NKMJ
Namık Kemal Tıp Dergisi
Namık Kemal Medical Journal

Review Article /Derleme Makales
Doi: https://doi.org/10.37696/nkmj.679069 e-ISSN: 2587-0262

ÜÇ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ SİSTEMLERİNE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

Current Approaches to Three-Dimensional Cell Culture System

Elif POLAT

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Tekirdağ, TÜRKİYE.

Bu çalışma " (Union of Thrace Universities 2nd International Health Sciences Congress (UTUC 2018/ Tekirdağ)" de panel konuşması olarak sunulmuştur.

Öz

İki boyutlu (2B) hücre kültürü, hücre temelli araştırmalar için değerli bir yöntemdir ancak in vivo yanıtlar hakkında öngörülemeyen, yanıltıcı veriler sağlayabilir. Son yirmi yılda, hücresel mikro çevrenin (örneğin hücre dışı matris ve interstisyel sıvı) önemine farkındalık artmıştır. Dolayısıyla, 3B hücre kültürü olarak adlandırılan bu yeni hücre kültürü paradigması hızla popülerlik kazanmaktadır. 2B kültürlerden 3B kültür tekniklerine geçiş ile birlikte fizyolojik olarak canlılardaki dokulara daha benzer olan modellerin ortaya çıkarılması sağlanmaktadır. 3B hücre kültürleri farklı amaçlar için faklı teknikler sunar ve gereksinime göre kullanıcıların en uygun modeli seçmeleri gerekir. 3B hücre kültürü sistemlerinin, kök hücre çalışmaları, ilaç keşifleri, kanser araştırmaları, gen ve protein ekspresyon çalışmalarının da içerisinde olduğu birçok karmaşık fizyolojik mekanizmanın aydınlatılmasında yaygınca kullanıldığı görülmektedir. Bu derlemenin amacı 2B kültürler ile 3B kültürleri karşılaştırarak mevcut 3B kültürlerin uygulama alanlarını tartışmaktır.

Anahtar Kelimeler: Üç boyutlu hücre kültürü, iki boyutlu hücre kültürü, sferoid, skafold, teknikler.

Abstract

Two-dimensional (2D) cell culture is a valuable method for cell-based research, However, it may provide unpredictable, misleading data on in vivo responses. Over the last two decades, awareness of the importance of the cellular microenvironment (e.g. extracellular matrix and interstitial fluid) has increased. This new cell culture paradigm, called as 3D cell culture, is rapidly gaining popularity. With the transition from 2D cultures to 3D culture techniques, it is provided the reveal of models that are more similar to living tissues physiologically. 3D cell cultures offer different techniques for different purposes, and users need to choose the most available model according to the requirement. 3D cell culture systems have been used to clarify the complex physiological mechanisms in the fields of stem cell studies, drug discoveries, cancer research, gene and protein expression studies. The aim of this review was to discuss the application areas of existing 3D cultures in comparison with 2D cultures and 3D cultures.

Keywords: Three-dimensional cell culture, two-dimentional cell culture, spheroid, scaffold, techniques.

ÜÇ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ SİSTEMLERİNE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

Hücre kültürleri bizlere sundukları avantajların çeşitliliği bakımından önemli bir çalışma alanıdır[1]. Hücre kültürleri farklı test koşulları altında belirli bir biyolojik mekanizmayı veya süreci araştırmak için laboratuvardaki hücrelerin büyümesini mümkün kılan modellerdir. Bu modellerin kalitesi ve gerçek dokudaki hücrelerin davranışlarını nasıl temsil ettikleri, üretilen verilerin değerinde ve nasıl kullanıldığı konusunda önemli bir rol oynar[2]. *İn vitro* hücre kültürleri, *in vivo* olarak hücre davranışının altında yatan mekanizmaların anlaşılması için sıklıkla kullanılır. Bu davranışlar, biyokimyasal ve biyomekanik mikro-ortamlardan etkilenen hücre farklılaşması, göç ve büyümeyi içerir[3]. Bu davranışların ardındaki mekanizmaların deşifre edilmesi, doku ve organların oluşumu ve işleviyle sonuçlanan *in vivo* işlemlerin anlaşılması açısından büyük önem arz eder[3].

Hücre kültürü çalışmaları, bilimsel araştırmalardan endüstriye kadar çeşitli alanlarda başvurulan uygulamalardır[4]. Hücre kültürü

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Elif POLAT
Adres: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Tekirdağ/TÜRKİYE
E-posta: epolat@nku.edu.tr

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 23.01.2020
Date Accepted / Kabul Tarihi: 24.03.2020

teknikleri ve günümüz hücre hatlarının sayısı ilk hücre hattı olan HeLa keşfedildiğinden beri uzun bir yol kat etmiştir. Hücre hatlarını tanımlamak ve karakterize etmek için DNA parmak izi / profil oluşturma ve sitogenetik analiz gibi çeşitli moleküler biyoloji araçlarının mevcut olmasıyla ilerlemeleri daha da artmaktadır. Hücre hatlarının sayısındaki artışla hücre kültürü tekniklerinde büyüme, görüntüleme, veri toplama ve analiz yöntemleri de beraberinde gelişmiştir. Düz, iki boyutlu (2B) hücre kültürü kullanımı yaygın olmasına rağmen, son araştırmalar üç boyutlu (3B) yapıları ve daha gerçekçi biyokimyasal ve biyomekanik mikroçevreleri kullanarak kültüre yönelmiştir[1,4].

