan HSC'lerin yuvalanmasını ve çoğalmasını destekleyebilir. Örneğin, insan kordon kanı CD34+ hücreleriyle birlikte ışınlanmış NOD/SCID farelerine uygulanan insan MSC'leri, hematolojik iyileşmeyi hızlandırmış ancak nakilden altı hafta sonra kemik iliğinde tespit edilmemiştir (in't Anker et al., 2003). Diğer çalışmalarda ise MKH'lerin 4–10 hafta boyunca kemik iliği mikroçevresinde varlığını sürdürdüğü ve hem çözünür faktörler hem de hücre temasları yoluyla hematopoiezin desteklenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Bensidhoum et al., 2004).

Bununla birlikte, MHC uyumsuzluğu durumunda MSC'lerin konak tarafından kabulü sınırlanabilir. İnsan klinik uygulamalarında, otolog veya allojenik HSC nakli sırasında MSC infüzyonunun hematopoietik iyileşmeyi hızlandırdığı, greft başarısızlığı riskini azalttığı ve akut GvHD insidansını düşürdüğü gösterilmiştir (Ball et al., 2007).

2.6. Hepatoselüler Karsinom Hücre Hatları - HepG2

Karaciğer kanseri, en sık teşhis edilen altıncı kanser türü olup, 2020 yılında dünya genelinde kanserle ilişkili ölümlerin üçüncü önde gelen nedenlerinden biridir. Hepatosit karsinomu (HCC), birincil karaciğer kanserlerinin en yaygın türü olarak tanımlanır. HCC'nin tedavisi karaciğer rezeksiyonu veya karaciğer nakli gibi sınırlı küratif yaklaşımlarla mümkündür. Ancak, bu yöntemler yalnızca erken evredeki HCC hastalarına uygulanabilir ve ileri evrelerde etkili tedavi seçenekleri sınırlıdır. Bununla birlikte, mevcut tedaviler genellikle toksik yan etkilerle birlikte tatmin edici olmayan uzun vadeli başarı oranlarına sahiptir. Bu nedenle, HCC'nin tanı ve tedavisi için yenilikçi yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (Schicht et al., 2022).

HepG2 hücre hattının yaygın olarak kullanılmasının olası nedenlerinden biri, birincil karaciğer kanseri vakalarının çoğunun hepatosellüler karsinom (HCC) olmasıdır (Ringelhan et al., 2018). Karaciğer kanseri, dünya genelinde kanser kaynaklı

ölümler arasında üçüncü sırada yer almaktadır (Sung et al., 2021). Birincil karaciğer kanseri türleri arasında HCC vakaların %80–90'ını oluştururken, intrahepatik kolanjiyokarsinom (ICCA) %10–15, hepatoblastom (HB) ve anjiyosarkom (AS) daha düşük oranlarda görülmektedir (Ananthakrishnan et al., 2006). Çocuklarda en sık görülen kötü huylu karaciğer tümörü ise hepatoblastom olup vakaların yaklaşık %70'ini oluşturur; HCC bu yaş grubunda %27 oranında görülür (Angelico et al., 2018).

Karaciğer kanserinin türleri ve alt tipleri, sitolojik ve moleküler özellikler açısından farklılık gösterir. Hepatoblastomda ayırt edici moleküler özelliklerden biri, CTNNB1 geninin üçüncü ekzondaki delesyon veya insersiyon mutasyonlarıdır; çoğu zaman serin/treonin kalıntılarının kaybı (S33, S37, S45 ve T41 kodonları) ve alanin-tirozin değişimi (T41A) görülür (Eichenmüller et al., 2014). Bu mutasyonlar hastaların %50–90'ında saptanır. HCC'de ise CTNNB1 mutasyonları daha az yaygındır (%20–40 hasta) (Tornesello et al., 2013) ve 32, 33, 38 ve 45 kodonlarında değişikliklerle kendini gösterir (Javanmard et al., 2020).

HepG2 hücre hattı, insan hepatoselüler karsinomu (HCC) modelleyen ve karaciğer kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir in vitro sistemdir. HCC, dünya genelinde sık görülen ve yüksek mortaliteye sahip bir tümör olup, özellikle kronik hepatit B enfeksiyonu ve aflatoksin maruziyeti ile ilişkilendirilmiştir. HepG2 hücreleri, karaciğerin fonksiyonel özelliklerini koruyan bir tümör hücre hattı olarak, hem tümör biyolojisini anlamak hem de yeni terapötik yaklaşımların etkinliğini değerlendirmek için güvenilir bir platform sunar. Bu hücre hattı, tümör fenotipi ve genetik özellikleri bakımından karakterize edilmiş olup, alfa-fetoprotein (AFP) üretimi gibi klinik belirteçleri ifade eder. Ayrıca, HepG2 hücreleri, çeşitli deneysel koşullarda hücre döngüsü, farklılaşma ve sinyal yolaklarının incelenmesine olanak sağlayan bir model sunar. Bu özellikleri sayesinde, HepG2 hücreleri hem temel kanser araştırmalarında hem de farmakolojik ve toksikolojik çalışmalarda önemli bir rol oynar (Saied & MsHAMsUDDIN, 1998). Bununla birlikte, HepG2 kanser hücre hattı stabil fenotip ve kolay kültürlenebilirlik, hepatosit benzeri fonksiyonların korunması, vb. durumlardan dolayı in vitro sağlıklı karaciğer fonksiyonlarını taklit etmek için sık kullanılan hücrelerden biridir.

2.7. Hücre-Matriks Etkileşimleri ve Doku Mühendisliği

Doku mühendisliğinin temel amacı, hasar görmüş veya eksik dokuların yeniden oluşturulması ve organ fonksiyonlarının desteklenmesidir. Bu süreçte hücreler, doğal veya yapay iskelelerle bir araya gelerek, tıpkı doğal ortamlarındaki gibi büyüyüp organize olmalıdır. Hücrelerin doğru şekilde çoğalması ve farklılaşması, çevresel sinyallerden aldığı yönlendirmelere bağlıdır (Barbucci, 2002).

Hücreler, yaşamları boyunca çevrelerinden sürekli sinyaller alarak genetik programlarını yürütürler. Gelişim sürecinde embriyonik hücreler, çevrelerine çeşitli moleküller salgılayarak kendi hücre dışı yapılarının oluşmasını sağlar (Adams & Watt, 1993; Vainio & Müller, 1997). Bu yapıların farklı düzenleniş biçimleri, hücrelerin çoğalmaya ve organize olarak dokuları oluşturmaya devam etmesine olanak tanır.

Hücrelerin farklılaşması ve işlevlerini yerine getirmesi, hücreler arası ve hücre-matriks iletişiminin anlaşılmasını gerektirir. Matriks yapılarının karmaşıklığı, hücre-matriks etkileşimlerinin de büyük çeşitlilik göstermesine yol açar. Laboratuvar ortamında doku oluşturma çabaları, hücrelerin doğal dokulardaki davranışlarını taklit edebilmelerini sağlayacak şekilde planlanmalıdır. Matriksler, hücre davranışlarını yönlendiren sinyaller sunar ve hücre yüzeyinde bulunan reseptörler bu sinyallere yanıt verir. Ligand ve reseptör etkileşimleri gerçekleştiğinde, hücre içindeki biyokimyasal mekanizmalar aktif hâle gelir ve hücrelerin fonksiyonel aktiviteleri düzenlenir (Rosso et al., 2004).

Hücrelerin matriks üzerindeki gelişimi, doku organizasyonu ve fonksiyonunun sürdürülebilmesi için temel bir süreçtir. Hücre dışı matriks, hücrelere yapısal destek sağlamanın yanı sıra, onların çevreleriyle etkileşime girerek yaşam, çoğalma ve farklılaşma gibi biyolojik süreçlerini düzenler. Hücreler, yüzeylerindeki reseptörler aracılığıyla ECM bileşenlerine bağlanır; bu bağlanmalar hücrelerin tutunma, göç etme ve konumlanma davranışlarını yönlendirir.

Bu etkileşimlerde özellikle integrinler, fibronektin, laminin ve kolajen gibi proteinler kritik rol oynar. Hücrelerin matriksle kurduğu bu temaslar, biyokimyasal sinyallerin iletilmesini sağlayarak hücresel aktiviteleri düzenler ve doku oluşumunu yönlendirir. Vasküler gelişim, hücre-matriks etkileşimlerinin önemini gösteren iyi bir örnektir. Endotel hücreleri matriksle etkileşerek damar yapılarını oluştururken, perisitler bu yapıları stabilize eder. ECM'in sunduğu yapısal destek, damar

bütünlüğünün korunmasını ve işlevsel bir vasküler sistemin gelişmesini sağlar. Sonuç olarak, hücre-matriks etkileşimleri organizmaların sağlıklı gelişimi için vazgeçilmezdir. Bu etkileşimlerin doğru şekilde kurulması, doku ve organların yapısal bütünlüğünü korur. ECM bileşenlerinin ve reseptörlerinin daha iyi anlaşılması, gelecekte doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında yeni uygulamalara kapı aralaması beklenmektedir (Hynes, 2007).

2.7.1. Matriksin hücre proliferasyonu ve adhezyonu üzerindeki etkisi

Hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve fonksiyonları için uygun bir çevre gereklidir. Hücreler, çevrelerindeki hücre dışı matriks ile etkileşime girerek hayatta kalma, çoğalma, farklılaşma ve göç gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenlerler. Bu etkileşimler, hücre-matriks yapışmaları ve matriksin fiziksel özellikleri tarafından büyük ölçüde kontrol edilir. Matriksin hücrelerin proliferasyonu (çoğalması) ve adhezyonu (yapışma) üzerindeki etkisi, hücre davranışlarını düzenleyen önemli faktörlerden biridir.

Hücre-matriks adhezyonları, hücrelerin ECM'e yapışmasını sağlayan biyolojik yapılar olan integrinler tarafından aracılık edilir. İntegrinler, ECM üzerinde bulunan farklı proteinlerle bağlanarak hücrelerin matriksle olan etkileşimlerini düzenler. Bu adhezyonlar, hücrelerin ECM'ye bağlanmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre içindeki çeşitli sinyal yollarını başlatarak hücre davranışlarını modüle eder (Miranti & Brugge, 2002). Bu sinyal yolları, hücrenin gen ekspresyonunu, sitoskeletal organizasyonu, hücre yayılmasını ve hareketliliğini etkileyebilir. Hücrelerin ECM ile etkileşimi, hücre proliferasyonunun temel düzenleyicilerindendir. İntegrinler aracılığıyla aktarılan matriks sinyalleri, hücre içindeki çeşitli biyokimyasal yolları aktive eder ve bu da hücre bölünmesini tetikler. Örneğin, hücrelerin matriksle güçlü yapışması, hücre içi sinyalleme yollarını başlatarak hücre çoğalmasını destekler. İntegrinler aracılığıyla aktarılan sinyaller, hücre büyüme faktörlerinin ve mitojenik sinyallerin hücreye ulaşmasını kolaylaştırır, bu da hücrenin bölünme ve proliferasyon kapasitesini artırır (Hynes, 2002).

Matriksin sertliği veya esnekliği, hücre proliferasyonunu etkileyebilir. Sert matriksler, hücrelerin daha fazla yapışmasını ve dolayısıyla daha fazla proliferasyon gerçekleştirmelerini sağlayabilir. Bununla birlikte, çok yumuşak matriksler, hücrelerin yeterli adhezyon oluşturamamasına ve bunun sonucunda proliferasyonun

engellenmesine yol açabilir. Hücrelerin ECM'ye adhezyonlarını yönlendiren faktörlerden biri, matriksin fiziksel yapısıdır. ECM'nin boyutu, yoğunluğu, kompozisyonu ve topografyası, hücrelerin matrikse ne kadar güçlü yapışacaklarını etkileyebilir. Bu adhezyonlar, hücrenin çevresiyle etkileşime girerek proliferasyonu yönlendirir. Örneğin, ECM'nin doğru topografyasına sahip yüzeylerde hücreler daha etkili bir şekilde adhezyon gösterir ve bu da hücre proliferasyonunun artmasına yol açar.

İntegrinler, hücrelerin matriksle etkileşimi için temel reseptörlerdir ve hücre-matriks adhezyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. İntegrinler, hücrelerin ECM'ye bağlanarak hücre içi sinyal iletim yollarını başlatır ve bu da hücre proliferasyonunu etkiler. İntegrinlerin kümelenmesi ve etkinleşmesi, fokal adhezyon kinaz (FAK) gibi proteinlerin aktivasyonunu başlatarak hücre çoğalması için gerekli sinyalleri tetikler. Matriksin esnekliği, hücrelerin adhezyon ve proliferasyonunu düzenleyen önemli bir diğer faktördür (Li et al., 2005). Esnek matriksler, hücrelerin deformasyonunu kolaylaştırır ve hücrenin mekanik gerilme oluşturmasına olanak tanır. Bu gerilme, hücre içi sinyal yollarını aktive eder ve proliferasyonu artırabilir. Özellikle, esnek matriksler hücrelerin proliferasyon kapa sitesini artırırken, daha sert matriksler hücrelerin daha az proliferasyon yapmasına neden olabilir (Berrier & Yamada, 2007).

Ekstraselüler matriks, hücrelerin yalnızca fiziksel desteğini sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre davranışlarını yönlendiren dinamik bir mikroçevre oluşturur. Hücre davranışını etkileyebileceği iki temel mekanizma vardır. Bunlardan biri reseptör aracılı sinyal iletimi yoluyla hücre fonksiyonlarını doğrudan düzenleyen hücre-matriks etkileşimidir. Diğeri ise matriksin büyüme veya farklılaşma faktörlerinin mobilizasyonunu kontrol ederek hücre proliferasyonunu ve fenotipini dolaylı olarak modüle etmesidir (Taipale & Keski-Oja, 1997). Hücreler yalnızca kendi sinyallerini üretmekle kalmaz, aynı zamanda matrikse tutunmayı düzenleyen moleküller aracılığıyla çözünür büyüme faktörleri ve farklılaşmayı indükleyen ajanlar gibi dış uyaranlara verdikleri yanıtı da değiştirebilir (SchWartz & Baron, 1999). Bu durum, farklı matriks makromoleküllerinin belirli sinyal iletim yollarını seçici biçimde aktive edebileceğini ve hücrelerin büyüme ya da farklılaşma faktörlerine etkili şekilde yanıt verebilmesi için uygun hücre içi sinyal kaskadlarının tetiklenmesinde matriks bileşenleriyle etkileşimin gerekli olduğunu göstermektedir (Aplin & Juliano, 1999).

Nitekim yapılan çalışmalar, belirli büyüme faktörlerinin etkili biçimde aktive olabilmesi için hücrelerin matrikse belirli bir düzeyde yapışmasının ve fokal adezyon komplekslerinin oluşumunun gerekli olduğunu ortaya koymuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Protokolü

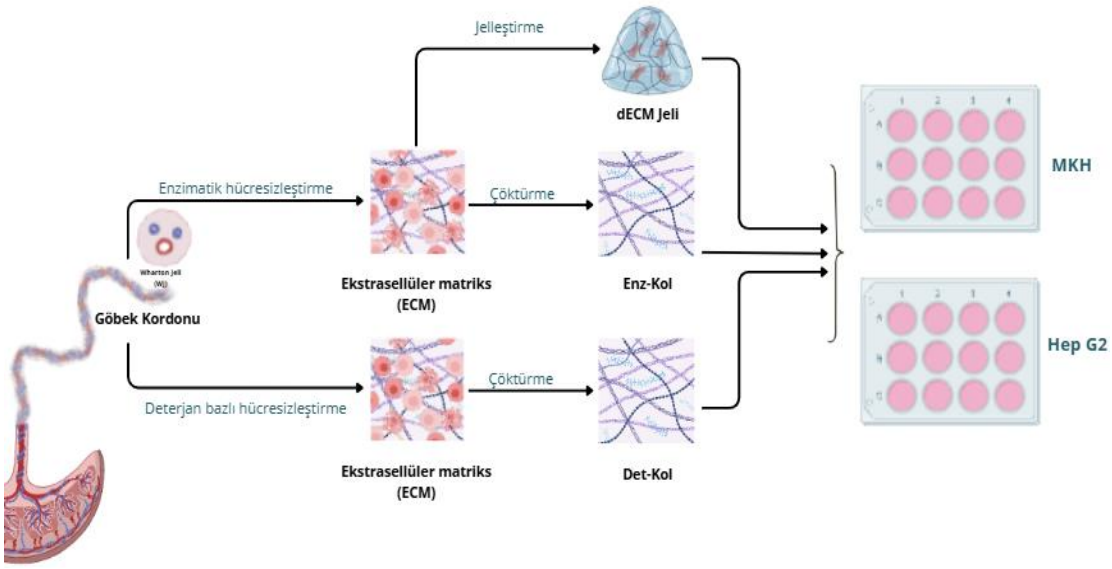
Bu tez çalışması sadece in vitro hücre kültürü ortamında (insan ya da hayvan vücudu dışında) ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ), Tıp fakültesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının karar iznin sayı numarası: E-25403353-050.04-250198525; No:38; 04.11.2025 tarihli etik kurul izni ile insan kaynaklı atık dokular kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın başlangıç aşamasında kontrol grubu ve farklı hücresizleştirme tekniklerine göre toplam 3 farklı örnek grubu kullanılmıştır. Deney grupları:

1.Grup (Kontrol grubu): Başlangıç doku Wharton jeli (WJ).

2.Grup (Deney grubu): Deterjan uygulaması ile yapılmış hücresizleştirme (Det-ECM).

3.Grup (Deney grubu): Deterjan uygulaması sonrasında enzimatik uygulama yapılmış hücresizleştirme (Enz-ECM).

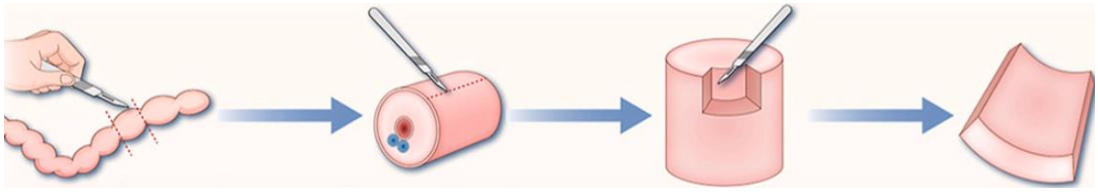


Şekil 3. 1. Tez çalışmasının grafikal özeti.

3.2. İnsan Göbek Kordonundan Wharton Jeli İzolasyonu

Bu tez çalışmasında, araştırma için toplamda iki vaka (n=2) kullanılmış olup, bir vakada ikizler bulunması nedeniyle üç adet göbek kordonu örneği alınmıştır. Çalışmada kullanılan toplam göbek kordonu uzunluğu 45 cm olarak belirlenmiştir. İnsan göbek kordonları, deneysel işlem öncesinde, tipik olarak steril Hank's Balanced

Salt Solution (HBSS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) çözeltisi ile üç defa durulanmış ve ardından 5 cm uzunluğunda parçalara ayrılmıştır (Fong et al., 2012). Her bir parça, altta yer alan Wharton jeli (WJ) dokusunun epitelyal yüzeyi boyunca dikkatlice ayrılarak, tek parça halinde disseke edilmiştir (Şekil 3.2.). Yumşak jel dokusu, sonrasında sıradakı aşama için −80°C dondurulmuştur.



Şekil 3. 2. Göbek kordonundan wharton jeli izolasyonu (Gao et al., 2025).

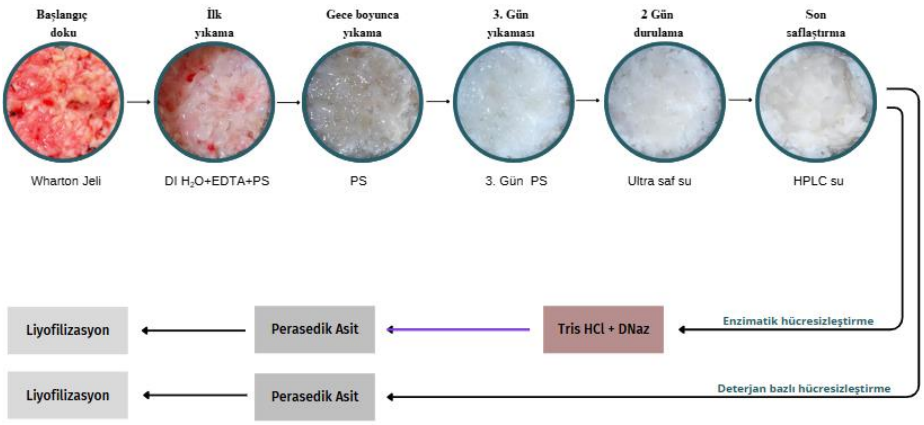
3.3. Wharton Jeli Hücresizleştirilmesi

Dondurma/çözme işleminden (−80°C/20°C) sonra numuneler, bisturi yardımıyla 1-2 mm kalınlığında küçük parçalara ayrılmış ve 30 dakika süreyle deiyonize su (diH_2O) ile çalkalanmıştır. Wharton jeli içindeki hücrelerin tamamen çözülerek ekstrakte edilmesi amacıyla, ilk aşamada numuneler %0.002 W/v Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA, Sigma E6758-500G) çözeltisi ile 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir (Emami et al., 2021). Ardından, hücre membranlarının geçirgenliğini artırmak ve çözülme sürecini optimize etmek amacıyla, %1 Triton X-100 (Millipore 9036-19-5, ABD) ve %0.1 NH_4OH (Merck KGaA, Almanya) içeren fizyolojik serum (PS) bazlı hipotonik bir çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltide işlemler gerçekleştirilmiştir (Kochetova et al., 2025). Dokular, süzgeç içinde gece boyunca ve sonrasında da 3 gün süreyle, her gün 500 ml hipotonik çözeltide çalkalanmış (MaXiLab Biotechnology), böylece hücresel materyalin daha verimli bir şekilde salınması sağlanmıştır. Sonraki aşamada, dokularda kalan deterjan kalıntılarını uzaklaştırmak için 2 gün boyunca saf su ile ve 3. gün ise HPLC (İsoLab, Wertheim, Almanya) dereceli su ile çalkalama işlemleri yapılmıştır. Bu işlem, Wharton jeli içindeki hücresel yapıların tam olarak ekstrakte edilmesini temin etmek amacıyla optimize edilmiştir.

Hücresizleştirilmiş Wharton jelinin elde edilmesi süreci, dikkatle uygulanarak dokular, sadece deterjan uygulanmış ve deterjan sonrası enzim uygulanmış olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Enzimatik grupta, hücre kalıntıları ve özellikle DNA'nın temizlenmesi amacıyla, dokular 37°C'de 2 saat boyunca DNaz enzimine maruz

bırakılmıştır (Dubus et al., 2022). Bu amaçla, Tris-HCl (Sigma Aldrich, ABD) tampon çözeltisine %0.2 (v/v) oranında 500X Dnaz (Sigma Aldrich, Almanya) eklenmiş ve dokular manyetik karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edilmiştir. Bu enzimatik işlem, Wharton jelindeki DNA'nın parçalanmasını sağlamış ve dolayısıyla daha saf bir hücresizleştirilmiş doku elde edilmesi amaçlanmıştır.

İşlem tamamlandıktan sonra, her iki grup için sterilizasyon amacıyla, doku hacmi kadar periasidik asit (Sigma Aldrich, Almanya) çözeltisi ile 30 dakika süreyle 4°C'de buz kasetleri ile birlikte çalkalanarak dezenfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşama, olası kontaminasyonları engellemek amacıyla kritik bir öneme sahip olup, hücresizleştirilmiş dokuların steril ve saf hale getirilmesini sağlamıştır. Tüm işlem artıkları, soğuk PBS (Capricorn Scientific, Almanya) çözeltisi ile 1000G'de 5 dakika süreyle santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) edilerek uzaklaştırılmıştır. Son olarak, hücresizleştirilmiş Wharton jeli (d-WJ) numuneleri, liyofilizasyon işleminden önce sırasıyla −20°C (Panasonic Kal-Den, Japonya) ve −80°C'de (Arctıko Uluf 750-2M, Danimarka) dondurulmuştur. Bu dondurma işlemi, örneklerin yapısal bütünlüğünü muhafaza ederek sonraki analizler için uygun hale getirilmesini sağlamıştır. Liyofilize (GPERON FDB8602, Korea) edilmiş dokular, son aşamada 1 mm metal küreler ile homojenize (QIAGEN TissueLyser II, Almanya) edilmiştir. İşlemin bütün aşamaları Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 3. Wharton jeli kaynağından hücresizleştirme aşamaları.

3.3.1. Hücresizleştirme işleminin etkinliği ve karakterizasyonu

3.3.1.1. Histolojik boyama

Hücresizleştirilmiş numuneler uygun yönde parafin bloklara gömülmüş ve mikrotomda 4-5 µm kalınlığında ince kesitler alınmıştır. Bu kesitleri ışık mikroskobik inceleme için ilk olarak % 4'lük paraformaldehit solüsyonunda 24 saat tespit edildi.Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (%60,%70, %80, %90, %96 %100) geçirildiler. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından parafine gömüldüler (Alturkistani et al., 2015).

Hematoksilen-Eosin Boyama: Tüm deney gruplarına ait parafin bloklarından lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60°C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, 3 × 10 dakika süreyle ksilolde tutulup parafinden arındırıldı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70) geçirildi ve 1 dakika akan su altında yıkandı. Kesitler Harris Hematoksilen (HHS32, Sigma) ile 2 dakika boyandıktan sonra, 2 × 2 dakika akan su altında yıkandı. Ardından lamlar %1 amonyak-su karışımına daldırılıp tekrar 1 dakika akan suda yıkandı. Daha sonra 2 dakika Eosin Y (HT110180, Sigma) ile boyandı. Kesitler artan dereceli alkol serilerinden (%70, %80, %96, %100) geçirilerek 2 × 1 dakika ksilolde bekletildi ve entellan ile kapatıldı.

Alcian Blue (pH2.5): Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, 3 × 10 dakika süreyle ksilolde tutulup parafinden arındırıldı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70) geçirilip 1 dakika akan suda yıkandıktan sonra 1 dakika distile suda bekletildi. Lamlar 30 dakika Alcian Blue (Atom Scıentıfic, RRSK400-100) çözeltisinde boyandı. Distile su ile 2×1 dakika yıkandıktan sonra, asetik asitte 3 saniye bekletildi ve tekrar distile su ile 2×1 dakika yıkandı. Kesitler artan dereceli alkol serilerinden (%70, %96, %100) geçirilip 2×1 dakika ksilolde bekletildi ve entellan ile kapatıldı.

Masson's Trıchrome Boyama (Bioptica, 04-010802): Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, 3×10 dakika süreyle ksilolde tutulup parafinden arındırıldı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70) geçirilip 1 dakika akan suda yıkandıktan sonra 1 dakika distile suda bekletildi. Lamlar Weigert's Iron Hematoxylin ile 5 dakika

boyandı ve ardından pikrik asitte 5 dakika bekletilip 3 × 1 dakika akan su altında yıkandı. Daha sonra 5 dakika Biebrich Scarlet–Acid Fuchsin çözeltisinde boyandı ve distile su ile 2×1 dakika yıkandı. Kesitler 5 dakika phosphotungstic/phosphomolybdic asitte bekletildikten sonra, 5 dakika Aniline Blue çözeltisinde boyandı. Distile su ile 2×1 dakika yıkandıktan sonra, artan dereceli alkol serilerinden (%70, %80, %96, %100) geçirilip 2×1 dakika ksilolde bekletildi ve entellan ile kapatıldı.

Safranin O boyaması (Nova Ultra, IW-3011 IW): Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, 3×10 dakika süreyle ksilolde tutulup parafinden arındırıldı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70) geçirilip 1 dakika akan suda yıkandıktan sonra 1 dakika distile suda bekletildi. Kesitler Weigert's Iron Hematoxylin çözeltisinde 5 dakika bekletildi, ardından distile suda 1 dakika yıkandı. Lamlar Fast Green boyasıyla 1 dakika boyandı ve diferansiyasyon için asetik asitte 5 saniye bekletildi. Distile suda 1 dakika yıkandıktan sonra, Safranin O çözeltisinde 10 dakika boyandı. Kesitler artan dereceli alkol serilerinden (%70, %80, %96, %100) geçirilip 2×1 dakika ksilolde bekletildi ve entellan ile kapatıldı.

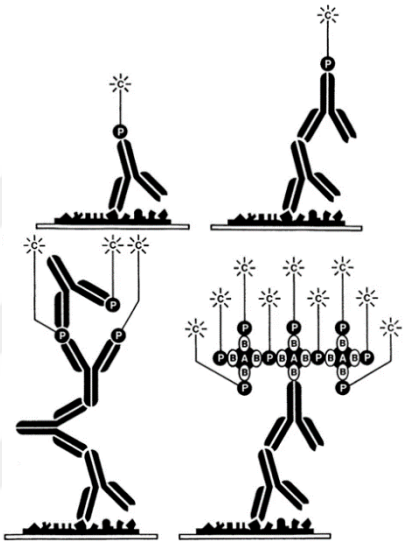
3.3.1.2. İmmunohistokimya

Ekstraselüler matriks bileşenlerinin analizini yapmak amacıyla, Kolajen Tip I (COL 1) ve Fibronektin proteinlerinin immünofloresan boyama yöntemi ile incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem aşağıdaki adımlar izlenerek gerçekleştirilmiştir:

Doku örnekleri, %4 paraformaldehit çözeltisi ile 24 saat süreyle sabitlenmiştir. Bu sabitleme işlemi, doku yapısının korunmasını sağlayarak hedef proteinlerin boyama için uygun hale gelmesini temin etmiştir. Ardından, sabitlenmiş örnekler, hücre zarını geçirgenleştirmek ve antikorların dokuya daha iyi erişmesini sağlamak amacıyla %0.1 Triton X-100 çözeltisi ile 10 dakika süreyle muamele edilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için örnekler %5-10 keçi serumu (Cell Signaling, ABD) ile 1 saat boyunca blokaj işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, örnekler Collagen I (COL I, Cell Signaling, ABD) ve Fibronektin (Cell Signaling, ABD) için uygun primer antikorlarla inkübe edilmiştir. Bu primer antikorlar, hedef proteinlere özgü bağlanarak belirli ECM bileşenlerinin tespiti için temel işaretleme sağlar. Inkübasyon süresi, her antikor için üretici talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Primer antikor inkübasyonunun ardından, örnekler floresan

etiketli ikincil antikorlarla 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Şekil 3.4. görselindeki gibi ikincil antikorlar, primer antikorun bağlandığı bölgeleri tanıyarak floresan işaretlemesi yapmış ve böylece hedef proteinlerin lokalizasyonunun gözlemlenmesine olanak tanımıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra, örnekler üç kez PBS (fosfatlı tamponlu salin) ile yıkanarak fazla ikincil antikorlar uzaklaştırılmıştır. Son aşamada, boyanmış örnekler floresan mikroskop kullanılarak incelenmiş (Key, 2006).

Bu süreç, ECM'nin yapısal bileşenlerinin ve ilgili proteinlerin doku içindeki dağılımını ve organizasyonunu görsel olarak değerlendirmek için kullanılmıştır.



Şekil 3. 4. IF Boyama: Primer ve Sekonder Antikorların Bağlanması ve Sinyal Amplifikasyonu (Foot, 1933).

3.3.1.3. DNA ölçümü

DNA izolasyonu, Trizol reaktifi ve ticari bir kit (NucleoGene Genomic DNA Extraction Kit) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İşleme başlamadan önce, izolasyon için gerekli tüm malzemeler hazırlanmıştır. Deney ve kontrol gruplarına ait uygun miktardaki doku örnekleri, Trizol (GeneAll, LTD) reaktifi ile tamamen parçalanana kadar homojenize edilmiştir (Hummon et al., 2007). Ardından, kullanılan Trizol hacminin beşte biri kadar kloroform (Sigma Aldrich, Almanya) eklenmiş ve örnekler DNA, Trizol ve protein fazlarına ayrılmıştır. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyonun ardından santrifüj işlemi uygulanmıştır.

Elde edilen DNA fazı, kitin protokolünde belirtilen bağlanma tamponu aşamasından itibaren üretici talimatlarına uygun şekilde işleme alınmıştır. İzolasyon

sonucunda elde edilen DNA örnekleri kısa süreli saklama için -20°C'de, uzun süreli saklama için ise -80°C'de muhafaza edilmiştir.

İzolasyonu tamamlanan DNA örnekleri, NanoDrop (Thermo Fisher, ABD) spektrofotometresi kullanılarak saflık ve konsantrasyon açısından analiz edildi. Ölçüm sırasında, 260/280 ve 260/230 absorbans oranları değerlendirildi, DNA'nın saflığı ve olası kontaminasyonları belirlendi. Yeterli saflık ve konsantrasyona sahip DNA örnekleri daha ileri analizler için işlendi.

3.3.1.4. Agaroz jel elektroforezi

DNA'nın bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için %1 oranında agaroz jel (Sigma, A9539-100G) hazırlandı ve 1X TBE tamponu içerisinde eritilmiştir. DNA'yı floresan olarak boyamak ve UV ışığı altında bantların görünmesini sağlamak amacıyla etidyum bromid (Sigma, E8751-1G) eklenmiştir. Jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra kuyular oluşturuldu ve DNA örnekleri uygun yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyulara yüklendi. İşlem zamanı elektroforez güç kaynağı (Thermo EC250-90 Waltham, ABD) kullanılarak 90V uygulandı ve 40-50dk süre sonunda jel, UV transillüminatör (Bio Rad, California, ABD) altında görüntülendi (Lee et al., 2012). DNA bantlarının keskinliği ve bütünlüğü değerlendirilerek izolasyonun başarısı doğrulanmıştır.

3.3.1.5. Hidroksipirolin tayini analizi

Deselülerize Wharton jeli örneklerindeki kolajen miktarını, normal Wharton jeli dokusundaki kolajen düzeyiyle karşılaştırmak için her iki doku grubunda da hidroksiprolin temelli kolorimetrik analiz yapılmıştır. Bu ölçümler, hidroksiprolin kolorimetric kit (Elabscience, Çin) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Analiz sürecinde, her numuneden yaklaşık 50 mg doku alınmış ve örnekler 500 µL 6 mol/L HCl içinde 95°C'de 6 saat boyunca hidrolize edilmiştir. Hidroliz sonrası kite ait reaktifler eklenmiş ve karışımlar 60°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler 0.5 cm genişliğindeki şeffaf küvetlere aktarılmış ve 558 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak optik dansite değerleri elde edilmiştir (Rothrauff et al., 2017). Son olarak, bu ölçüm değerleri: A (OD değeri), V (Ph ayarlamasından sonra elde edilen hidrolizatın hacmi), f (test öncesi nümunenin seyreltme faktörü), m (nümunenin ağırlığı), a (standart) kullanılarak hidroksiprolin miktarı Formül 3.1.'e göre hesaplanmıştır.

$$\mathrm{HYP}\ (\mu g/mg) = \frac{(\Delta A - b)}{a} \times \frac{V}{m} \times f$$

Formül 3. 1. Hidroksipirolin miktar hesaplama formülü.

3.4. ECM'den Kolajen Ekstraksiyonu

Ekstrasellüler matriksten kolajen ekstraksiyonu gerçekleştirmek amacıyla öncelikle liyofilize (kurutulmuş) doku örnekleri jelleştirilmiştir. Bu amaçla, %0,5 (W/v) pepsin (Sigma Aldrich, Çin) içeren 0,5 M asetik asit (Merck, Almanya) çözeltisi hazırlanmış ve uygun miktarda doku örneği bu çözeltiye eklenmiştir. Hazırlanan karışım, tam bir jelleşme sağlanana kadar 4°C'de 72 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli olarak karıştırılmıştır. Bu aşamada pepsin, asidik ortamda kolajen dışındaki proteinlerin parçalanmasını kolaylaştırarak kolajenin çözünür hâle gelmesini sağlamıştır.