Vücudumuzdaki hücreler, oldukça karmaşık, üç boyutlu bir mikro ortamdan gelen uyarıma yanıt olarak biyoaktivitelerini gerçekleştirir. Hücreler *In vivo* da mikroçevrenin etkisiyle bulundukları ortamda polarizasyona sahiptir. 3B yapı olan dokunun bütünlüğünün ve homeostasinin sağlanması, polarizasyonun gereken düzeyde olmasına bağlıdır. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri de dış uyaranlara karşı oluşturulan yanıtta önemli bir rol oynar[5].

Her geçen gün daha yaygın olarak kullanılan 3B hücre kültürleri *in vivo* sistemlere benzerliği sayesinde daha güvenilir bilimsel verilerin elde edilmesine olanak sunar. Bu derleme ile 3B hücre kültürleri tanımlanarak bunların 2B hücre kültürleri ile karşılaştırılması ayrıca kullanılan modeller ve bu modellerin uygulama alanlarının açıklanması ile bilimsel çalışmalara yön vermesi amaçlanmıştır.

2B Hücre Kültürleri

Geleneksel 2B hücre kültürü, hücrelere mekanik destek sağlamak için düz bir yüzeye, tipik olarak bir cam veya polistiren petri kabına yapışmaya dayanır[6]. 2B tabakalardaki hücre büyümesi, benzer miktarda besine ve besi yerinde bulunan büyüme faktörlerine erişim izni verir, bu da homojen büyüme ve çoğalma ile sonuçlanır[7]. 2B platformlardaki bu karakteristik özellik biyologlar ve klinik kullanıcılar için hem sade hem de verimli oluşuyla avantaj sağlar.

Yüzyılı aşkın süredir 2B tek tabakalı hücre kültürleri, biyofiziksel ve biyokimyasal ipuçlarından gelen uyarımlar hücresel tepkileri incelemek için *in vitro* modeller olarak kullanılmıştır. Bu yaklaşımlar yararlı kabul edilmiş ve hücre davranışı anlayışımızı önemli ölçüde geliştirmiştir[4]. Ancak hücrelerin kültüre edildikleri kapların *in vivo* mikroçevreyi yansıtmaması ve hücrelerin *in vivo* mikroçevrelerini oluşturma imkanı bulamaması nedeniyle 2B hücre kültürleri *in vivo* da gerçekleşen hücresel olayları gösteremez. Hücrelerde polarizasyon kaybına ek olarak ekstrasellüler matriks (Extra Cellular Matrix - ECM) moleküllerinin de sınırlı miktarlarda salgılandığı görülür. Bu da *in vivo* da sahip olunan yapısal özellikleri kaybetmelerine neden olur. Örneğin, kanser hücrelerinin bazı önemli özellikleri 2B kültürlerde uygun şekilde modellenemez[8]. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için, *in vivo* koşulları daha iyi taklit eden 3B hücre kültürü platformları ortaya çıkmıştır[4].

3B Hücre Kültürleri

3B hücre kültürü, hücre agregatlarının doku sferoidleri veya gömülü hücreler olarak canlı dokularında bulunan yapısal proteinlerin ve diğer biyolojik moleküllerin ECM'i taklit ettiği bir doku iskelesinde veya sıvı tabanlı yöntemlerde oluşmasını sağlayan model bir sistemdir. 3B modeller olarak kültüre edilen hücreler, *in vivo*'dakine benzer polarizasyon gösterdiklerinden morfolojileri de *in vivo*'ya yaklaşır[9]. Belirli bir düzeye kadar *in vivo* olayları taklit eder. Örneğin, hücre dışı bir matriks içine hücrelerin yerleştirilmesi ile apikal-bazal polarizasyon, lümen oluşumu, proliferasyon

değişimleri[10], RNA ve protein ekspresyonlarındaki[11] sayısız değişiklik gibi fizyolojik davranışlarla ilişkili durumlar daha kolay izlenebilir. Doku ve organların *in vivo* etkileşimlerini modellemeyi amaçlayan 3B hücre kültürü yaklaşımları, biyokimyasal ve biyomekanik sinyallerin incelenmesine de olanak sağlar[3]. Bu modellerin, *in vivo* uygulamalarda çalışma bulguları için daha gerçekçi sonuçlar ortaya çıkardığı kanıtlanmıştır. 2B hücre hatları homojen çalışma materyali sağlasa da, bunları 3B modeller olarak kültürlemek, doğal koşullara daha yakın olmasını sağlar. 3B kültür modellerinde iyi tasarlanmış bir mikro ortam; çoğalmayı, göçü, matriks üretimini ve kök hücre farklılaşmasını desteklemek için kullanılabilir[4]. Bugüne kadar, 3B kültür yaklaşımı 380'den fazla hücre hattını incelemek için kullanılmıştır. Ayrıca ilaç keşfi, sitotoksisite, genotoksisite, hücre büyümesi, gen ve protein ekspresyon çalışmaları 3B hücre kültürü sistemlerinin sıklıkla kullanıldığı önemli alanlardandır. Benzer şekilde, 3B sistemlerde ortak kültürler de, hücre etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasını sağlar[7].

2B ve 3B Hücre Kültürü Ortamlarının Karşılaştırılması

3B hücre kültürü modelleri, 2B düzlemsel hücre kültürleriyle karşılaştırıldığında hücre çoğalması, farklılaşma, apoptoz ve hücre hareketi gibi *in vivo* benzeri hücre gelişim davranışları üzerinde de farklı etkilere sahiptir[12].

Bazı araştırmacılar 2B ve 3B kültür yöntemlerinin hücrelerin proliferasyon, farklılaşma ve gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir[13-15]. Chitcholtan ve ark. tümör hücrelerinin bazı özelliklerinin 2B olarak uygun şekilde modellenemediğini göstermiştir[13]. Gözlenen tüm tümör hücrelerinde, 2B tek tabakalarda, 3B bazal membran (rBM) kültürlerinden daha yüksek proliferasyon oranları olduğu görülmüştür. Ancak 3B kültürler çoğalma oranlarında azalmaya gitse de hücre polarizasyonu ve farklılaşması için gerekli olan β4 ve β1 integrinlerinde artış olduğu gösterilmiştir. Mabry ve arkadaşları yaptıkları çalışmada fenotipik ekspresyonun, kullanılan kültür yöntemine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir[14]. Bu çalışmaya göre kalp kapaklarındaki primer hücre tipi olan valvüler interstisyel hücrelerin (VIC) mikroarray analizi, substrat sertliğinin hücre hatlarının gen ekspresyonunu etkileyebileceğini göstermiştir. Sert 2B doku kültürü kaplarında kültürlenen hücreler, hidrojeller gibi daha az sert malzemelerde yapılan 2B veya 3B kültürlerden daha fazla gen ekspresyonu değişikliği göstermişlerdir. VIC hücrelerinin kültürlendiği materyal modülü, hücre iskeleti, kasılma ve matriksin remodeling genlerinin ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca, Pineda ve arkadaşları bir tek tabakada yetişen hücrelerin, 3B kültürlerde yetişen hücrelerden daha yüksek seviyelerde hücre iskeleti elementleri ve hücre dışı matriks proteinleri eksprese ettiğini göstermiştir[15].

Son zamanlarda yapılan bir araştırma, yoğun sferoid oluşumunun, paklitaksel gibi kanser ilaçlarına maruz kaldığında bazı meme kanseri hücre hatlarında apoptozu baskılayabileceğini göstermiştir[16]. 2B kültürlerde, besinlere erişim, 3B kültürlerde olduğu gibi bir hücre gradyanından etkilenmez, çünkü nekrotik hücreler ortama yayılır ve sadece kültür yüzeyinde açığa çıkan canlı hücreleri bırakır[7]. Örneğin, toplanmış sferoidlerde, en yüksek proliferasyon seviyeleri yüzeydeyken, 3B hücre gövdelerinin merkezleri en çok sayıda sessiz ya da nekrotik hücrelere sahiptir[7]. Bu sessiz hücrelerin ilaç tedavisine hassasiyeti daha azdır, ancak yeni tümör büyümesi için kaynak sağlayabilirler[17].

Hücre göçü, potansiyel olarak bir 3B substrat içindeki daha karmaşık hücre etkileşimleri nedeniyle boyutlar arasında farklılıklar gösterir[18]. 3B'deki hücreler her tarafa yayılır ve sabitlenirler, bu da göç için engeller oluşturur ve daha sonra hücre hareketinde ve hücrelerin kullandığı mekanizmalarda değişikliklere neden olur[19]. Bu farklılıklar önemlidir, çünkü göç hücresel mekaniğin kilit bir özelliğidir ve kanserin metastazında ve diğer hastalık ve bozukluklarda kilit bir rol oynar. Örneğin, Hakkinen ve arkadaşları., fibroblastların, kollajen, fibrin ve hücre türevli matristeki karşılık gelen 2B kültürlerine kıyasla 3B kültürde en az 1.3 kat daha hızlı göç ettiğini, buna karşın bazal membran üzerinde tersinin doğru olduğunu göstermiştir[20]. Başka bir örnek ise, β1-integrin ve epidermal büyüme faktörü reseptörü sinyalleri arasındaki çift yönlü etkileşimler 3B kültürde tanımlanırken, 2B kültürde bulunmamıştır[21].

Hücrelerin mekanik tepkisini değerlendirmek 2B kültürlerde, 3B kültürlerdekinden çok daha kolaydır[22]. Örneğin, 2B kültürdeki hücreler, yüzey inhibisyonunun üstesinden gelmek için yeterli çekiş üreterek sadece düzlemsel bir yüzey boyunca hareket etmelidir. 3B kültür düzenlemelerindeki hücreler, sadece potansiyel yüzey teması nedeniyle inhibe olmakla kalmaz, aynı zamanda ECM'nin yanı sıra diğer hücrelerden daha fazla temas inhibisyonuna sahiptir[22]. ECM'ye uygulanan kuvvetlerin doğru ölçümlerinin alınması, kanser veya immün hücre göçü gibi fizyolojik süreçleri anlamak için gereklidir. Steinwechs ve arkadaşları ilk kez bir 3B kollajen fibril matriksi içine göç eden bir meme karsinomu hücresinden kaynaklanan kuvvetleri ölçmüştür[23]. Matriksin sertliği değişse bile benzer kuvvetlerin üretildiğini bulmuşlardır. 2B matrikslerin aksine, matriks sertliği arttıkça fiziksel kuvvetlerin de arttığı görülmüştür[24].