Jelleşme tamamlandıktan sonra, elde edilen çözeltiden bir parça Enz-ECM grubundan dECM jeli grubu olarak ayrılmış ve geri kalan jelden saf kolajen izolasyonu amacıyla tuzla çöktürme yöntemi uygulanmıştır. Bu doğrultuda, dECM jeli 0,7 M NaCl çözeltisi içerisinde 9150 rpm'de 45 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda oluşan kolajen pelleti dikkatlice toplanmıştır. Elde edilen pellete, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde hazırlanmış diyaliz tüpü (Membra-Cel, ABD) içerisinde 48 saat boyunca diyaliz işlemi uygulanmıştır. Bu işlem, düşük molekül ağırlıklı safsızlıkların ve tuz iyonlarının uzaklaştırılmasını sağlamıştır.

Diyaliz sonrası kolajen pelletinin çözündürülmesi için asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Çözünme tamamlandıktan sonra, kolajen çözeltisinin pH değeri 7,0–7,4 aralığına getirilerek nötralizasyon sağlanmış ve ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır.

3.4.1. Kolajen karakterizasyonu

Kolajen karakterizasyonu çalışmaları kapsamında, deterjan ve enzimatik işlemler uygulanarak hazırlanmış deney gruplarına ait doku örnekleri kullanılmıştır. Her iki gruptaki örnekler, ekstraksiyon işlemlerinin ardından liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yöntemiyle kurutulmuş ve analizler öncesinde nemden arındırılmıştır. Bu işlem, örneklerin uzun süreli saklanmasını ve karakterizasyon aşamasında yapısal bütünlüklerinin korunmasını sağlamıştır.

Deney grupları:

1.Grup (Deney grubu): Det-ECM'den izole edilen kolajen (Det-Kol).

2.Grup (Deney grubu): Enz-ECM'den izole edilen kolajen.(Enz-Kol).

3.4.1.1. SEM (Taramalı elektron mikroskobu)

Kolajen örneklerinin yüzey morfolojik özelliklerinin incelenmesi, JEOL JSM-5600 marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde, biyolojik numunelerin yapısal bütünlüğünün korunması amacıyla kritik nokta kurutma yöntemi uygulanmış, ardından iletken olmayan yüzeylerin elektron iletkenliğini artırmak için altın/paladyum (Au/Pd) ile ince kaplama yapılmıştır. Hazırlanan örnekler uygun vakum koşullarında görüntülenmiş ve elde edilen mikrograflar, yüzey morfolojisindeki yapısal farklılıkların değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Yılmaz et al., 2025).

3.4.1.2. FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi)

Her bir numunenin fonksiyonel grupları belirlemek amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi gerçekleştirilmiştir. FTIR, ışığın kızılötesi bölgesindeki yoğunluğunu dalga sayısına göre ölçen ve matematiksel Fourier dönüşümüne dayanan bir kimyasal analiz yöntemidir. Bu teknik, moleküllerdeki bağların titreşim ve dönme hareketleri sırasında kızılötesi ışığın emilmesi prensibine dayanır. Başka bir deyişle, moleküler titreşimler sonucu kızılötesi radyasyonun soğurulması esasına göre çalışır. Ölçümler, PerkinElmer Spectrum Two marka spektrometre kullanılarak, oda sıcaklığında 4000–400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir (Yılmaz et al., 2025).

3.5. Hücrelerin İzolasyonu, Kültür Edilmesi, Çoğaltılması ve Karakterizasyonu

Mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu için eksplant veya enzimatik sindirim yöntemleri kullanıla bilir. Bu tez çalışmasında, 1 vakadan (n=1) eksplant yöntemiyle kök hücreler izole edilmiştir.

3.5.1. MKH'lerin izolasyonu ve kültüre edilmesi

Eksplant yöntemi ile izole edilen insan Wharton Jeli kökenli mezenkimal kök hücreler (iWJ-MKH'ler) kültüre alınmıştır. Doku örnekleri %10 primosin içeren

Hank'in Balanced Salt Solution (HBSS) ile yıkanmış, küçük parçalar hâline getirilerek 6 kuyucuklu kültür plağının tabanına yerleştirilmiş ve 15 dakika boyunca tabana tutunması sağlanmıştır. Ardından üzerine %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 primosin (Invivogen, California, ABD) ve %1 stabil glutamine (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren Nutri ve Nutri supplement (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) besiyeri eklenmiş ve %5 CO_2, %5 O_2, %95 bağıl nem ve 37°C inkübatörde (Panasonic, MCO-170M-PE, Japonya) çoğaltılmıştır.

Hücrelerin morfolojik durumu invert faz kontrast mikroskobunda (Carl Zeiss, Axio Observer D1, Oberkochen, Almanya) günlük olarak izlenmiş, kültür plağı tabanına doğru hücre hareketleri gözlenmiş ve fotoğraflar kaydedilmiştir. Hücreler %70 konfluens seviyesine ulaştığında alt kültürleme (pasajlama) yapılmıştır. Eski besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ile üç kez yıkanmış ve %0,25 tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) ile detache edilmiştir. Tripsin-EDTA, serumlu besiyeri ile nötralize edilmiş ve hücreler santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Pelletler resüspanse edilerek hücre sayımı trypan mavisi ile yapılmış ve toplam hücre sayısı standart formül ile hesaplanmıştır.

Hücreler, kültürlerine devam etmek üzere T75 flasklara ekilmiş ve fazlası ileride kullanılmak üzere dondurulmuştur. Kriyoprezervasyon için hücreler 300×g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmış, önceden hazırlanmış kriyoprezervasyon solüsyonu (%35 FBS içeren RPMI-1640) ile homojenize edilmiş ve her vialde 3×10^6 hücre olacak şekilde paylaştırılmıştır. Hücrelere %5 dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş, hızla karıştırılmış ve -150°C'de derin dondurucuda (Panasonic, MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya) kriyoprezerve edilmiştir.

3.5.2. WJ-MKH'lerin flow sitometri ile karakterizasyonu

İzole edilen insan Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iWJ-MKH'ler), üçüncü pasaja kadar kültür ortamında çoğaltılmıştır. Pasaj aşamasına ulaşan hücrelerden önce eski besiyeri uzaklaştırılmış, ardından 3 mL Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile üç kez yıkama işlemi uygulanmıştır. Hücrelerin kültür yüzeyinden ayrılmasını sağlamak için %0,25 oranında tripsin-EDTA (Etilendiamin

tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) eklenmiş ve 37°C'de yaklaşık üç dakika süreyle inkübatörde tutulmuştur. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskopla doğrulandıktan sonra, tripsinin etkisini durdurmak amacıyla iki katı hacminde serum içeren besiyeri ilave edilmiştir.

Elde edilen hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) aktarılmış, pipetajla nazikçe homojenize edilmiş ve 300×g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti soğuk PBS ile yıkanmıştır. Ardından, hücrelerin antikorlarla işaretlenebilmesi için 100 µL bağlanma solüsyonu (%2 FBS içeren PBS) ve 2 µL spesifik antikor eklenmiş, karışım +4°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 300 µL PBS ilavesiyle hücreler yeniden süspanse edilmiş ve floW sitometri cihazında (Agilent Novacyte 3500) analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi NovoExpress yazılımı (Agilent, California, ABD) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

İzolasyonun etkinliği, hücre saflığı ve canlılığının değerlendirilmesi amacıyla yapılan karakterizasyon analizlerinde, floW sitometri yöntemi kullanılmıştır. Bu analizlerde, FITC konjugatlı anti-human CD44, CD105, CD73, CD90, CD69, CD25 ve PE konjugatlı anti-human CD25, CD19, CD29, CD34, CD14, CD45, HLA-DR ve HLA-A-B-C antikorları (Biolegend, California, ABD; Thorvacs, Ankara) kullanılarak hücre yüzey belirteçlerinin varlığı değerlendirilmiştir.

3.6. Hücrelerin 3B Kültür Ortamında Ekilmesi ve Karakterizasyonu

Çalışmamızda, matriks üzerindeki hücresel etkileşimleri değerlendirmek amacıyla MKH ve HepG2 hücre hatları kullanılmıştır. Matriks olarak ise, kolajen ekstraksiyon yöntemlerindeki farklılıklara göre hazırlanmış üç ayrı örnek grubu ile kontrol grubu değerlendirilmiştir. Bu gruplar:

1.Grup (Kontrol grubu): Ticari kolajen (Rat Tail Collagen, Corning, ABD)

2.Grup (Deney grubu): Deterjan uygulaması ile ekstrakte edilmiş kolajen (Det-Kol).

3.Grup (Deney grubu): Enzimatik uygulama ile ekstrakte edilmiş kolajen (Enz-Kol).

4.Grup (Deney grubu): Enzimatik uygulama ile alınmış dECM jeli.

3.6.1. Hücrelerin kolajen ve ECM matriksine ekilmesi

Hücresel davranışların üç boyutlu (3B) biyomatriks ortamında incelenebilmesi amacıyla MKH ve HepG2 hücre hatları kullanılarak hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler, her hücre hattı için ayrı olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plakalarında yürütülmüştür. Hücre ekimi öncesinde, hücrelerin tutunma ve çoğalma koşullarını iyileştirmek amacıyla kültür yüzeyleri uygun bir kaplama tabakası ile hazırlanmıştır.

Kaplama solüsyonlarının hazırlanmasında, tüm deney gruplarına ait matriks çözeltileri eşit konsantrasyonda (4.24 mg/mL) olacak şekilde hazırlanmış ve her birine hücre adezyonunu destekleyici özellikte fibronectin (1000 µg/mL) ile DMEM High Glucose bazal besiyeri eklenmiştir. Elde edilen karışımlar düşük sıcaklık koşullarında (4°C) korunmuş, çözeltinin homojen yapıya ulaşması pipetleme yöntemiyle sağlanmıştır. Böylece, kaplama materyalinin fiziksel bütünlüğü ve biyolojik etkinliği korunmuştur.

Hazırlanan kaplama çözeltileri uygulanmadan önce kültür plakasının her bir kuyucuğu PBS ile yıkanarak sterilizasyon ve yüzey temizliği sağlanmıştır. Ardından, her kuyucuğa 400 µL olacak şekilde kaplama çözeltisi eklenmiş ve plakalar 37°C'de 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem, matriks bileşenlerinin yüzeye düzgün bir şekilde tutunmasını ve hücrelerin daha etkin bir şekilde yerleşmesini sağlamıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, kaplama solüsyonu aspiratör yardımıyla uzaklaştırılmış ve kuyucuklar nazikçe PBS ile yıkanarak fazla materyal ortamdan temizlenmiştir.

Kaplama işleminin ardından her kuyucuğa, %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 primosin içeren DMEM High Glucose besiyerinden 4 mL eklenmiştir. Kontrol grubu amaçlı aynı koşullarda ama kaplamasız plakaya da hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre ekimi aşamasında, MKH'ler için hazırlanan ilk plakanın her bir kuyucuğuna 10×10^4 hücre, HepG2 hücreleri için hazırlanan ikinci plakanın her bir kuyucuğuna ise 30×10^4 hücre ekilmiştir. Bu farklı hücre yoğunlukları, her hücre tipinin farklı proliferasyon hızları ve yüzey tutunma özellikleri göz önünde bulundurularak optimize edilmiştir.

Kültür süreci boyunca, hücrelerin canlılığını ve morfolojik bütünlüğünü koruyabilmek amacıyla iki günde bir 2 mL besiyeri yenilenmiştir. Her besiyeri

değişiminde, hücrelerin morfolojik yapıları ters mikroskop altında incelenmiş ve hücre-matriks etkileşimleri düzenli olarak izlenmiştir.

3.6.2. Hücrelerin matriks üzerindeki hücre canlılığı karakterizasyonu

Hücre ekimi sonrasında, farklı analizlerin gerçekleştirilebilmesi amacıyla kültürler belirli süreler boyunca inkübasyonda bekletilmiştir. Analiz türlerine bağlı olarak hücreler farklı inkübasyon günlerinde toplanmış ve her analiz için ayrı örnek grupları oluşturulmuştur. Böylece, hücrelerin matriks üzerindeki davranışlarının zamana bağlı değişimi karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.6.2.1. Canlı/ölü boyama testi

Hücrelerin plakalara ekiminden sonra, 1., 4. ve 7. günlerde hücre canlılığı canlı/ölü boyama analizi ile değerlendirilmiştir. Boyama işlemi öncesinde, tüm çözeltiler ışığa duyarlı olduklarından karanlık ortamda hazırlanmıştır. Analiz, DMEM High Glucose besiyeri içerisinde %10 (v/v) oranında Calcein-AM ve Ethidium Homodimer-1 içeren Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Boyama öncesinde, her kuyucuktaki besiyeri aspiratör yardımıyla uzaklaştırılmış ve kuyular PBS ile nazikçe yıkanmıştır. Ardından, her kuyucuğa hazırlanan boyama çözeltisinden eklenmiş ve plakalar 37°C'de 30 dakika süreyle inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda boya çözeltisi aspiratör ile uzaklaştırılmış, kuyular HBSS ile yıkanmış ve her kuyucuğa az miktarda HBSS eklenmiştir.

Boyama işlemini takiben, hücreler floresan mikroskobu altında incelenmiştir. Görüntülemede canlı hücreler yeşil (Calcein-AM pozitif), ölü hücreler ise kırmızı (Ethidium Homodimer-1 pozitif) floresan sinyali ile belirlenmiş, böylece hücre canlılığı ve morfolojik bütünlük zamana bağlı olarak karşılaştırmalı şekilde değerlendirilmiştir.

3.6.2.2. Proliferasyon testi

Hücrelerin plakalara ekiminden sonra, 1., 2., 3., 4. ve 5. günlerde hücre çoğalmasının zamana bağlı değişimini belirlemek amacıyla proliferasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizde, hücrelerin kültür süresi boyunca gösterdiği konfluens (yoğunluk) değerleri günlük olarak değerlendirilmiştir.

Analiz öncesinde, her kuyucuktaki besiyeri aspiratör yardımıyla uzaklaştırılmış ve hücrelerin yüzeyden ayrılması için Trypsin-EDTA çözeltisi eklenmiştir. Hücrelerin tamamen süspanse hale gelmesinin ardından, süspansiyonlar toplanarak santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri uygun şekilde yeniden süspanse edilerek Thoma lamı üzerine alınmış ve ışık mikroskobu altında sayımları yapılmıştır.

Bu yöntemle elde edilen günlük hücre sayıları değerlendirilerek, MKH ve HepG2 hücrelerinin 3B matriks ortamındaki proliferasyon hızları, büyüme eğilimleri ve matriks uyum süreçleri kantitatif olarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İnsan Göbek Kordonundan Wharton Jeli İzolasyonu

İzolasyon sürecinde, elde edilen Wharton jelinin miktarı numuneler arasında değişiklik göstermiş olup, ortalama olarak her 5 cm'lik göbek kordonu parçasından 3,91 ± 0,3 gram jel elde edilmiştir. Diseksiyon sırasında jel dokusunun homojen bir yapıya sahip olduğu ve kolayca ayrılabildiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bazı örneklerde daha yoğun bağ dokusu yapılarının bulunduğu ve bu bölgelerde jel ayrımının daha zor olduğu kaydedilmiştir.

4.2. Wharton Jeli Hücresizleştirilmesi

Hücresizleştirme süreci sırasında, her PS (physiological saline bazlı deterjan) deterjan uygulamasının ardından dokuların renginde belirgin bir şeffaflaşma gözlendi. Bu değişiklik, hücresel bileşenlerin etkin bir şekilde uzaklaştırıldığını ve ekstraselüler matriksin (ECM) daha belirgin hale geldiğini göstermektedir. Hücresizleştirmenin ilerleyen aşamalarında dokuların yapısal bütünlüğü korunmuş olup, karakterizasyon için örnekler alınmıştır.

4.2.1. Hücresizleştirme işleminin etkinliği ve karakterizasyonu

4.2.1.1. Histolojik boyama

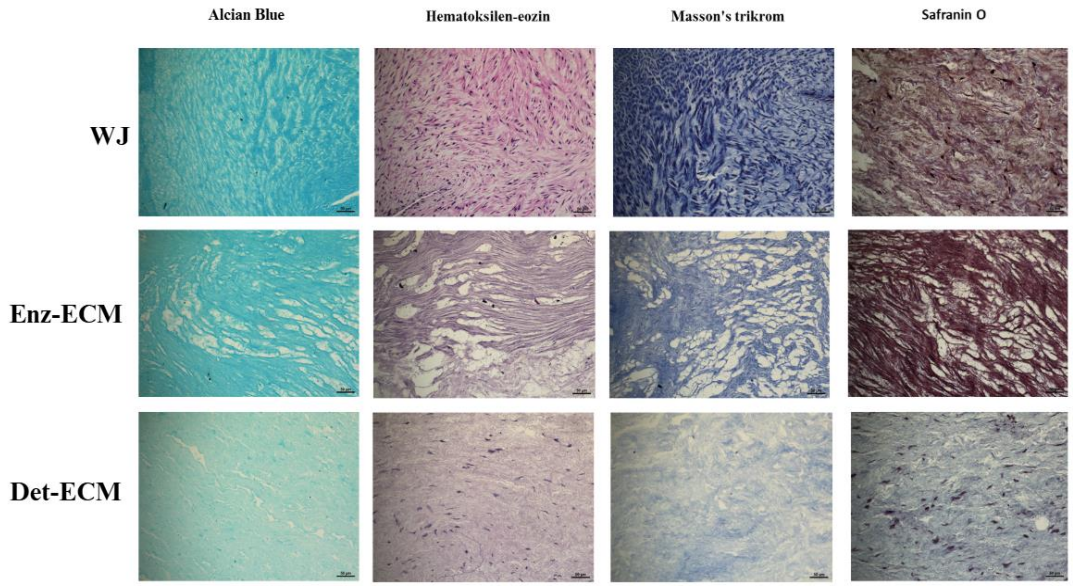
Wharton Jeli (WJ) dokusunun hücresizleştirme sürecine ilişkin histolojik analizler gerçekleştirilmiş ve sürecin etkinliği dört farklı histolojik boyama yöntemi (Alcian Blue, Hematoksilen-Eozin (H&E), Masson's Trikrom ve Safranin O) kullanılarak değerlendirilmiştir. Analizler, kontrol grubu olarak doğal WJ dokusu (WJ), deterjan uygulaması ile alınmış ECM (Det-ECM) ve deterjan sonrası enzimatik uygulama ile alınmış ECM (Enz-ECM) desellülerize gruplar üzerinde gerçekleştirilmiş, her bir boyama yöntemi üzerinden doku yapısındaki değişiklikler incelenmiştir (Şekil 4.1.).

Alcian Blue boyaması, WJ grubunda yoğun ve homojen mavi boyanma ile yüksek glikozaminoglikan (GAG) içeriğini gösterirken, Enz-ECM grubunda boyanma yoğunluğunun azaldığı ve GAG miktarının kısmen azaldığı görülmüştür. Det-ECM grubunda ise boyanma belirgin şekilde solmuş olup GAG içeriğinin büyük ölçüde kaybolduğu belirlenmiştir.

Hematoksilen-Eozin boyamasında pembe tonların dağılımına göre doku bütünlüğü ve ECM yapısı belirlenmiştir. WJ grubunda çok sayıda çekirdek ve hücre yapısı gözlenmiş, Det-ECM grubunda hücre çekirdekleri kısmen azalmış, Enz-ECM grubunda ise çekirdeklerin neredeyse tamamen ortadan kalktığı görülmüştür.

Masson's Trikrom boyamasında, WJ grubunda yoğun mavi boyanma ile kompakt kolajen lifleri gözlenirken, Enz-ECM grubunda kolajen yapısının büyük ölçüde korunduğu ancak liflerin daha gevşek bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Det-ECM grubunda ise boyanma yoğunluğu azalmış ve kolajen yapısında kısmi bozulmalar meydana gelmiştir.

Safranin O boyaması, WJ grubunda yoğun kırmızı boyanma ile yüksek proteoglikan içeriğini ortaya koyarken, Enz-ECM grubunda bu yoğunluğun azaldığı, Det-ECM grubunda ise oldukça soluk boyanma ile proteoglikan içeriğinin büyük ölçüde kaybolduğu gözlenmiştir.

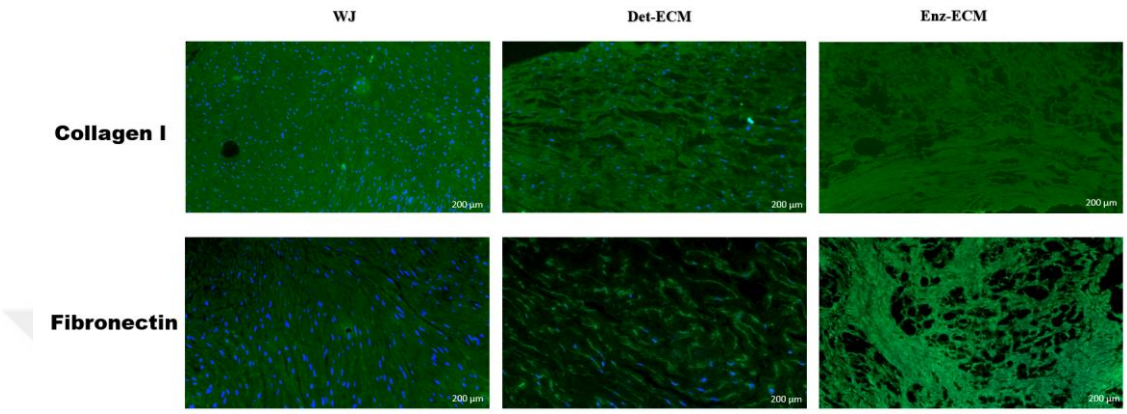


Şekil 4. 1. Kolajen grubları: Enz-Kol ve Det-Kol, kontrol grubu: WJ (Wharton Jeli) histolojik boyama görüntüleri.

4.2.1.2. İmmunohistokimya

Col I boyamasında, WJ grubunda yoğun ve homojen yeşil sinyal gözlenmiş, doğal ECM yapısının sağlam ve iyi miktarda olduğunu göstermiştir. Enz-ECM ve Det-ECM grubunda ise beraber oranda sinyal orta düzeyde olup, kolajenin kısmen korunduğu görülmüştür. Diğer taraftan, fibronektin boyamasında ise WJ grubunda

güçlü ve örgü benzeri sinyal gözlenirken, Det-ECM ve Enz-ECM grubunda sinyal bir miktar azarmıştır. Ayrıca Det-ECM grubunda daha dağınık bir yapı görülmüştür. Bununla birlikte uygulanan DAPI boyama sonuçlarından da açıkça Det-ECM grubunda bir miktar hücre kalıntısı boyanmış ve Enz-ECM grubu ise neredeyse tüm hücrelerden arınmıştır (Şekil 4.2.).



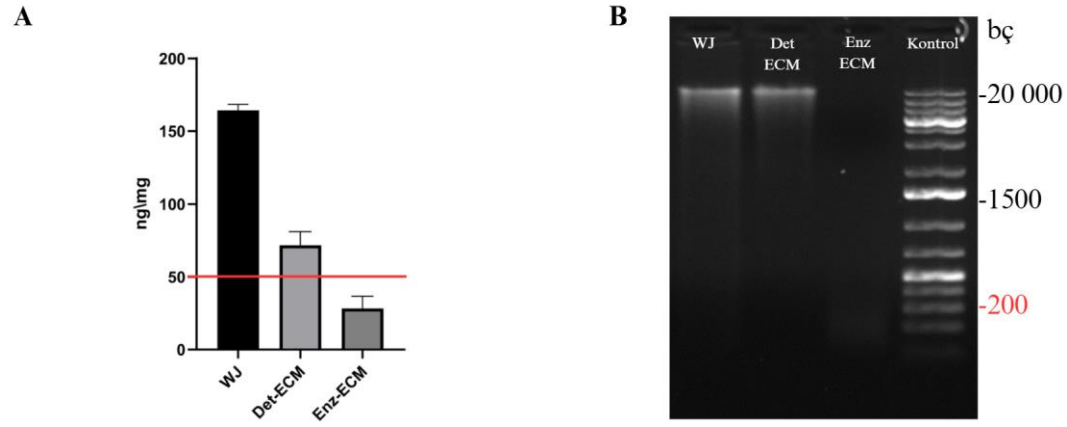
Şekil 4. 2. Kolajen grubları: WJ, Enz-Kol ve Det-Kol, için COL I ve Fibronectin boyama görüntüleri.

4.2.1.3. DNA izolasyonu

Kontrol grubu olarak kullanılan WJ örneklerinde Nanodrop spektrofotometri yöntemi ile yapılan DNA ölçümleri sonucunda ortalama 168 ng/mg değer elde edilmiştir. Bu değer, doğal dokuda mevcut hücresel içeriğin yüksek olduğunu göstermektedir. Hücresizleştirme sürecinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla, Det-ECM ve Enz-ECM gruplarında da DNA miktarları ölçülmüştür. Det-ECM grubunda DNA miktarı 60 ng/mg olarak saptanmış olup, bu değer belirlenen hücresizleştirme kriteri olan 50 ng/mg'a oldukça yakın bir seviyededir. Bu durum, Det-ECM grubunun kısmen hücresizleşmiş olduğunu, ancak tamamen hücresizleşme hedefine ulaşmadığını göstermektedir (Şekil 4.3. A).

Buna karşın Enz-Kol grubunda ölçülen DNA miktarı 20 ng/mg olarak belirlenmiş ve kriterin oldukça altında kalmıştır. Bu sonuç, Enz-ECM grubunda hücresizleştirmenin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini ve dokunun hücresel içeriğinin büyük ölçüde uzaklaştırıldığını ortaya koymaktadır. Elde edilen bu veriler, farklı hücresizleştirme yöntemlerinin dokudaki DNA içeriği üzerindeki etkilerini

karşılaştırmalı olarak değerlendirmeye olanak sağlamaktadır.



Şekil 4. 3. A) DNA miktarı sonuçları: WJ 168 ng/mg, Det-ECM 60 ng/mg ve Enz-ECM 20 ng/mg, 260/280 nm absorbans değerleri. B) Agaroz jel elektroforezi DNA fragmentinin uzunluğu (bç).

4.2.1.4. Agaroz jel elektroforezi

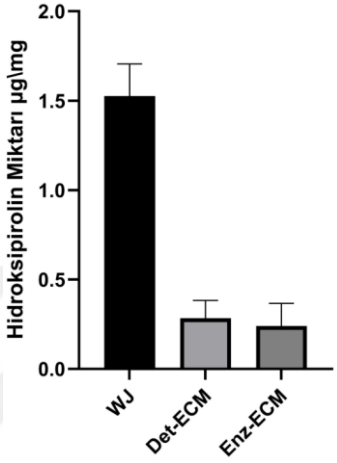
ECM örnekleri ile kontrol grubu olarak kullanılan doğal Wharton jeli dokusu üzerinde agaroz jel elektroforezi analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kontrol grubunu oluşturan doğal WJ dokusunda bozulmamış ve yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA'nın belirgin bir şekilde korunduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, doğal dokunun hücresel bütünlüğünü ve yapısal stabilitesini büyük ölçüde muhafaza ettiğini göstermektedir. Buna karşılık, deney gruplarından Det-ECM örneklerinde DNA bantlarının kısmen bozulduğu ve orta-yüksek moleküler ağırlıklı DNA fragmanlarının gözlendiği belirlenmiştir. Enz-ECM grubunda ise DNA bantlarının tamamen kaybolduğu ve 200 bç'nin altında, çok düşük moleküler ağırlıklı DNA fragmanlarının dahi tespit edilmediği görülmüştür (Şekil 4.3. B).

4.3. Hidroksipirolin Analizi

Örneklerin hidroksiprolin içeriği, hidroksiprolin kolorimetric kit (Elabscience, Çin) kullanılarak 558 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Deselülerizasyon öncesi ve sonrasına ait ölçüm verileri, kitte bulunan 100 µg/mL'lik standart çözelti esas alınarak ve örneklerin ıslak ağırlığına göre normalize edilerek Formül 3.1. kullanımıyla hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda örneklerin hidroksiprolin miktarı (µg/mg Wet tissue) belirlenmiştir. Doğal Wharton jeli dokusunda kolajen miktarı 0.32 µg/mg olarak ölçülmüş; hücresizleştirilmiş gruplarda ise bu değer

yaklaşık iki kat azalarak birbirine yakın sonuçlar vermiştir. Enz-ECM grubunda 0.15 µg/mg, Det-ECM grubunda ise 0.18 µg/mg kolajen tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).

Sonuç olarak, hidroksiprolin analizinde nicel olarak gözlenen kolajen azalmasına rağmen, kolajen liflerinin genel mimarisinin histolojik düzeyde korunduğunu göstermektedir.

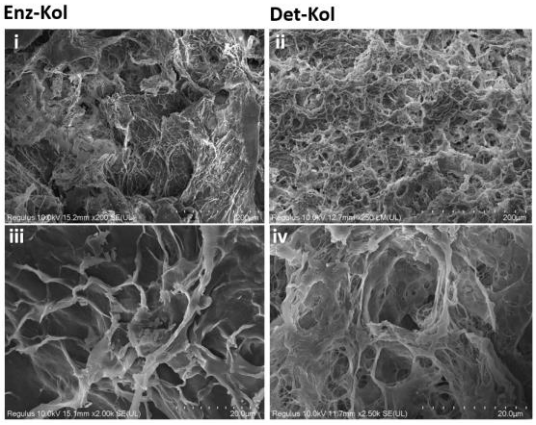


Şekil 4. 4. Hidroksipirolin miktarı: WJ (1.51 µg/mg), Enz-ECM (0.24 µg/mg), Det-ECM (0.28 µg/mg).

4.4. Kolajen Karakterizasyonu

4.4.1. SEM (taramalı elektron mikroskobu)

Her iki grup için farklı büyütme düzeylerinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri elde edilerek yapısal özellikler incelenmiştir. Enz-Kol grubunda gözlemlenen yapılar, geniş porlara sahip olup belirgin lifli bir organizasyon göstermektedir (Şekil 4.5. A). Det-Kol grubunda ise, dokunun fazla porlu ve birbirine bağlı liflerden oluşan bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5. B). Yapılan değerlendirme sonucunda, her iki grubun yapısal özelliklerinin büyük ölçüde benzer olduğu ve normal kolajen dokusundan beklenen mikro yapısal özellikleri yansıttığı görülmüştür.



Şekil 4. 5. Enz-Kol ve Det-Kol, kolajen örneklerinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri. Farklı büyütmelerde: i ve ii (200um), iii ve iv (20um) porlu ve lifli yapılar görülmüştür.

4.4.2. FTIR (dönüşümlü fourier kızılötesi spektroskopi)

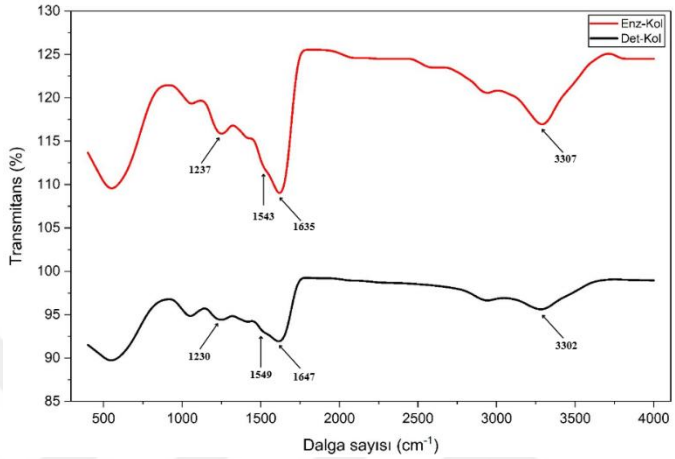
Amide A bandı, yaklaşık 3300 cm^{-1}'de gözlenen pikler ile temsil edilir ve kolajen yapısına entegre hidrojen bağları ile proteinin yapısal bütünlüğü hakkında bilgi sağlar. Bu bağlar 3328 cm^{-1}'deki bantta görünür (Wang et al., 2007). Amide I bandı, 1600–1700 cm^{-1} aralığında gözlenir ve C=O gerilimi ile ilişkili olup, kolajenin triple heliks yapısını göstermektedir: bu bağlar 1645 cm^{-1}'deki bantta görünür (Bryan et al., 2007) . Amide II bandı ise 1540–1550 cm^{-1}'de bulunur; N-H bükülmesi ve C-N gerilimi ile protein ikincil yapısı ile hidrofobik/hidrofilik etkileşimler hakkında bilgi verir. Bu bağlar 1548 cm^{-1}'deki bantta görünmüştür (Riaz et al., 2018). Amide III bandı, 1220–1300 cm^{-1} aralığında (Friess & Lee, 1996), C-N gerilimi ve N-H bükülmesi kombinasyonu olarak gözlenir ve kolajenin triple heliks stabilitesinin doğrulanmasında kullanılır.

Enz-Kol grubuna ait FTIR spektrumları Şekil 4.6'da sunulmuştur. Bu gruba ait spektrum incelendiğinde, Amid A bandının yaklaşık 3307 cm^{-1} dalga sayısında gözlendiği belirlenmiştir. Amid I bandı 1635 cm^{-1}'de, Amid II bandı 1543 cm^{-1}'de, Amid III bandı ise 1237 cm^{-1} dalga sayısında tespit edilmiştir. Bu piklerin varlığı, Enz-Kol grubundaki kolajen yapısının karakteristik spektral özelliklerini koruduğunu göstermektedir.

Det-Kol grubuna ait FTIR spektrumları da Şekil 4.6.'da sunulmuştur. Bu gruba ait spektrum incelendiğinde, Amid A bandının yaklaşık 3302 cm^{-1} dalga sayısında gözlendiği belirlenmiştir. Amid I bandı 1647 cm^{-1}'de, Amid II bandı 1549 cm^{-1}'de,

Amid III bandı ise 1230 cm^{-1} dalga sayısında tespit edilmiştir. Bu piklerin varlığı, Det-Kol grubundaki kolajen yapısının koruduğunu göstermektedir.

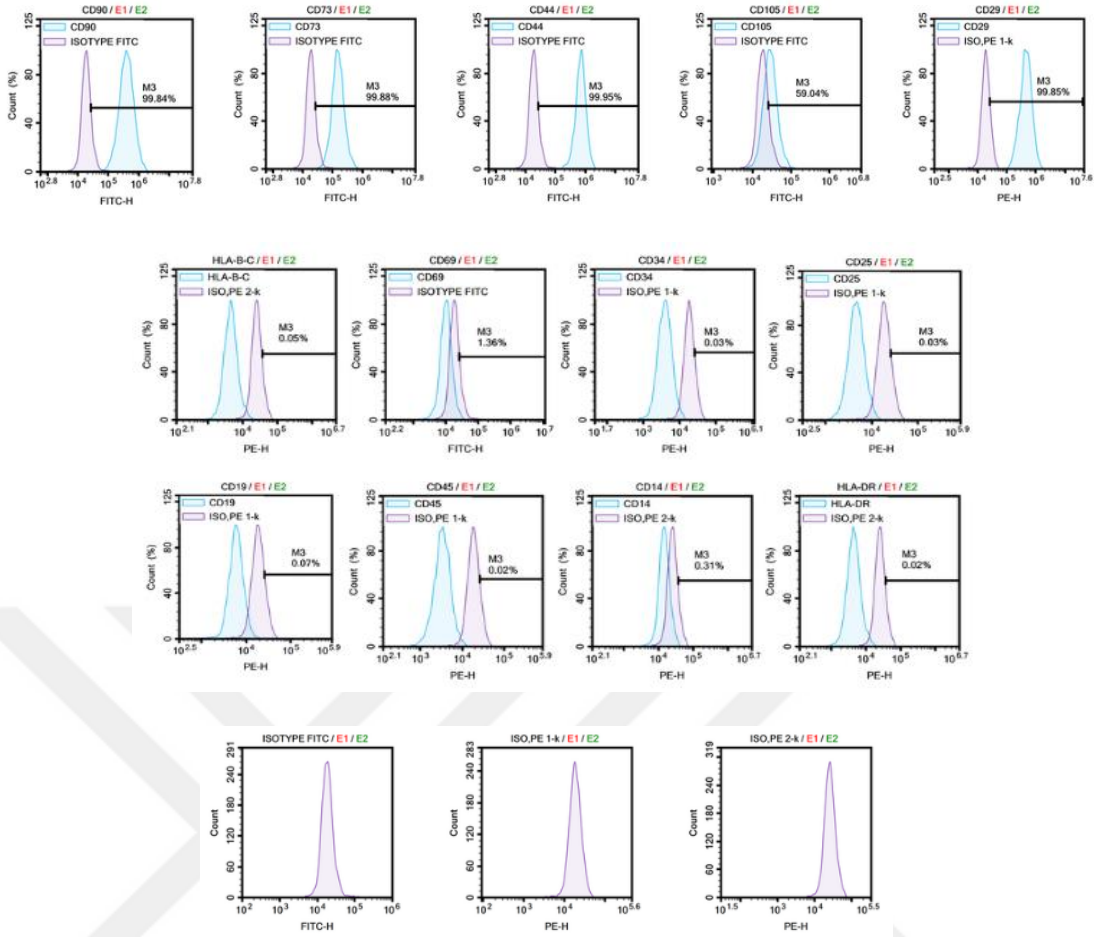
Burada, histolojik ve FTIR analizlerinde kolajen yapısının korunmuş olması, ECM'nin yapısal bütünlüğünün sürdüğünü göstermektedir.