3B Hücre Kültürü Modelleri

3B hücre kültürlerinde tüm çalışmalar için kullanılabilecek, gereksinimleri karşılayan tek bir teknoloji yoktur ve kullanıcıların hücre tabanlı araştırmalar için en uygun modeli seçmeleri gerekmektedir[2]. Bu nedenle 3B hücre kültürü için geliştirilmiş çeşitli platformlar bulunmaktadır[25].

Sferoidler; esas olarak hücrelerin kendi hücre dışı matriks bileşenlerini oluşturduğu, çok hücreli agregatlardan oluşur[26]. Bu yapılar 3B iskele materyalleri üzerinde büyütülür veya jeller içine gömülürler. Agregatlar; mammosfer, mikrokütle, sferoidler ve mikrofabrike dokular gibi birçok farklı şekilde isimlendirilebilir[27]. Sferoid terimi, herhangi bir kültür substratına (örneğin polistiren) yapışmayan toplanmış hücreleri belirtir[28]. Bu tür yapılar çeşitli yollarla ve alternatif malzemeler kullanılarak üretilebilir. Bu yöntemlerde hem uygulanabilir hem de ekonomik olan asma damla yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde hücreler, bir petri kabının kapağı üzerinde asılı bırakılmış damla şeklinde kültüre edilir[29]. Asılı damlalarda, hücreler, ortam damlacıklarının tepesinde 3B sferoidler oluştururlar. Ayrıca besiyeri değişimine de imkan veren bir yöntemdir. Bu yaklaşımın birçok uygulaması vardır[30]. Başka bir teknik, askıya alınmış hücrelerin yapışkan olmayan bir alt tabaka üzerinde kültürlendiği statik sıvı kaplama tekniğidir (liquid overlay technique-LOT). Bu teknik hücrelerin bir yüzeye yapışmak yerine kümelenmeleriyle oluşur [31]. Sferoidler ayrıca santrifüjleme ile de oluşturulabilir[32]. Mikrowell dizileri tekniğinde orijinal yöntem, yapışmaz 96 kuyucuklu kültür kaplarında yuvarlak dipli topakların oluşturulmasına dayanır. Mikrowell dizileri adı verilen yeni platformlar, mikrometre ölçeğinde çok sayıda kuyucuğa sahiptir[33]. Mikroakışkan kanallar, hücresel agregat oluşumunu teşvik etmek için kullanılan bir diğer tekniktir. Bu yöntem, sürekli

kontrol edilen agregatların üretimi için imkanlar oluşturur[34]. Bu yöntemin uygulanabilirliği teknolojik bir kapasiteye ihtiyaç duymaktadır.

3B katı iskeleler hücrelerin katı bir iskele içine ekilmeleri sırasında hücreleri desteklemek için 3 boyutlu bir alan sağlar ve bunların doğal 3B doku benzeri yapılar oluşturmasına izin verir. Skafold (katı iskele) ya da matriksler bir dizi doğal ve sentetik malzemeden üretilebilir. Doğal biyomateryaller genellikle kollajen, fibrin ve hyaluronik asit gibi hücre dışı matriksin (ECM) çeşitli bileşenlerine dayanır, ancak doğal olarak diğerlerini (ipek, jelatin, kitosan, ve aljinat dahil olmak üzere türetilmiş materyaller) de içerebilir. Bu malzemeler biyolojik olarak uyumludur ve hücre yapışma bölgeleri içerir[35]. Biyolojik olarak parçalanabildikleri için doku mühendisliği uygulamaları da avantajlıdırlar[36]. Sentetik materyallerden imal edilen iskeleler, hücre farklılaşmasını ve hücre yapışmasını etkilediği belirlenen belirli bir kimyasal bileşim ve ayarlanabilir mekanik özellikler gibi avantajlara sahiptir. Sentetik polimerler (plastikler, kauçuklar, fiberler vb.) kullanılarak üretilir. Sentetik bir iskele tekrarlanabilirliği sağlar. Sentetik ürünler gözeneklilik, liflilik, geçirgenlik ve mekanik stabilite ile doğal ekstraselüler matriksi taklit eder[37]. Belirli bir matriks veya skafold tipinin, kültürlenmiş hücrelerde belirli bir morfolojik ve fizyolojik davranışı ortaya çıkarması için en uygun olanını seçebilmek gereklidir. Şu anda hem organik hem de inorganik yapıda 100'den fazla tipte matriks ve iskeleler kullanılmaktadır. Bu matrikslerin ve iskelelerin seçimi, hücre tipine ve çalışmanın niteliğine dayanmaktadır.

Hidrojeller, 3B hücre kültürü için popüler bir seçenektir, yüksek su içeriğine sahip agaroz, fibrin, kollajen veya hiyaluronik asit gibi çapraz bağlı doğal bir baz malzemenin gevşek bir iskele sisteminde hücrelerin kapsüllenmesini içerir[38]. Farklı tipte biyopolimerlerden yapılan hidrojeller, hücre kapsülleme kolaylığı nedeniyle iskeleler olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hidrojeller ayrıca dokuya benzer su içeriği ve kolayca ayarlanabilen biyokimyasal ve mekanik özellikler sağlar[39]. Bu hidrojeller, matriks üretimini ve diğer hücre biyoaktivitelerini kolaylaştırmak için yavaş yavaş çözünen ve iç alan üreten bileşenlere sahiptir. Agaroz hidrojelleri, çeşitli hücre tiplerinde 3B agregatlar elde etmek için basit materyallerin bir örneğidir. Ancak her hücre tipi, agaroz hidrojellerinin bileşimi, konsantrasyonu ve hacmi ile tanımlanan belirgin farklı optimal koşullar gerektirir. Aynı zamanda, farklı hücre tipleri agaroz hidrojelleri kullanılarak kültürlendiklerinde farklı davranırlar, böylece basit ama kullanışlı modeller oldukları kanıtlanır[38].

Sıvı tabanlı yöntemler ise birçok farklı tekniğin kullanıldığı bir sistemdir. Bu sistemler mikroakışkanlar, mikro-taşıyıcı sistemler, mikro-akışkan çipler ve yanı sıra kullanılan platformlardan oluşur[40] (cam/silikon bazlı, polimer bazlı ve kağıt bazlı platformlar). Mikroakışkan teknikler, 3 boyutlu kültür modellerinin fizyolojik uygunluğunu arttırabilmek için oluşturulan bu sistem mikrometre boyutundaki kanallardaki akışkanlar üzerinde uzamsal kontrole izin verir. Mikro ve nano ölçekli üretimin ilerlemesi, mikroakışkanların ön planda olduğu hücre çalışmaları için çeşitli cihazların geliştirilmesine yol açmıştır[4]. Mikroakışkan cihazlar; kanserlerin tespiti, embriyonik gelişim mekanizmalarının anlaşılması ayrıca gelişmekte olan ülkelerde bir teşhis aracı olarak ve daha birçok uygulama için kullanılmıştır[41]. Bu tekniklerle ilgili en fazla çalışmanın kanser alanında olduğu görülür[30]. **İn vitro** modellerdeki kanser**,** fenotipik tarama modellerine olan talep tarafından

yönlendirilmektedir. Bu durum, tedavinin keşfedilmesine ve seçilmesine, daha fazla sistemik yaklaşımlara ve aynı zamanda kişiselleştirilmiş ilaç olarak adlandırılan tedavileri bireysel hastanın özelliklerine göre ayarlamada kolaylık sağlar. Çalışmaların yaklaşık yarısını, görülme sıklığına bağlı olarak meme ve akciğer kanseri modelleri oluşturur[30].

Biyoreaktörler ise mikro doku veya organların yapımında hücre davranışlarını anlamak ve klinik uygulama veya laboratuvar araştırmalarında daha fazla hücre üretmek için kullanılır[4,42]. Biyoreaktörlerin hücre büyüklüğündeki kanallarla kullanılmasıyla, sıvı taşınımının hücresel ölçekteki etkileri araştırılır.

3B biyobaskı tekniği (3D bioprinting); genel olarak, malzemelerin basıldığı, katılaştırıldığı ve birbirine bağlandığı hesaplama kontrolü altında özelleştirilmiş 3B yapıların inşası olarak adlandırılan, son zamanlarda geliştirilen bir teknolojidir[43]. Hücrelerden ve biyomateryallerden oluşan biyolojik yapıların, birkaç milimetreden santimetreye kadar değişen küçük bir boyutta basıldığı 3B doku baskısıdır. Bu teknik, biyouyumlu malzemeler, hücreler ve destekleyici bileşenlerin sentetik malzeme yerine, çeşitli 3B formatlarını oluşturmak için kullanılır. Bu nedenle, hücre fonksiyonu ve yaşayabilirliliği basılı yapılar içinde sürdürülebilir[44]. Çeşitli 3B bioprinting platformları zaten vasküler benzeri tüpler, böbrek, kıkırdak, suni deri ve doku yapıları da dahil olmak üzere çok çeşitli kök hücreler üretebilir[45]. 3B bioprinting tekniği, canlı hücreler içeren geometrik yapılar üretme kabiliyetinin yanı sıra, hassas tekrarlanabilirlik ile yüksek verim uygulamalarını da kolaylaştırmıştır[46].

3B Hücre Kültürü Sistemlerinin Uygulama Alanları

3B hücre kültürü sistemlerinin, kök hücre çalışmalarında, ilaç keşifleri ve farmakolojik uygulamalarda, kanser araştırmalarında, gen ve protein ekspresyon çalışmalarında ve karmaşık hücresel fizyolojik mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için bu alanlarda uygulamaları görülmektedir.

3B kanser hücre modelleri, hücre proliferasyonu, gen / protein ekspresyonu ve ilaç duyarlılığını tek katmanlı olarak kültürlenen *in vivo* kanser hücrelerine kıyasla daha fazla açıklamaktadır[47]. Bu nedenle, daha kapsamlı veriler elde etmek için, çeşitli çalışmalar 3B hücre kültür sistemlerini bir kanser modeli olarak kullanmıştır.