Şekil 4. 6. Kolajen örneklerinin FTIR spektrumları. Enz-Kol: Amid A (3307 cm-1), Amid I (1635 cm-1), Amid II (1543 cm-1), Amid III (1237 cm-1). Det-Kol: Amid A (3302 cm-1), Amid I (1647 cm-1), Amid II (1549 cm-1), Amid III (1230 cm-1).

4.5. WJ-MKH'lerin Flow Sitometri Karakterizasyonu

WJ-MKH'ler 3. pasaj aşamasına geldiğinde, hücrelerin immünofenotipik özellikleri flow sitometri analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, kök hücre belirteçlerinden CD90 pozitifliği %99.84, CD73 pozitifliği %90.88, CD44 pozitifliği %99.95, CD105 pozitifliği %59.04 ve CD29 pozitifliği %99.85 olarak belirlenmiştir. Negatif belirteçlerin oranları ise HLA-B-C %0.05, CD69 %1.36, CD34 %0.03, CD25 %0.03, CD19 %0.07, CD45 %0.02, CD14 %0.31 ve HLA-DR %0.02 şeklinde tespit edilmiştir.



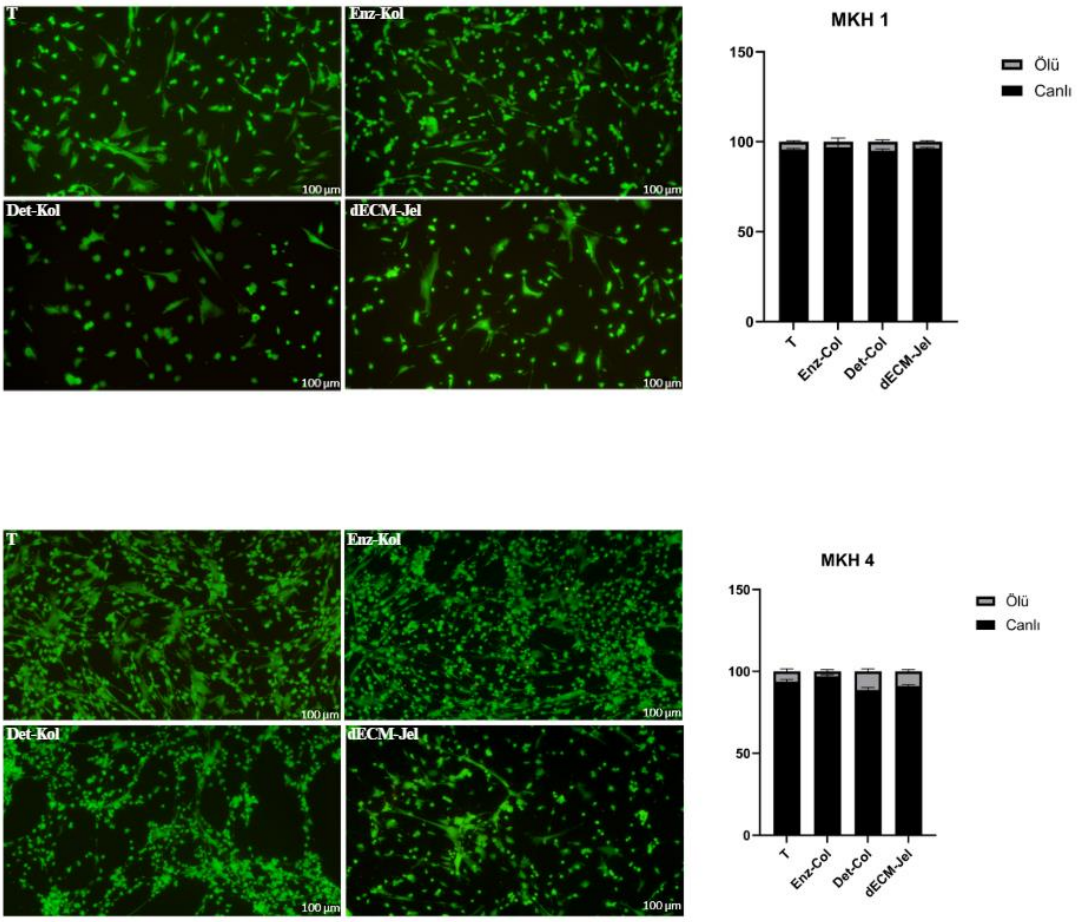
Şekil 4. 7. WJ MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD90 (99.84%), CD73 (90.88%), CD44 (99.95%), CD105 (59.04%) ve CD29 (99.85%) pozitifken, HLA-B-C(0.05%),CD69 (1.36%), CD34 (0.03%), CD25 (0.03%), CD19 (0.07%), CD45 (0.02%), CD14 (0.31%).

4.6. Kolajenin Hücreler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

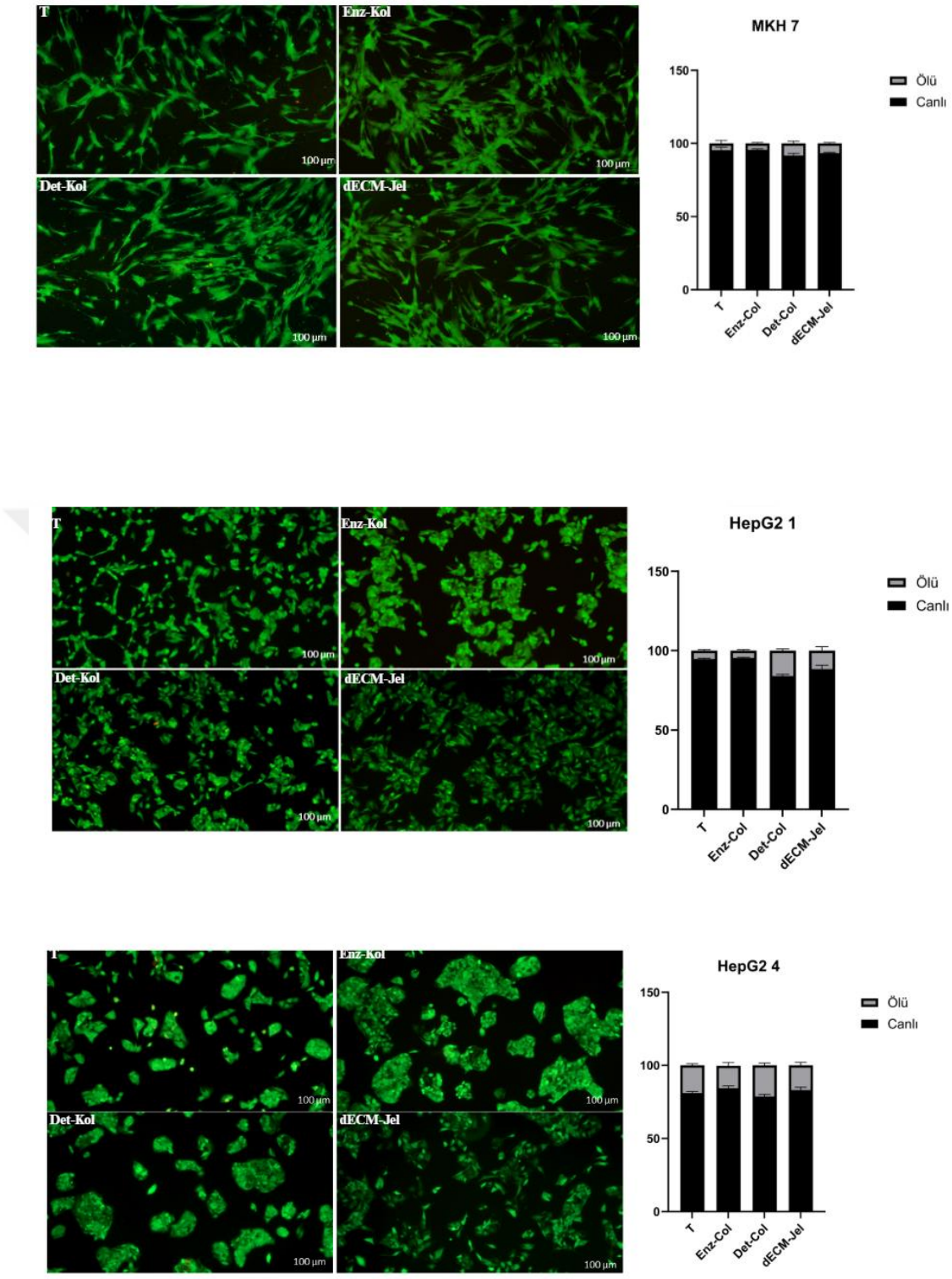
4.6.1. Canlı/ölü boyama ile hücre canlılığı analizi

MKH ve HepG2 hücreleri üzerinde Enz-Kol, Det-Kol, dECM jel ve ticari kolajen (T) uygulanarak canlı/ölü hücre boyaması yapılmıştır. Hücreler, 1., 4. ve 7. günlerde floresan mikroskop altında incelenmiştir. Sonuçlar, tüm gruplarda canlı hücrelerin ağırlıklı olduğunu göstermektedir. 1. gün MKH görüntülerine bakıldığında, T kolajen ve Enz-Kol gruplarında hücrelerin çoğunluğunun sağlam, parlak yeşil renk verdiği ve sağlıklı göründüğü görülmüştür. Bunun yanında, Det-Kol ve dECM jel gruplarında gözle görülür tamamen kırmızı hücreler olmasa da detaylı incelendiğinde hücrelerde diğer gruplarla karşılaştırıldığında kısmen düşük canlılık oranı görülmüştür. MKH'lerin 4. gün görüntülerinde Det-Kol grubuna ekilen hücrelerde ölü

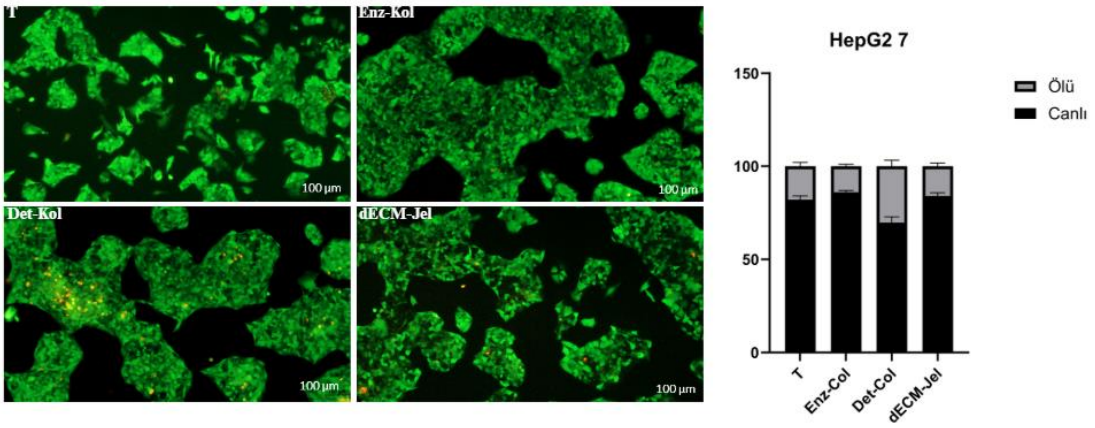
hücre oranının bir miktar yükseldiği görülmektedir. Kolajen grubları arasında Enz-Kol grubu neredeyse ilk günkü gibi ilerledi ve dECM grubunda da ortalamanın üstünde canlı hücre oranı gözlemlenmiştir. 7. gün ise ticari kolajen grubuna en yakın sonuçlar Enz-Kol ve dECM jel gruplarında görülmüş ve Enz-Kol grubu ise en yüksek canlılık oranına sahip oldugu tesbit edilmiştir. Canlı ölü boyama görüntülerine göre matriks üzerine ekilen HepG2'ler içinde sonuçlar benzer şekilde olmuş ve en fazla canlılık Enz-Kol ve ticari kolajen grublarında olmuş ve genellikle bütün grublarda %90 üzerinde canlılık tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. MKH ve HepG2 hücrelerinin Ticari kolajen, Enz-Kol ve Det-Kol grupları ve dECM-Jeli matriksine ekiminin 1., 4. ve 7. günlerinde canlı ve ölü boyama sonuçlarının karşılaştırılması.



Şekil 4.9. MKH ve HepG2 hücrelerinin Ticari kolajen, Enz-Kol ve Det-Kol grupları ve dECM-Jeli matriksine ekiminin 1., 4. ve 7. günlerinde canlı ve ölü boyama sonuçlarının karşılaştırılması



Şekil 4.9. MKH ve HepG2 hücrelerinin Ticari kolajen, Enz-Kol ve Det-Kol grupları ve dECM-Jeli matriksine ekiminin 1., 4. ve 7. günlerinde canlı ve ölü boyama sonuçlarının karşılaştırılması (Devam Ediyor)

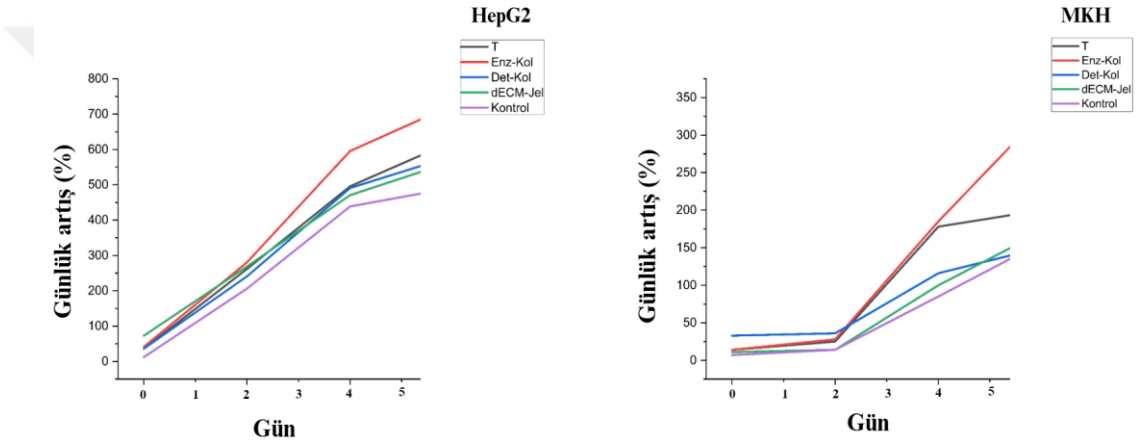
4.6.2. Proliferasyon analizi

Bu çalışmada, proliferasyon analizi yapılarak iki farklı hücre hattı, MKH ve HepG2 hücreleri üzerinde dECM jeli, ticari ve saflaştırılmış kolajen gruplarının etkileri incelenmiştir. Deney kapsamında, kaplamasız ve kolajen kaplamalı yüzeylere ekilen hücreler beş gün boyunca her gün kaldırılarak hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sayesinde, farklı jel kompozisyonlarının hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, ticari kolajen (T) grubu pozitif kontrol olarak değerlendirilmiş ve MKH hücreleri üzerindeki etkisi, beklenildiği üzere yüksek proliferasyon oranı göstermiştir. Bununla birlikte, ticari kolajen grubuna en yakın ve hatta bazı noktalarda daha yüksek proliferatif etki gösteren grubun enzimatik olarak elde edilen kolajen (Enz-Kol) olduğu belirlenmiştir. Bu durum, enzimatik yöntemle saflaştırılmış kolajenin hücre tutunması ve çoğalması açısından oldukça uygun bir mikroyapı sağladığını düşündürmektedir. Ayrıca, protein içeriği açısından daha zengin olan dECM jel tabanına ekilen MKH hücrelerinde de beş gün boyunca konfluens değerlerinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu artışın, jel yapısında bulunan ek matriks proteinlerinin hücrelerin adezyon ve proliferasyonunu desteklemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Benzer şekilde, HepG2 hücre hattında da Enz-Kol grubunun hücre çoğalması üzerindeki etkisinin olumlu yönde olduğu tespit edilmiştir. Her iki hücre hattında da

grupların ve özellikle Enz-Kol ve dECM jel gruplarının etkilerinin ikinci günden itibaren belirgin hale geldiği gözlemlenmiştir. HepG2 hücrelerinde Enz-Kol grubunda hücrelerde ikinci gün itibarıyla 4 cü güne kadar yüksek çoğalma gözlemlenmiştir. Buna karşın, Det-Kol ve dECM-Jel grubunda hücre çoğalmasının T grubu ile benzer ilerlediği görülmüştür. MKH hücrelerinde dECM-Jel grubu ise ilk iki ve üçüncü günlerde yüksek değerler gösterse de sonraki günlerde Det-Kol grubuna benzer etki göstermiştir. Enz-ECM grubu 4 gün boyunca ticari kolajenle beraber ilerleme gösterse de beşinci günün sonunda en yüksek hücre sayısı ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, her iki hücre grubunda kaplamasız ekilen hücre grubu olan Kontrol grubunda, beklenildiği üzere düşük proliferasyon gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 10. HepG2 ve MKH hücrelerinin 5 günlük proliferasyon artımları.