Sferoidler, sınırlı miktarda oksijen ve besin maddesi taşıması nedeniyle merkezde sferoid ve yüzeyde ise hareketli çoğalan hücrelerin heterojen popülasyonunu içerdiğinden, kanser araştırmacıları için özellikle ilgi çekicidir. Büyük sferoidler merkezde nekrotik hücreler içerebilir ve *in vivo* olarak bazı tümör tiplerinin yapısını daha fazla yansıtabilir[7].

Kanser hücrelerinin yayılma şekli olan metastatik kaskad, vasküler sistem ile yakından bağlantılıdır. Yeni geliştirilen mikroakışkan 3B kanser modellerinin birçoğu vasküler bir bileşen içerir Bu modeller anjiyogenez ve göç gibi süreçleri içerir. Metastatik kaskad içerisindeki birçok kısım, perfüze olabilen endotelyal damarların kanser hücreleri ile birlikte kültürlenmesiyle incelenebilir. Mikroakışkan 3B hücre kültürü kullanılarak, anjiyogenez, göç, intravazasyon ve ekstravazasyon gibi etkiler incelenmiştir[48]. Tümör göçünde önemli bir faktör interstisyel akımdır[49]. Munson ve arkadaşları, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin ve glioma hücrelerinin göç davranışını incelemek için bir mikroakışkan 3B geçiş-akış odası kullanmıştır[50]. Birçok yayın, anjiyojenezi incelemek için perfüze edilebilir damarsal modeller ile birlikte gradyan anjiyojenik faktörlerin oluşumundan bahseder[48].

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, polilaktik asit gözenekli iskelelerde 3B glioblastoma multiform (GBM) hücrelerinin genomu, 2B hücre kültürü koşullarında GBM hücrelerinin genomu ile karşılaştırılmıştır. 14-d 3B GBM hücrelerinin 2B hücre kültürü koşullarına kıyasla farklı gen ekspresyon profillerine sahip olduğu görülmüştür[51].

Antikanser ilaçların keşfi, genellikle belirli bir klinik durum için uygun tedavi edici ürünleri elde edebilmek için gerçekleştirilir[52]. 3B kanser modelleri bugüne kadar tümör biyolojisinin açıklamasında tanınmıştır, çünkü geleneksel 2B hücre modelleri cevaplanmamış soruları çözmek için yetersizdir. Antikanser patolojisi, invaziv kolonizasyon ve antikanser ilaç direncinin, tekrarlayan ve hızlı evrimi gibi bazı konular 3B hücre sistemleri tarafından ortaya konmuştur[53]. İmamura ve arkadaşları, 2B ve 3B hücreler arasındaki antikanser ilaç duyarlılığını karşılaştırarak ve 3B kanser küreciklerinin, 2B kültürlenmiş hücrelerinkinden daha fazla paklitaksel ve doksorubisine karşı direnç gösterdiğini bulmuşlardır[54].

3B kültürlerden önce ilaç keşif çalışmaları yaygın olarak hayvan modelleri ile gerçekleştirilirken ilaç bileşenlerindeki artış ve bu çalışmaların uzun sürelere yayılması, hayvan kullanımını pahalı ve etik olmayan bir durum haline getirmiştir[55]. İlaç endüstrisi için hala en büyük zorluk, organ toksisitesini tanımlamak için ilgili *in vitro* sistemlerin bulunmamasıdır[56]. Ancak 3B kültürler, hücre tabanlı ilaç taramasını büyük ölçüde iyileştirerek daha kısa sürelerde toksik ve etkisiz maddeleri tanımlama potansiyeline sahiptir. 3B yaklaşım, ilaç genotoksisitesi, sitotoksisite ve kanser karşıtı ilaç / ajan keşfi için daha basit ama etkili bir araç durumundadır.

Kök hücreler, özellikle pluripotent kök hücreler (PSC'ler), insan vücudunda herhangi bir hücre tipinde saf popülasyonların üretilmesi için önemli bir potansiyeldir. Dokuya özgü progenitörlerin veya terminal olarak farklılaşmış hücrelerin saf popülasyonları, özellikle ilaç keşfi, hücre terapisi ve doku rejenerasyonu olmak üzere sağlık hizmeti yeniliklerine entegre edilebilir. Kök hücre çalışmalarında, organizmalarda hücresel sinyalin gelişimini ve düzenlenmesini tekrarlayan 3B hücre sistemleri kullanılarak büyük ilerlemeler kaydedilmiştir[57]. Çalışmalara bakıldığında, indüklenmiş insan pluripotent kök hücrelerinin (iPSC) fonksiyonel hepatositlere farklılaşmasını teşvik edebilen 3B bir hidrojel sunulmuştur. İnsan iPSC'lerinin hepatik farklılaşması için 3B koşullar, karaciğer belirteçlerinin ekspresyonunu, hepatosit olgunlaşmasını ve metabolik seviyeleri indüklediği görülmüştür. İnsan iPSC'lerinden hepatosit benzeri hücrelerin türetilmesi, yapay bir insan karaciğeri, toksisite taraması ve hepatosit nakli için bir temel sağlamıştır[58]. 3B sistemlerin, insan osteoblast farklılaşmasının osteositlere dönüşüm mekanizmalarını anlamada ve kemik metastazı ve doku mühendisliği uygulamalarında osteositlerin rolünün anlaşılmasında yararlı olduğu göstermiştir. Kollajen tip I ekspresyonu kullanılarak mezenkimal sıçan kök hücrelerinde etkili osteogenez mümkün olmuştur[59]. Başka bir çalışmada, mezenkimal stromal hücrelerin 3 boyutlu modeller olarak hiyalüronik asit (HA) hidrojelleri kullanılarak kondrositlere farklılaşması incelenmiştir. Hücre reseptörlerinin HA ile daha iyi etkileşime girebildiği ve hücre farklılaşmasını etkileyebileceği bulunmuştur. Biyolojik olarak fonksiyonel mikroçevre, hücresel etkileşimler ve mekanik özellik gibi çeşitli faktörler kondrogenezi arttırmıştır[60].