5. TARTIŞMA

Kolajen, hücre dışı matriksin en önemli bileşenlerinden biri olarak yalnızca yapısal destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücresel davranışların düzenlenmesinde de aktif rol oynar. Farklı tipleriyle dokulara özgü özellikler kazandıran kolajenler, hücre tutunması, göçü ve farklılaşması gibi temel biyolojik süreçleri etkileyebilmektedir (Linsenmayer, 1991). Son yıllarda yapılan çalışmalar, kolajenin klasik yapısal işlevlerinin ötesinde, biyokimyasal sinyalleşme ve immünolojik yanıtlar gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde de görev aldığını ortaya koymuştur. Bu doğrultuda, kolajen kaynaklı biyomateryallerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanım potansiyeli giderek artmaktadır. Çalışmamız esasında elde edilen bulgular, kolajenin hücresel davranış üzerindeki bu çok yönlü etkilerini anlamaya yönelik önemli veriler sunmaktadır.

Bu çalışmada, insan göbek kordonundan izole edilen Wharton jeli dokusunun hücresizleştirilmesi ve bu dokudan kolajen elde edilmesi amaçlanmıştır. Hücresizleştirme süreci boyunca doğal matriks yapısının korunması, hücresel kalıntıların tamamen uzaklaştırılması ve elde edilen yapının biyolojik bütünlüğünün sürdürülebilmesi hedeflenmiştir.

Göbek kordonundan Wharton jeli izolasyonu, literatürde bildirilen standart prosedürlere uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Normal doğumla alınan göbek kordonu örnekleri kurumsal inceleme kurulu onayı ile ve aseptik koşullarda hazırlanmıştır. Kordon segmentleri dikkatlice diseke edilerek damar yapıları çıkarılmış ve yalnızca Wharton jeli dokusu izole edilmiştir (Bakhshi et al., 2008). Bu yöntem, Wharton jeli dokusunun yapısal bütünlüğünü koruyarak sonraki hücresizleştirme ve kolajen izolasyon adımlarına uygun bir başlangıç materyali sağlamaktadır. Dolayısıyla, kullanılan prosedürün güvenilirliği ve tekrar edilebilirliği, çalışmada elde edilen dECM jeli ve kolajen örneklerinin biyolojik ve yapısal değerlendirmelerine sağlam bir temel oluşturmuştur.

Deterjan bazlı hücresizleştirme yöntemlerinde en yaygın kullanılan ajan Triton X-100'dür. Kullanılan konsantrasyon dokunun türüne bağlı olarak değişmekte olup genellikle %1 ile %5 arasında uygulanmaktadır (Grauss et al., 2003). Triton X-100 ile yapılan uygulamalarda elde edilen sonuçlar dokunun tipine bağlı olarak değişkenlik göstermekte ve işlem sırasında glikozaminoglikanlar (GAG'lar) kısmen

uzaklaştırılabilmektedir. Başka bir çalışmada, domuz derisi parçaları %0,1'lik SDS çözeltisi ile 6 saat boyunca muamele edilmiş ve hücre uzaklaştırma oranının arttığı, ancak tamamen yeterli olmadığı gözlemlenmiştir (Chen et al., 2004). Bu durum, SDS solüsyonu ile tedavi süresinin uzatılmasının hücresizleştirme verimliliğini artırabildiğini doğrulamaktadır. Genel olarak SDS, nükleer kalıntılar ve sitoplazmik proteinlerin etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamakla birlikte, doğru konsantrasyon ve zamanlama uygulanmadığında doğal doku mimarisini bozma, GAG içeriğini fazladan azaltma ve kolajen yapısına zarar verme riski taşımaktadır. Bu nedenle deterjan aşamasında SDS kullanılmaması kararı alınmıştır. Bazı çalışmalarda EDTA içeren protokoller de kullanılmaktadır; burada EDTA'nın amacı, dokudaki hücrelerin matrikse bağlanmasını zayıflatarak sonraki kimyasal veya enzimatik işlemlerin etkinliğini artırmaktır (Bader et al., 1998). Örneğin Dahl ve arkadaşları, DNA miktar tayini ile Triton X-100/EDTA protokolünün intima-media tabakasındaki hücreleri tamamen uzaklaştırmada yetersiz olduğunu, buna karşın %0,05 SDS uygulamasının etkili olduğunu göstermiştir (Dahl et al., 2003). Çalışmamızda EDTA kullanılmasının sebebide hücresizleştirme aşamasına yardımcı etki yarata bilmesidir. Literatür, deterjan bazlı yöntemlerin bazı durumlarda yeterince etkili olmayabileceğini ve enzimatik uygulamaların ek fayda sağlayabileceğini de belirtmektedir. Örneğin, Yeni Zelanda beyaz tavşanlarının trakea dokusu vakum altında 2, 4, 6 ve 8 KU/mL DNase I ile hücresizleştirilmiş; histolojik ve immünohistokimyasal analizler, doğal trakea ile karşılaştırıldığında hiyerarşik yapının korunduğunu, kondrosit dışı hücrelerin etkin bir şekilde uzaklaştırıldığını ve iskelenin antijenitesinin belirgin ölçüde azaldığını göstermiştir (Wang et al., 2021). Bu sonuçlar bizim Enz-Kol grubunun histolojik boyama sonuçları ile benzer olmaktadır. Jin ve arkadaşları, hücre dışı matriks birikiminin %0,5 Triton X-100 ve 20 mM NH_4OH kullanılarak hücresizleştirildiğini göstermiştir (Jin et al., 2025). Ancak kimyasal ajanların aşırı kullanımı kolajen liflerinin bütünlüğünü olumsuz etkileyebilmektedir (Crapo et al., 2011). Literatürde, deterjan bazlı hücresizleştirme yöntemlerinin ECM yapısını koruma ve hücresel kalıntıları uzaklaştırma açısından farklı sonuçlar verdiği bildirilmektedir. SDS ve sodyum deoksikolat güçlü hücre uzaklaştırma sağlarken dokuda hasara yol açabilmekte, Triton X-100 ve EDTA kombinasyonları ise ECM'i koruyarak daha nazik bir hücresizleştirme sunmaktadır (Badylak et al., 2011; Dahl et al., 2003). Bu çalışmada, hücre membranlarının geçirgenliğini artırmak ve ECM bütünlüğünü korumak amacıyla %1 Triton X-100 ve %0,1 NH_4OH içeren hipotonik

bir çözeltide EDTA kombinasyonu kullanılmıştır. Yukarıdakı literatür araştırmalarına bakarak söyleye biliriz ki, çalışmamızda hipotonik ortam hücre materyalinin daha etkili salınmasını sağlarken, EDTA hücrelerin matrikse bağlanmasını zayıflatarak işlemin etkinliğini artırmıştır. Ardından uygulanan DNaz işlemi, özellikle DNA kalıntılarının parçalanmasını sağlayarak daha saf bir hücresizleştirilmiş doku elde edilmesini mümkün kılmıştır (Dubus et al., 2022). Bu yaklaşım, hem hücresel kalıntıların etkin şekilde uzaklaştırılmasını hem de ECM yapısının korunmasını sağlayarak, literatürde bildirilen sınırlamaları aşan dengeli ve güvenilir bir hücresizleştirme stratejisi sunmaktadır. Böylece elde edilen Wharton jeli, dECM'den kolajen izolasyonu ve hücre deneyleri için uygun bir temel oluşturmuştur.

Wharton jelinin hücresizleştirilmesi tamamlandıktan sonra, elde edilen dokunun yapısal ve biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, uygulanan yöntemin etkinliğini ve doku bütünlüğü üzerindeki etkisini anlamak için literatürde bildirilen farklı Wharton jeli kaynaklı hücresizleştirme ve karakterizasyon yaklaşımları incelenmiştir. Böylece hem kullanılan yöntemin önceki çalışmalarla olan benzerlik ve farklılıkları belirlenmiş hem de elde edilen sonuçların literatürle uyumluluğu değerlendirilmiştir. Literatürde, Wharton jeli dokusunun hücresizleştirilmesine yönelik çalışmalarda farklı karakterizasyon yöntemlerinin uygulandığı görülmektedir. Bazı araştırmalarda, deterjan ve ardından enzimatik uygulama ile elde edilen Wharton jeli örneklerinde hücresizleştirmenin başarısı; DAPI boyama, çeşitli histolojik boyamalar, DNA miktar tayini ve kolajen miktar analizleriyle doğrulanmıştır (Dubus et al., 2022). Bu analizler, hücresel kalıntıların uzaklaştırıldığını ve ECM yapısının korunduğunu göstermek amacıyla kullanılmıştır. Diğer bir çalışmada ise, göbek kordonundan elde edilen hücresizleştirilmiş iskele örnekleri histolojik ve immünohistokimyasal boyamalarla değerlendirilmiş; bu yöntemlerle dokunun hücresel yapısının tamamen temizlendiği ve kolajen lif düzeninin korunduğu rapor edilmiştir (Yuan et al., 2022). Bu literatür bulgularından hareketle, çalışmamızda da hücresizleştirme sürecinin etkinliğini ve elde edilen doku iskelelerinin yapısal bütünlüğünü değerlendirebilmek amacıyla çok yönlü bir karakterizasyon yaklaşımı benimsenmiştir. Literatürde de benzer şekilde, enzimatik ve deterjan temelli protokollerin Wharton jeli veya diğer bağ dokularında hücresizleştirme için etkili olduğu bildirilmektedir (Badylak et al., 2011; Gilbert et al., 2006). Uygulanan

yöntemler, hem hücresel kalıntıların tamamen uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığını hem de ECM yapısının, özellikle kolajen içeriğinin korunup korunmadığını belirlemeye yöneliktir. Bu kapsamda öncelikle DAPI boyası kullanılarak dokularda nükleer kalıntıların varlığı incelenmiş ve çekirdeğe özgü floresan sinyalin gözlenmemesi hücresizleştirmenin etkinliğini doğrulayıcı bir gösterge olarak değerlendirilmiştir (Gao et al., 2025).

Doku morfolojisinin ve ECM bileşenlerinin korunma durumunu analiz edebilmek amacıyla çeşitli histolojik boyamalar uygulanmıştır. Bu bağlamda, Hematoksilen-Eozin boyası, genel doku bütünlüğünü ve hücresel yapıların varlığını değerlendirmek için kullanılmıştır. Deney gruplarımızda çekirdekler koyu mor ve hücresel bileşenler ise pembe renkde boyanmıştır. Masson's Trikrom boyası, özellikle kolajen liflerinin dağılımını ve yoğunluğunu ortaya koymak amacıyla uygulanmış ve kolajen lifleri mavi renge boyanmıştır. Alcian Blue boyası, Wharton jeli ECM'sinde önemli bir yer tutan GAG içeriklerinin tespiti için tercih edilmiş ve hücresizleştirme işleminin bu yapılar üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Glikozaminoglikan içeriği açık mavi renge boyanmıştır (Bhunia & Mandal, 2018). Safranin O boyası ise kırmızı renkle boyanmış proteoglikan içeriğini göstermek üzere kullanılmış, bu sayede ECM'nin biyokimyasal bileşenlerinin korunma durumu hakkında ek bilgi sağlanmıştır (Xu et al., 2014). Buna karşın mevcut yöntemde, Ezn-ECM grubun histolojik analizlerinde hem hücresel kalıntıların etkin biçimde uzaklaştırıldığı hem de ECM'nin yapısal bütünlüğünün korunduğu görülmüştür. Bu durum, uygulanan işlemin dokuya minimal zarar vererek biyolojik uygunluğunu sürdürdüğünü göstermektedir. Ayrıca Det-ECM grubunda H&E boyama sonuçları esasında yüksek oranda hücresizleştirme olmasına rağmen az miktrarda kalan hücre kalıntıları ve DNA parçalarının ECM yapısını yapatmasından dolayı liflerde daha dağınık ve soluk görüntünün ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır. IF boyamaları sırasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücresizleştirilmiş ECM örneklerinde kolajen ve fibronektin miktarlarında benzer oranlarda azalma gözlenmiştir. Histolojik boyama sonuçlarıyla paralel bir değerlendirme yapıldığında, Det-ECM grubunda fibronektin boyaması sırasında elde edilen düzensiz görüntünün hücre ve DNA kalıntılarının varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, paralel olarak gerçekleştirilen DAPI boyama sonuçlarında da benzer bulguların gözlemlenmesi bu durumu desteklemektedir.

Hücresel DNA kalıntılarının kantitatif analizi için DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve Enz-Kol grubunda %88,09 oranında DNA azalması gözlenmiştir; bu sonuç, hücresizleştirilmiş insan Wharton jeli iskelelerine ait DNA analiz bulgularıyla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (Kehtari et al., 2019). Elde edilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir (Elder et al., 2009). DNA miktarındaki azalma ve düşük molekül ağırlıklı fragmanların gözlenmesi, nükleer materyalin etkin biçimde uzaklaştırıldığını ortaya koymuştur (Fayon et al., 2022). Bununla birlikte ECM'nin kolajen içeriğinin korunup korunmadığını belirlemek amacıyla standart kit protokolu esasından hidroksiprolin testleri yapılmıştır. Başka çalışmalarda, HYP konsantrasyonu ile kolajen içeriği arasındaki ilişkiyi incelenmiş ve elde ettikleri standart eğri ile regresyon analizi sonuçlarına dayanarak kolajen miktarını güvenilir bir şekilde değerlendirilmiştir (Lin & Kuan, 2010). Bu analiz, kolajen miktarının nicel olarak doğrulanmasını sağlamış ve elde edilen dECM'nin biyokimyasal bütünlüğünü destekleyici kanıt sunmuştur. Yapılan tez çalışmasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman hücresizleştirilmiş grublar bir birile yakın sonuçlar göstererek hidroksipirolin miktarının başlangıç dokudan 3 kat azaldığı tesbit edilmiştir.

Kolajen elde etmede yaygın olarak asit, alkali veya tuz çözeltileri kullanılarak kimyasal hidroliz uygulanır. Bazı durumlarda enzimler, ultrason veya mikrodalga uygulamaları ekstraksiyon sürecini destekler (Senadheera et al., 2020). İşlem genellikle düşük sıcaklıklarda yürütülür ki (≈4 °C) kolajenin doğal yapısı korunabilsin (Pal & Suresh, 2016). Bu sebepden çalışmamızın, bütün gruplar için dECM jeli hazırlanması aşaması buzdolabı 4°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon yöntemi, verim ve ürün özelliklerine göre seçilir; polipeptit zincirlerinin uzunluğu, çözünürlük, viskozite ve termal kararlılık bu seçimden etkilenir (Zhang et al., 2020). Ayrıca, ön işlem koşulları, deri türü, hayvanın yaşı ve cinsiyeti gibi faktörler, elde edilen kolajenin miktarını ve kalitesini belirler (Sorushanova et al., 2021). Bu nedenle, çalışmamızda ön işlem koşullarını dikkatle optimize ederek saf kolajen elde etmeye odaklandık. Ön işlemden sonra kolajen ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Geleneksel yöntemler, kimyasal hidroliz esasına dayanır ve asit, alkali veya tuz çözeltileri kullanılır. Bir çok çalışmada, farklı yöntemler kullanılarak kolajen çökeltisi elde edilmiştir. Asit hidrolizi genellikle organik asitler olan asetik (Almeida et al., 2012; Liu et al., 2015; Prestes, 2013), sitrik, laktik asit ile yapılmıştır. Bu yöntem kolajendeki

bağları kırarak çözünmesini sağlar ve genellikle yüksek verim verir. Alkali hidrolizi, sodyum veya potasyum hidroksit gibi çözeltilerle yapılır (Pal & Suresh, 2016); bu yöntemin özellikle deri işleme atıklarından kolajen elde etmek için uygun olduğu gösterilmiştir (Naomi et al., 2021), ancak bazı amino asitlerin kaybına neden olabilir (Yang & Shu, 2014). Tuz çözündürme ise nötr tuz çözeltileri kullanarak kolajeni çözündürmeyi amaçlar (Schmidt et al., 2016); bu yöntem daha az yaygın olmakla birlikte hassas kontrol ile yüksek kolajen çözünürlüğünü sağlar (Pal & Suresh, 2016; Schmidt et al., 2016). Buradaki yöntemler incelendiğinde, kolajen liflerinin yapısal bütünlüğüne ve içerdiği önemli biyokimyasal bileşenlere zarar vermeden saflaştırma yapmanın en uygun yolunun tuzla çöktürme yöntemi olduğu görülmektedir. Başka bir ifadeyle, bu yöntem kolajeni bozmadan çöktürerek elde etmeyi sağlar ve böylece kolajenin doğal yapısını koruyarak saflaştırılmasına olanak tanır. Bu nedenle, Wharton jeli kaynaklı dECM'den kolajen elde etmek amacıyla tuzla çöktürme yöntemi uygulanmıştır.