Hücre fizyolojisi uygulamalarında, 3B hücre kültürleri, çoğalma, yapışma, canlılık, morfoloji, mikroçevre ve ilaçlara yanıt gibi çeşitli hücre işlevlerinin daha iyi anlaşılmasında kullanılmaktadır.

SONUÇ

3B hücre kültürü modellerinin, gelişmiş hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri, ve ayrıca *in vivo* benzeri hücresel yapıları nedeniyle 2B tek tabakalı kültür yöntemlerine kıyasla birçok avantajının olduğu açıkça görülmektedir. 3B hücre kültürleri ile *in vitro* çalışmalar birçok yönden hayvan modellerine daha yakındır ve 2B kültürler ile mümkün olmayan karmaşık etkileşimleri incelemek için biyolojik olarak üstün yapılar sunarlar. Günümüzde çoğunlukla 2B çalışmalar tercih edilmektedir, ancak bazı *in vivo* koşulların davranışlarını anlamak için 3B kültür tekniklerinin kullanılması büyük önem arz etmektedir. 3B hücre sistemlerinin gelecekte, klinik öncesi sonuçları doğrulayarak laboratuvar hayvanı kullanımını azaltması beklenmektedir.

Kaynaklar

1. Ravi M, Paramesh V, Kaviya S, Anuradha E, Solomon FP. 3D cell culture systems: advantages and applications. Journal of cellular physiology. 2015;230(1):16-26.
2. Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. Journal of anatomy. 2015;227(6):746-756.
3. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. Trends in cell biology. 2011;21(12):745-754.
4. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. Physiology. 2017;32(4):266-277.
5. Burdick JA, Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. Tissue Engineering Part A. 2008;15(2):205-219.
6. Freshney R. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique: Wiley-Liss; 2005.
7. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. Assay and drug development technologies. 2014;12(4):207-218.
8. Choi SW, Yeh YC, Zhang Y, Sung HW, Xia Y. Uniform beads with controllable pore sizes for biomedical applications. Small. 2010;6(14):1492-1498.
9. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Lomas C, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. BMC biology. 2012;10(1):29.
10. Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell C, Briand P, Damsky C, et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. The Journal of cell biology. 1997;137(1):231-245.
11. Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. The FASEB Journal. 1993;7(9):737-743.
12. Bonnier F, Keating M, Wrobel TP, Majzner K, Baranska M, Garcia-Munoz A, et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. Toxicology in vitro. 2015;29(1):124-131.
13. Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. Experimental cell research. 2013;319(1):75-87.
14. Mabry KM, Payne SZ, Anseth KS. Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype. Biomaterials. 2016;74:31-41.
15. Pineda ET, Nerem RM, Ahsan T. Differentiation patterns of embryonic stem cells in two-versus three-dimensional culture. Cells Tissues Organs. 2013;197(5):399-410.
16. Ji C, Khademhosseini A, Dehghani F. Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. Biomaterials. 2011;32(36):9719-9729.
17. Kimlin LC, Casagrande G, Virador VM. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. Molecular carcinogenesis. 2013;52(3):167-182.
18. Bott K, Upton Z, Schrobback K, Ehrbar M, Hubbell JA, Lutolf MP, et al. The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels. Biomaterials. 2010;31(32):8454-8464.
19. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. Trends in cell biology. 2003;13(5):264-269.
20. Hakkinen KM, Harunaga JS, Doyle AD, Yamada KM. Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. Tissue Engineering Part A. 2010;17(5-6):713-724.
21. Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell CA, Dedhar S, Briand P, et al. Reciprocal interactions between β1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998;95(25):14821-14826.
22. Koch TM, Münster S, Bonakdar N, Butler JP, Fabry B. 3D traction forces in cancer cell invasion. PloS one. 2012;7(3):e33476.
23. Steinwachs J, Metzner C, Skodzek K, Lang N, Thievessen I, Mark C, et al. Three-dimensional force microscopy of cells in biopolymer networks. Nature methods. 2016;13(2):171.
24. Wang K, Cai L-H, Lan B, Fredberg JJ. Hidden in the mist no more: physical force in cell biology. Nature methods. 2016;13(2):124.
25. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. Nature. 2004;428(6982):487-492.
26. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology. 2008;3(9-10):1172-1184.
27. Rivron NC, Raiss CC, Liu J, Nandakumar A, Sticht C, Gretz N, et al. Sonic Hedgehog-activated engineered blood vessels enhance bone tissue formation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(12):4413-4418.
28. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. Trends in biotechnology. 2013;31(2):108-115.
29. Harrison RG, Greenman M, Mall FP, Jackson C. Observations of the living developing nerve fiber. The Anatomical Record. 1907;1(5):116-128.
30. van Duinen V, Trietsch SJ, Joore J, Vulto P, Hankemeier T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. Current opinion in biotechnology. 2015;35:118-126.
31. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. Cancer research. 1977;37(10):3639-3643.
32. Handschel JG, Depprich RA, Kübler NR, Wiesmann H-P, Ommerborn M, Meyer U. Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. Head & face medicine. 2007;3(1):4.

33. Napolitano AP, Chai P, Dean DM, Morgan JR. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. Tissue engineering. 2007;13(8):2087-2094.
34. Torisawa Y-s, Chueh B-h, Huh D, Ramamurthy P, Roth TM, Barald KF, et al. Efficient formation of uniform-sized embryoid bodies using a compartmentalized microchannel device. Lab on a Chip. 2007;7(6):770-776.
35. Moroni L, De Wijn J, Van Blitterswijk C. Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2008;19(5):543-572.
36. Gu BK, Choi DJ, Park SJ, Kim Y-J, Kim C-H. 3D bioprinting technologies for tissue engineering applications. Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine: Springer; 2018:15-28.
37. Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. World Journal of Stem Cells. 2019;11(12):1065.
38. Chung BG, Lee K-H, Khademhosseini A, Lee S-H. Microfluidic fabrication of microengineered hydrogels and their application in tissue engineering. Lab on a Chip. 2012;12(1):45-59.
39. Ruedinger F, Lavrentieva A, Blume C, Pepelanova I, Scheper T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. Applied microbiology and biotechnology. 2015;99(2):623-636.
40. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. Nature. 2006;442(7101):368.
41. Gogoi P, Sepehri S, Zhou Y, Gorin MA, Paolillo C, Capoluongo E, et al. Development of an automated and sensitive microfluidic device for capturing and characterizing circulating tumor cells (CTCs) from clinical blood samples. PloS one. 2016;11(1):e0147400.
42. Yeatts AB, Choquette DT, Fisher JP. Bioreactors to influence stem cell fate: augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2013;1830(2):2470-2480.
43. Andersen T, Auk-Emblem P, Dornish M. 3D cell culture in alginate hydrogels. Microarrays. 2015;4(2):133-161.
44. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. Nature biotechnology. 2014;32(8):773.
45. Tasoglu S, Demirci U. Bioprinting for stem cell research. Trends in biotechnology. 2013;31(1):10-19.
46. Knowlton S, Onal S, Yu CH, Zhao JJ, Tasoglu S. Bioprinting for cancer research. Trends in biotechnology. 2015;33(9):504-513.
47. Gurski LA, Petrelli NJ, Jia X, Farach-Carson MC. 3D matrices for anti-cancer drug testing and development. Oncology Issues. 2010;25(1):20-25.
48. Zheng Y, Chen J, Craven M, Choi NW, Totorica S, Diaz-Santana A, et al. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. Proceedings of the national academy of sciences. 2012;109(24):9342-9347.
49. Swartz MA, Lund AW. Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. Nature Reviews Cancer. 2012;12(3):210-219.
50. Munson JM, Bellamkonda RV, Swartz MA. Interstitial flow in a 3D microenvironment increases glioma invasion by a CXCR4-dependent mechanism. Cancer research. 2013;73(5):1536-1546.
51. Ma L, Zhang B, Zhou C, Li Y, Li B, Yu M, et al. The comparison genomics analysis with glioblastoma multiforme (GBM) cells under 3D and 2D cell culture conditions. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2018;172:665-673.
52. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. British journal of pharmacology. 2011;162(6):1239-1249.
53. Tanner K, Gottesman MM. Beyond 3D culture models of cancer. Science translational medicine. 2015;7(283):283ps289-283ps289.
54. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, et al. Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. Oncology reports. 2015;33(4):1837-1843.
55. Pampaloni F, Stelzer EH, Masotti A. Three-dimensional tissue models for drug discovery and toxicology. Recent patents on biotechnology. 2009;3(2):103-117.
56. Lin Z, Will Y. Evaluation of drugs with specific organ toxicities in organ-specific cell lines. Toxicological Sciences. 2011;126(1):114-127.
57. Koehler KR, Mikosz AM, Molosh AI, Patel D, Hashino E. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. Nature. 2013;500(7461):217.
58. Luo Y, Lou C, Zhang S, Zhu Z, Xing Q, Wang P, et al. Three-dimensional hydrogel culture conditions promote the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocytes. Cytotherapy. 2018;20(1):95-107.
59. Farrell E, Byrne E, Fischer J, O'brien F, O'connell B, Prendergast P, et al. A comparison of the osteogenic potential of adult rat mesenchymal stem cells cultured in 2-D and on 3-D collagen glycosaminoglycan scaffolds. Technology and Health Care. 2007;15(1):19-31.
60. Erickson IE, Huang AH, Chung C, Li RT, Burdick JA, Mauck RL. Differential maturation and structure–function relationships in mesenchymal stem cell-and chondrocyte-seeded hydrogels. Tissue Engineering Part A. 2008;15(5):1041-1052.