Kolajenlerin kendine özgü morfolojik bir yapısı bulunmaktadır ve farklı fonksiyonel gruplar içermektedir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, kolajenlerin tipik olarak gözenekli (porlu) ve lifsi bir yapı sergilediği görülmektedir. Yapay dermis uygulamaları için tasarlanmış kolajen iskelelerinde, SEM iskelelerin gözenek boyutlarını ve kolajen çapraz bağlamanın derecesini ölçmek için kullanılmıştır (Ma et al., 2004; Zhang et al., 2002). Yapılan bir çalışmada, bakteriyel selüloz/kolajen kompozitinin SEM görüntüleri incelenmiş ve birbirine bağlı gözeneklerin ortalama 15 μm boyutunda olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada, düzenli bir şekilde organize olmuş üç boyutlu gözenekli ağ yapısının elde edildiği belirtilmiş, bu yapının hücre tutunması ve doku rejenerasyonu açısından uygun bir mikroçevre sağladığı vurgulanmıştır (Zhijiang & Guang, 2011). Başka bir çalışmada, insan dentin kolajeninin zamanla bozulduğu ve ağ yapısının düzensizleştiği gözlemlenmiştir (Hashimoto et al., 2003). Bu negatif kontrol örneği sayesinde, kendi sonuçlarımızda bozulmuş veya düzensiz kolajen yapısını görmeyi beklemediğimizi ve elde ettiğimiz Wharton jeli kolajenin morfolojik olarak korunmuş bir ağ yapısı sergilemesini beklediğimizi anlayabiliriz. Bu nedenle, ekstrakte ettiğimiz kolajenin karakteristik lifli morfolojiye sahip olması beklenmiştir. Çalışmamızda elde edilen kolajen gruplarında, başlangıçta uygulanan hücresizleştirme yöntemleri arasında bazı farklılıklar bulunmasına rağmen, morfolojik olarak benzer yapısal özellikler gösterdikleri

gözlemlenmiştir. Lakin, kolajenin saflığı sadece morfolojiyle belirlenemez. FTIR analizlerinde özellikle dikkat edilmesi gereken piklerin Amid A, Amid I (Belbachir et al., 2009), Amid II, Amid III (Stani et al., 2020) bandları olduğu bilinmektedir (Riaz et al., 2018). Bu bantlar, kolajenin peptid bağları ve üç boyutlu yapısının korunup korunmadığını değerlendirmek için kullanılır. Literatürde belirtilen bu piklerin, her iki grup kolajen örneğinde benzer oranlarda gözlemlenmesi, söz konusu örneklerin kolajene özgü fonksiyonel grupları ve yapısal özellikleri koruduğunu bir kez daha doğrulamaktadır.

Hücre kültüründe kolajenin hücreler üzerindeki etkisine bakmak için önce kullanılan hücreleri çok iyi tanımamız gerekmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında iki hücre hattı kullanılmıştır. Bunlardan birincisi karaciğer karsinom hücre hattı olan HepG2 hücreleri ve diğeri ise insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerdir. HepG2 hücre hattı, iyi karakterize edilmiş ve karaciğer fonksiyonlarını kısmen koruyan, literatürde kolajen ile etkileşim çalışmalarında sık kullanılan bir modeldir. Kolajen matriksi üzerine ekildiğinde çoğalma ve hücre davranışlarını öngörülebilir şekilde gösterdiği bilinmektedir (Zheng et al., 2017). Bu sebeple, kolajenin hücreler hücreleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla çalışmamızda HepG2 hücre hattını tercih ettik. Mezenkimal kök hücrelerden bahsedecek olursak veya multipotent stromal hücreler, hemen hemen tüm bağ dokularından izole edilebilen yetişkin kökenli multipotent hücrelerdir (da Silva Meirelles & Chagastelles). Bu hücrelerin kendini yenileme yeteneğine sahip olduğu ve uygun in vitro koşullar altında mezodermal, endodermal ve hatta ektodermal soy hatlarına farklılaşabildikleri iyi bilinmektedir (Lakshmipathy & Verfaillie, 2005; Pittenger et al., 1999). Ayrıca minimal immün yanıt oluşturmaları (Tse et al., 2003) ve *in vivo* ortamda anti-inflamatuar ile immünmodülatör etkilere sahip biyoaktif faktörler salgılamalarıyla dikkat çekmektedirler (Caplan & Dennis, 2006; Le Blanc, 2003). Bu özellikleri sayesinde, MKH'ler hücre-matriks etkileşimlerini incelemek için uygun bir model sunmaktadır.

Matriksler, hücre davranışlarını yönlendiren sinyaller sunar ve hücre yüzeyinde bulunan reseptörler bu sinyallere yanıt verir. Ligand ve reseptör etkileşimleri gerçekleştiğinde, hücre içindeki biyokimyasal mekanizmalar aktif hâle gelir ve hücrelerin fonksiyonel aktiviteleri düzenlenir (Rosso et al., 2004). Kolajenin hücreler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan canlı/ölü boyama ve proliferasyon

analizlerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Deney grupları karşılaştırıldığında, Enz-Kol grubu ticari pozitif kontrol ile benzer performans göstermiş ve bazı ölçütlerde küçük bir farkla daha üstün bulunmuştur. Bu durumun nedeni, saf kolajenle hücrelerin integrin reseptörlerinin etkileşime girmesidir (Miranti & Brugge, 2002); bu etkileşim MAPK (Chin et al., 2001), FAK (Viale-Bouroncle et al., 2014) ve PI3K/Akt (Carracedo & Pandolfi, 2008) gibi sinyal yollarını aktive ederek hücre çoğalmasını, farklılaşmasını destekler ve apoptozu önleyerek hücre canlılığını yüksek tutar. Sonuç olarak, kolajen yapısının daha iyi korunması nedeniyle Enz-Kol grubunda hücre-matriks etkileşimi güçlü bir şekilde gerçekleşmiş ve hücrelerin canlılığı ile proliferasyonu olumlu yönde etkilendiğini söyleyebiliriz. Öte yandan, Det-Kol grubunun hücresizleştirme kriterlerine tam olarak uymaması nedeniyle içeriğindeki hücresel kalıntılar, ekilen hücreler arasındaki sinyal iletimini bozmuş ve bu durum çoğalma hızını sınırlamıştır (Crapo et al., 2011); buna rağmen hücrelerin canlılık oranı Enz-Kol grubu kadar olmasada hâlâ yüksek seviyelerde kalmıştır. dECM-Jel grubu hakkında konuşacak olursak, saflaştırılmış kolajen olmadığı için bazı fazlalıkları içeriyor: ECM proteinlerinin pepsinle parçalanmış küçük peptitleri, tuz ve asit kalıntıları, pepsin kalıntısı, vs. pepsinle parçalanmış fibronectin, elastin ve laminin parçacıkları hücre yüzeyinde non-spesifik bağlanmalar yapabilir. Ayrıca asit ve tuz kalıntıları integrin etkileşimini etkiler ve hücreler arası sinyalı bozar. dECM-Jel grubu hücreleri negatif yönde etkilemesinden dolayı Det-Kol grubu ile benzer sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının temel amacı, hücrelerle uyumlu insan kaynaklı bir matriks-kolajen elde etmektir. Elde edilen sonuçlar, izolasyonu yapılan kolajenlerin hücreler üzerindeki etkisinin, uygulanan hücresizleştirme yönteminin başarısı ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir.

Deterjan sonrası enzimatik yöntemle hücresizleştirilmiş kolajen (Enz-Kol) grubunda hem hücresel kalıntıların tamamen uzaklaştırılması hem de kolajen yapısının bütünlüğünün korunması sağlanmış, bu nedenle ticari kolajene benzer özellikler gösterdiği ve hücre proliferasyonunda etkili olduğu belirlenmiştir.

Buna karşılık, yalnızca deterjan ile hücresizleştirilmiş kolajen (Det-Kol) grubunun hücresizleştirme başarı kriterlerini tam olarak karşılamamasına rağmen saf kolajen ekstraksiyonunun mümkün olduğu, ancak bu grubun hücre proliferasyonu açısından Enz-Kol ve ticari kolajen gruplarına kıyasla daha sınırlı bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

dECM jeli ise hücresizleştirme aşamasında enzimatik işlem uygulanması sonucunda elde edilmiş olup yalnızca kolajen değil, diğer protein kalıntıları ve bileşenlerini de içermektedir. Bu ise hücre tutunması ve proliferasyonunu destekleyici bir mikroçevre sunmasına sebep olmuştur. Bununla birlikte, saflaştırılmış kolajen kadar homojen ve stabilize bir yapı sunmaması nedeniyle, hücresel yanıtın Enz-Kol grubuna kıyasla daha değişken olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma %1 Triton X-100 ve %0.1 NH_4OH ile uygulanan tek başına deterjan temelli hücresizleştirmeye enzimatik bir basamağın eklenmesiyle hücresizleştirme başarı kriterlerine ulaşılabildiğini ortaya koymuş ve hücre uyumlu bir ECM elde edilebildiği ortaya konmuştur. Hücresizleştirme sonrası elde edilen ECM'den kolajenin tuzla çüktürme ve diyaliz tüpüyle saflaştırılması kolajenin biyolojik işlevselliğinin korunmasında kritik bir aşama olmuş; elde edilen kolajenin hücresel yanıt açısından ticari kolajen ile karşılaştırılabilir nitelikte olduğu gösterilmiştir.

Gelecek çalışmalarda rezidüel deterjan ve enzim kalıntılarının kantitatif analizi, örneğin Triton X-100 tayininin yapılması biyouyumluluk açısından önemlidir. Diğer taraftan, kolajenin mekanik özelliklerinin (çekme dayanımı, elastik modül vb.) incelenmesinin doku mühendisliği uygulamalarında önemli olduğu, farklı hücre tipleri

örneğin primer fibroblastlar gibi yapılacak çalışmalar ile farklı hücre tiplerine özgü biyolojik yanıtlarının değerlendirilmesi önerilmektedir. Son olarak, bu çalışmada elde edilen kolajen ve dECM-jel sistemlerinin biyobaskı, çip üzerinde organ (organ-on-chip) platformlarında kullanılması ile beraber test edilmesi çalışmanın translasyonel değerini artıracaktır.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Adams, J. C., & Watt, F. M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, *117*(4), 1183-1198.

Almeida, P. F., Vanalle, R. M., & Santana, J. C. C. (2012). Produção de gelatina: Uma perspectiva competitiva para a cadeia produtiva de frango de corte. *Produto & Produção*, *13*(2).

Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2015). Histological stains: a literature revieW and case study. *Global journal of health science*, *8*(3), 72.

Ananthakrishnan, A., Gogineni, V., & Saeian, K. (2006). Epidemiology of primary and secondary liver cancers. Seminars in interventional radiology,

Angelico, R., Grimaldi, C., Saffioti, M. C., Castellano, A., & Spada, M. (2018). Hepatocellular carcinoma in children: hepatic resection and liver transplantation. *Translational gastroenterology and hepatology*, *3*, 59.

Aplin, A. E., & Juliano, R. (1999). Integrin and cytoskeletal regulation of groWth factor signaling to the MAP kinase pathWay. *Journal of cell science*, *112*(5), 695-706.

Bader, A., Schilling, T., Teebken, O. E., Brandes, G., Herden, T., Steinhoff, G., & Haverich, A. (1998). Tissue engineering of heart valves–human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *European journal of cardio-thoracic surgery*, *14*(3), 279-284.

Badylak, S. F., Taylor, D., & Uygun, K. (2011). Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annual revieW of biomedical engineering*, *13*(1), 27-53.

Bakhshi, T., Zabriskie, R. C., Bodie, S., Kidd, S., Ramin, S., Paganessi, L. A., Gregory, S. A., Fung, H. C., & Christopherson 2nd, K. W. (2008). Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion*, *48*(12), 2638-2644.

Bakhtyar, N., Jeschke, M. G., Herer, E., Sheikholeslam, M., & Amini-Nik, S. (2018). Exosomes from acellular Wharton's jelly of the human umbilical cord promotes skin Wound healing. *Stem cell research & therapy*, *9*(1), 193.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Ball, L. M., Bernardo, M. E., Roelofs, H., Lankester, A., Cometa, A., Egeler, R. M., Locatelli, F., & Fibbe, W. E. (2007). Cotransplantation of ex vivo–expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *110*(7), 2764-2767.

BańkoWski, E., SoboleWski, K., RomanoWicz, L., ChyczeWski, L., & JaWorski, S. (1996). Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly and their alterations in EPH-gestosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *66*(2), 109-117.

Barbucci, R. (2002). *Integrated biomaterials science*. Springer Science & Business Media.

Beiki, B., Zeynali, B., & Seyedjafari, E. (2017). Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for Wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, *78*, 627-638.

Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G., & Petibois, C. (2009). Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *395*(3), 829-837.

Bensidhoum, M., Chapel, A., Francois, S., Demarquay, C., Mazurier, C., Fouillard, L., Bouchet, S., Bertho, J. M., Gourmelon, P., & Aigueperse, J. (2004). Homing of in vitro expanded Stro-1-or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*, *103*(9), 3313-3319.

Berrier, A. L., & Yamada, K. M. (2007). Cell–matrix adhesion. *Journal of cellular physiology*, *213*(3), 565-573.

Bhunia, B. K., & Mandal, B. B. (2018). Modulation of extracellular matrix by annulus fibrosus cells on tailored silk based angle-ply intervertebral disc construct. *Materials & Design*, *158*, 74-87.

Bingaman, A. W., Waitze, S.-Y., Alexander, D. Z., Cho, H. R., Lin, A., Tucker-Burden, C., CoWan, S. R., Pearson, T. C., & Larsen, C. P. (2000). TRANSPLANTATION OF THE BONE MARROW MICROENVIRONMENT LEADS TO HEMATOPOIETIC CHIMERISM WITHOUT CYTOREDUCTIVE CONDITIONING1. *Transplantation*, *69*(12), 2491-2496.

BroWn, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., Svinarich, D., Dodds, R., Govind, C. K., & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *13*(9), 1738-1755.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Bryan, M. A., Brauner, J. W., Anderle, G., Flach, C. R., Brodsky, B., & Mendelsohn, R. (2007). FTIR studies of collagen model peptides: complementary experimental and simulation approaches to conformation and unfolding. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(25), 7877-7884.

Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, *98*(5), 1076-1084.

Caputo, W. J., Vaquero, C., Monterosa, A., Monterosa, P., Johnson, E., Beggs, D., & Fahoury, G. J. (2016). A retrospective study of cryopreserved umbilical cord as an adjunctive therapy to promote the healing of chronic, complex foot ulcers With underlying osteomyelitis. *Wound Repair and Regeneration*, *24*(5), 885-893.

Carracedo, A., & Pandolfi, P. (2008). The PTEN–PI3K pathWay: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*, *27*(41), 5527-5541.

Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W., & Cao, Y. (2008). Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatric research*, *63*(5), 492-496.

Chen, F.-M., & Liu, X. (2016). Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in polymer science*, *53*, 86-168.

Chen, R.-N., Ho, H.-O., Tsai, Y.-T., & Sheu, M.-T. (2004). Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*, *25*(13), 2679-2686.

Chin, B. Y., Mohsenin, A., Li, S. X., Choi, A. M., & Choi, M. E. (2001). Stimulation of pro-α1 (I) collagen by TGF-β1 in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathWay. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *280*(3), F495-F504.

Choudhury, D., Yee, M., Sheng, Z. L. J., Amirul, A., & Naing, M. W. (2020). Decellularization systems and devices: State-of-the-art. *Acta biomaterialia*, *115*, 51-59.

Chuaychan, S. (2016). Production and characterization of collagen, gelatin and gelatin hydrolysate poWder from scales of spotted golden goatfish. *Prince of Songkla University*.

Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). An overvieW of tissue and Whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, *32*(12), 3233-3243.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., & Zhang, L. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, *3*(3), 301-313.

da Silva Meirelles, L., & Chagastelles, P. NB Nardi Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues., 2006, 119. *DOI: https://doi. org/10.1242/jcs*, *2932*, 2204-2213.

Dahl, S. L., Koh, J., Prabhakar, V., & Niklason, L. E. (2003). Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell transplantation*, *12*(6), 659-666.

Dan, P., Velot, É., Francius, G., Menu, P., & Decot, V. (2017). Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: An untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. *Acta biomaterialia*, *48*, 227-237.

Davies, J. E., Walker, J. T., & Keating, A. (2017). Concise revieW: Wharton's jelly: the rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells. *Stem cells translational medicine*, *6*(7), 1620-1630.

Delorme, B., Ringe, J., Pontikoglou, C., Gaillard, J., Langonné, A., Sensebé, L., Noël, D., Jorgensen, C., Häupl, T., & Charbord, P. (2009). Specific lineage-priming of bone marroW mesenchymal stem cells provides the molecular frameWork for their plasticity. *Stem cells*, *27*(5), 1142-1151.

Ding, D.-C., Shyu, W.-C., & Lin, S.-Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, *20*(1), 5-14.

Dubus, M., Scomazzon, L., Chevrier, J., Montanede, A., Baldit, A., Terryn, C., Quilès, F., Thomachot-Schneider, C., Gangloff, S., & Bouland, N. (2022). Decellularization of Wharton's jelly increases its bioactivity and antibacterial properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 828424.

Eichenmüller, M., Trippel, F., Kreuder, M., Beck, A., SchWarzmayr, T., Häberle, B., Cairo, S., Leuschner, I., von SchWeinitz, D., & Strom, T. M. (2014). The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies With HCC-like features. *Journal of hepatology*, *61*(6), 1312-1320.

Elder, B. D., ElesWarapu, S. V., & Athanasiou, K. A. (2009). Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*, *30*(22), 3749-3756.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S., & Galipeau, J. (2005). Allogeneic marroW stromal cells are immune rejected by MHC class I–and class II–mismatched recipient mice. *Blood*, *106*(13), 4057-4065.

Emami, A., Talaei-Khozani, T., Vojdani, Z., & Zarei Fard, N. (2021). Comparative assessment of the efficiency of various decellularization agents for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *109*(1), 19-32.

Engel, J., & Furthmayr, H. (1987). Electron microscopy and other physical methods for the characterization of extracellular matrix components: laminin, fibronectin, collagen IV, collagen VI, and proteoglycans. In *Methods in enzymology* (Vol. 145, pp. 3-78). Elsevier.

Fayon, A., Helle, D., Francius, G., Vincourt, J.-B., Regnault, V., Dumas, D., Menu, P., & El Omar, R. (2022). Characterization of an innovative biomaterial derived from human Wharton's jelly as a neW promising coating for tissue engineering applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 884069.

Fong, C., Gauthaman, K., Cheyyatraivendran, S., Lin, H., BisWas, A., & Bongso, A. (2012). Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium support hematopoietic stem cell expansion ex vivo. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*(2), 658-668.

Foot, N. C. (1933). The Masson trichrome staining methods in routine laboratory use. *Stain technology*, *8*(3), 101-110.

Franc, S., Rousseau, J.-C., Garrone, R., Van Der Rest, M., & Moradi-Améli, M. (1998). Microfibrillar composition of umbilical cord matrix: characterization of fibrillin, collagen VI and intact collagen V. *Placenta*, *19*(1), 95-104.

Friedenstein, A. J., Gorskaja, J., & Kulagina, N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*, *4*(5), 267-274.

Friess, W., & Lee, G. (1996). Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices. *Biomaterials*, *17*(23), 2289-2294.

Gao, F., Su, S., Qi, J., Li, Z., Wang, C., & Zhong, D. (2025). Decellularized cartilage scaffolds derived from Wharton's jelly facilitate cartilage regeneration and inhibit angiogenesis. *Materials Today Bio*, 102023.

Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery revieWs*, *55*(12), 1531-1546.

Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, *27*(19), 3675-3683.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Grauss, R., Hazekamp, M., Van Vliet, S., Gittenberger-de Groot, A., & DeRuiter, M. (2003). Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *126*(6).

Gupta, P., Chaudhuri, G. R., Janani, G., AgarWala, M., Ghosh, D., Nandi, S. K., & Mandal, B. B. (2021). Functionalized silk vascular grafts With decellularized human Wharton's jelly improves remodeling via immunomodulation in rabbit jugular vein. *Advanced Healthcare Materials*, *10*(19), 2100750.

Gurevitch, O., Prigozhina, T. B., Pugatsch, T., & Slavin, S. (1999). TRANSPLANTATION OF ALLOGENEIC OR XENOGENEIC BONE MARROW WITHIN THE DONOR STROMAL MICROENVIRONMENT1. *Transplantation*, *68*(9), 1362-1368.

Hashimoto, M., Tay, F. R., Ohno, H., Sano, H., Kaga, M., Yiu, C., Kumagai, H., Kudou, Y., Kubota, M., & Oguchi, H. (2003). SEM and TEM analysis of Water degradation of human dentinal collagen. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, *66*(1), 287-298.

Hipp, J., & Atala, A. (2008). Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem cell revieWs*, *4*, 3-11.

HorWitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., Muul, L., & Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marroW-derived mesenchymal cells engraft and stimulate groWth in children With osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(13), 8932-8937.

HorWitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R., Krause, D., & Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *7*(5), 393-395.

Hummon, A. B., Lim, S. R., Difilippantonio, M. J., & Ried, T. (2007). Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material folloWing prolonged storage. *Biotechniques*, *42*(4), 467-472.

Hussey, G. S., Dziki, J. L., & Badylak, S. F. (2018). Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nature RevieWs Materials*, *3*(7), 159-173.

Hynes, R. (2007). Cell–matrix adhesion in vascular development. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *5*, 32-40.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, *110*(6), 673-687.

in't Anker, P. S., Noort, W. A., Kruisselbrink, A. B., Scherjon, S. A., Beekhuizen, W., Willemze, R., Kanhai, H. H., & Fibbe, W. E. (2003). Nonexpanded primary lung and bone marroW–derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood–derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Experimental hematology*, *31*(10), 881-889.

Jadalannagari, S., Converse, G., McFall, C., Buse, E., Filla, M., Villar, M. T., Artigues, A., Mellot, A. J., Wang, J., & Detamore, M. S. (2017). Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. *PloS one*, *12*(2), e0172098.

Jafari, H., Lista, A., Siekapen, M. M., Ghaffari-Bohlouli, P., Nie, L., Alimoradi, H., & Shavandi, A. (2020). Fish collagen: extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. *Polymers*, *12*(10), 2230.

Javanmard, D., Najafi, M., Babaei, M. R., Karbalaie Niya, M. H., Esghaei, M., Panahi, M., Safarnezhad Tameshkel, F., Tavakoli, A., Jazayeri, S. M., & Ghaffari, H. (2020). Investigation of CTNNB1 gene mutations and expression in hepatocellular carcinoma and cirrhosis in association With hepatitis B virus infection. *Infectious Agents and Cancer*, *15*(1), 37.

Jin, W., Yu, Q., Yu, L., Zhou, T., Wang, X., Lu, W., Zhang, X., Ding, L., Hu, Q., & Ni, Y. (2025). HAS1high cancer associated fibroblasts located at the tumor invasion front zone promote oral squamous cell carcinoma invasion via ECM remodeling. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *44*(1), 238.

Kalyuzhnaya, L., Chernov, V., Frumkina, A., Chebotarev, S., Zemlyanoy, D., Tovpeko, D., & Kosulin, A. (2020). Fabrication of human Wharton's jelly extra cellular matrix for tissue engineering. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, *22*(1), 124-130.

Keely, P. J., Fong, A. M., Zutter, M. M., & Santoro, S. A. (1995). Alteration of collagen-dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense α2 integrin mRNA in mammary cells. *Journal of cell science*, *108*(2), 595-607.

Kehtari, M., Beiki, B., Zeynali, B., Hosseini, F. S., Soleimanifar, F., Kaabi, M., Soleimani, M., Enderami, S. E., Kabiri, M., & Mahboudi, H. (2019). Decellularized Wharton's jelly extracellular matrix as a promising scaffold for promoting hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(4), 6683-6697.

Key, M. (2006). Immunohistochemistry staining methods. *Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Fourth Edition*, 47.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Kochetova, E., Matveeva, D., Melik-Pashayev, A., Andreeva, E., Romanov, Y. A., & Buravkova, L. (2025). Selection of Optimal Protocol for Decellularization of Extracellular Matrix of Mesenchymal Stromal Cells of Human Umbilical Cord Tissue. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1-6.

Lakshmipathy, U., & Verfaillie, C. (2005). Stem cell plasticity. *Blood revieWs*, *19*(1), 29-38.

Lavrand, A., Adam, L., Da Rocha, A., Lemaire, F., Loth, C., Baldit, A., Vasseaux, M., Van Gulick, L., Beljebbar, A., & Augusto, P. (2025). Hydrogels from Wharton's jelly as alternative to conventional extracellular matrix-based constructs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147552.

Le Blanc, K. (2003). Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, *5*(6), 485-489.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments: JoVE*(62), 3923.

Li, S., Guan, J.-L., & Chien, S. (2005). Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, *7*(1), 105-150.

Liechty, K. W., MacKenzie, T. C., Shaaban, A. F., Radu, A., Moseley, A. B., Deans, R., Marshak, D. R., & Flake, A. W. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature medicine*, *6*(11), 1282-1286.

Lin, Y.-K., & Kuan, C.-Y. (2010). Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. *Food chemistry*, *119*(3), 1271-1277.

Linsenmayer, T. (1991). Collagen. In *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition* (pp. 7-44). Springer.

Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and gelatin. *Annual revieW of food science and technology*, *6*(1), 527-557.

Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., & Shen, J. (2004). Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. *Biomaterials*, *25*(15), 2997-3004.

Maher, M. K., White, J. F., Glattauer, V., Yue, Z., Hughes, T. C., RamshaW, J. A., & Wallace, G. G. (2022). Variation in hydrogel formation and netWork structure for Telo-, Atelo-and Methacrylated collagens. *Polymers*, *14*(9), 1775.

Mayne, R. (1993). Structure and function of collagen types. *Biology of extracellular matrix*.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Miranti, C. K., & Brugge, J. S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature cell biology*, *4*(4), E83-E90.

Nanaev, A., Kohnen, G., Milovanov, A., Domogatsky, S., & Kaufmann, P. (1997). Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*, *18*(1), 53-64.

Naomi, R., Ridzuan, P. M., & Bahari, H. (2021). Current insights into collagen type I. *Polymers*, *13*(16), 2642.

Nasef, A., Mathieu, N., Chapel, A., Frick, J., François, S., Mazurier, C., Boutarfa, A., Bouchet, S., Gorin, N.-C., & Thierry, D. (2007). Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*, *84*(2), 231-237.

Oleksy, M., DynaroWicz, K., & Aebisher, D. (2023). Advances in biodegradable polymers and biomaterials for medical applications—a revieW. *Molecules*, *28*(17), 6213.

Pal, G. K., & Suresh, P. (2016). Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative food science & emerging technologies*, *37*, 201-215.

Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, *3*(3), 1863-1887.

PatraWalla, N. Y., Kajave, N. S., Albanna, M. Z., & Kishore, V. (2023). Collagen and beyond: a comprehensive comparison of human ECM properties derived from various tissue sources for regenerative medicine applications. *Journal of Functional Biomaterials*, *14*(7), 363.

Pennati, G. (2001). Biomechanical properties of the human umbilical cord. *Biorheology*, *38*(5-6), 355-366.

Penolazzi, L., Pozzobon, M., Bergamin, L. S., D'Agostino, S., Francescato, R., Bonaccorsi, G., De Bonis, P., Cavallo, M., Lambertini, E., & Piva, R. (2020). Extracellular matrix from decellularized Wharton's jelly improves the behavior of cells from degenerated intervertebral disc. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 262.

Perin, L., Sedrakyan, S., Da Sacco, S., & De Filippo, R. (2008). Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability. *Methods in cell biology*, *86*, 85-99.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., JaisWal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, *284*(5411), 143-147.

Place, E. S., Evans, N. D., & Stevens, M. M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature materials*, *8*(6), 457-470.

Planat-Benard, V., Menard, C., André, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.-M., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (2004). Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation research*, *94*(2), 223-229.

Prasad, N., Topping, R. S., & Decker, S. J. (2002). Src family tyrosine kinases regulate adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of 5′-inositol phosphatase SHIP2 during cell attachment and spreading on collagen I. *Journal of cell science*, *115*(19), 3807-3815.

Prestes, R. (2013). Collagen and its derivatives: Characteristics and applications in meat products.

Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., & Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects With the use of autologous bone marroW stromal cells. *NeW england journal of medicine*, *344*(5), 385-386.

Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., & Le Blanc, K. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, *76*(8), 1208-1213.

Ratner, B. D., & Bryant, S. J. (2004). Biomaterials: Where We have been and Where We are going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, *6*(1), 41-75.

Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S. Z., Rahim, A., Rizvi, S. A., & Rehman, I. U. (2018). FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy RevieWs*, *53*(9), 703-746.

Rieder, E., Kasimir, M.-T., Silberhumer, G., Seebacher, G., Wolner, E., Simon, P., & Weigel, G. (2004). Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization With human vascular cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *127*(2), 399-405.

Ringelhan, M., Pfister, D., O'Connor, T., Pikarsky, E., & HeikenWalder, M. (2018). The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nature immunology*, *19*(3), 222-232.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Rippon, H., & Bishop, A. (2004). Embryonic stem cells. *Cell proliferation*, *37*(1), 23-34.

Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, *481*(7381), 295-305.

Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M., & Barbarisi, A. (2004). From cell–ECM interactions to tissue engineering. *Journal of cellular physiology*, *199*(2), 174-180.

Rothrauff, B. B., Yang, G., & Tuan, R. S. (2017). Tissue-specific bioactivity of soluble tendon-derived and cartilage-derived extracellular matrices on adult mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, *8*(1), 133.

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., & Riminucci, M. (2007). Self-reneWing osteoprogenitors in bone marroW sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, *131*(2), 324-336.

Saied, I., & MsHAMsUDDIN, A. (1998). In HepG2 human liver cancer cell line. *Anticancer Res*, *18*, 4083-4090.

Schicht, G., Seidemann, L., Haensel, R., Seehofer, D., & Damm, G. (2022). Critical Investigation of the Usability of Hepatoma Cell Lines HepG2 and Huh7 as Models for the Metabolic Representation of Resectable Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, *14*(17), 4227. https://WWW.mdpi.com/2072-6694/14/17/4227

Schmidt, M., Dornelles, R., Mello, R., Kubota, E., Mazutti, M., Kempka, A., & Demiate, I. (2016). Collagen extraction process. *International food research journal*, *23*(3), 913.

Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). *Gelatine handbook: theory and industrial practice*. John Wiley & Sons.

SchWartz, M. A., & Baron, V. (1999). Interactions betWeen mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Current opinion in cell biology*, *11*(2), 197-202.

Senadheera, T. R., Dave, D., & Shahidi, F. (2020). Sea cucumber derived type I collagen: A comprehensive revieW. *Marine Drugs*, *18*(9), 471.

Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual revieW of biochemistry*, *78*(1), 929-958.

SoboleWski, K., MałkoWski, A., BańkoWski, E., & JaWorski, S. (2005). Wharton's jelly as a reservoir of peptide groWth factors. *Placenta*, *26*(10), 747-752.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Sorushanova, A., Skoufos, I., Tzora, A., Mullen, A. M., & Zeugolis, D. I. (2021). The influence of animal species, gender and tissue on the structural, biophysical, biochemical and biological properties of collagen sponges. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *32*(1), 12.

Stani, C., Vaccari, L., Mitri, E., & Birarda, G. (2020). FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: NeW insight into the amide III band. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *229*, 118006.

Sundin, M., Ringden, O., Sundberg, B., Nava, S., Götherström, C., & Le Blanc, K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *haematologica*, *92*(9), 1208-1215.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality WorldWide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(3), 209-249.

Taghizadeh, R., Cetrulo, K., & Cetrulo, C. (2011). Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta*, *32*, S311-S315.

Taipale, J., & Keski-Oja, J. (1997). GroWth factors in the extracellular matrix. *Faseb j*, *11*(1), 51-59. https://doi.org/10.1096/fasebj.11.1.9034166

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676.

Tornesello, M. L., Buonaguro, L., Tatangelo, F., Botti, G., Izzo, F., & Buonaguro, F. M. (2013). Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated With hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Genomics*, *102*(2), 74-83.

Tse, W., Pendleton, J., Beyer, W., Egalka, M., & Guinan, E. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marroW stromal cells: Implications in transplantation, Transplantation.

Tush, E., Eliseeva, T., Khaletskaya, O., Krasilnikova, S., Ovsyannikov, D. Y., Potemina, T., & Ignatov, S. (2019). Extracellular matrix markers and methods for their study. *Современные технологии в медицине*, *11*(2 (eng)), 133-147.

Vainio, S., & Müller, U. (1997). Inductive tissue interactions, cell signaling, and the control of kidney organogenesis. *Cell*, *90*(6), 975-978.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Viale-Bouroncle, S., Gosau, M., & Morsczeck, C. (2014). Collagen I induces the expression of alkaline phosphatase and osteopontin via independent activations of FAK and ERK signalling pathWays. *Archives of oral biology*, *59*(12), 1249-1255.

Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L., & Hu, Q. (2007). Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (Sebastes mentella). *Journal of Food Science*, *72*(8), E450-E455.

Wang, Z., Sun, F., Lu, Y., Zhang, B., Zhang, G., & Shi, H. (2021). Rapid preparation method for preparing tracheal decellularized scaffolds: vacuum assistance and optimization of DNase I. *ACS omega*, *6*(16), 10637-10644.

Watson, N., Divers, R., Kedar, R., Mehindru, A., Mehindru, A., Borlongan, M. C., & Borlongan, C. V. (2015). Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, *17*(1), 18-24.

Woodbury, D., SchWarz, E. J., Prockop, D. J., & Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marroW stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*, *61*(4), 364-370.

Xu, H., Xu, B., Yang, Q., Li, X., Ma, X., Xia, Q., Zhang, Y., Zhang, C., Wu, Y., & Zhang, Y. (2014). Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold. *PloS one*, *9*(1), e86723.

Yañez, R., Lamana, M. L., García-Castro, J., Colmenero, I., Ramírez, M., & Bueren, J. A. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem cells*, *24*(11), 2582-2591.

Yang, H., & Shu, Z. (2014). The extraction of collagen protein from pigskin. *J. Chem. Pharm. Res*, *6*(2), 683-687.

Yang, X., Li, X., Wu, Z., & Cao, L. (2023). Photocrosslinked methacrylated natural macromolecular hydrogels for tissue engineering: A revieW. *International Journal of Biological Macromolecules*, *246*, 125570.

Yılmaz, F., Erdoğan, B., Özdurmuş, E., Kılınçoğlu, U., & Kızılkaya, S. (2025). YEŞİL YÖNTEM İLE SENTEZLENEN METAL NANOPARTİKÜLLER İÇEREN POLİMER YÜZEY KAPLAMALARININ HAZIRLANMASI VE İNCELENMESİ. *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi*, *33*(1), 1618-1628.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Yuan, Z., Cao, F., Gao, C., Yang, Z., Guo, Q., & Wang, Y. (2022). Decellularized human umbilical cord Wharton jelly scaffold improves tendon regeneration in a rabbit rotator cuff tendon defect model. *The American journal of sports medicine*, *50*(2), 371-383.

Zhang, H., Marshall, K., Tang, H., HWang, D., Lee, M., & LieW, C. (2003). Profiling genes expressed in human fetal cartilage using 13,155 expressed sequence tags. *Osteoarthritis and Cartilage*, *11*(5), 309-319.

Zhang, L., Ma, D., Wang, F., & Zhang, Q. (2002). The modification of scaffold material in building artificial dermis. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, *30*(4), 319-332.

Zhang, X., Xu, S., Shen, L., & Li, G. (2020). Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. *Journal of Leather Science and Engineering*, *2*(1), 19.

Zheng, X., Liu, W., Xiang, J., Liu, P., Ke, M., Wang, B., Wu, R., & Lv, Y. (2017). Collagen I promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by regulating integrin β1/FAK signaling pathWay in nonalcoholic fatty liver. *Oncotarget*, *8*(56), 95586.

Zhijiang, C., & Guang, Y. (2011). Bacterial cellulose/collagen composite: Characterization and first evaluation of cytocompatibility. *Journal of Applied Polymer Science*, *120*(5), 2938-2944.

Zhou, Y., Zimber, M., Yuan, H., Naughton, G. K., Fernan, R., & Li, W.-J. (2016). Effects of human fibroblast-derived extracellular matrix on mesenchymal stem cells. *Stem Cell RevieWs and Reports*, *12*(5), 560-572.

Zipori, D. (2004). The nature of stem cells: state rather than entity. *Nature RevieWs Genetics*, *5*(11), 873-878.

Zuniga, K., Gadde, M., Scheftel, J., Senecal, K., Cressman, E., Van Dyke, M., & Rylander, M. N. (2021). Collagen/kerateine multi-protein hydrogels as a thermally stable extracellular matrix for 3D in vitro models. *International Journal of Hyperthermia*, *38*(1), 830-845.