TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜÇ BOYUTLU BİYOBASKI TEKNOLOJİSİNİN YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ OKSİDATİF STRESE ETKİSİ

Damla ALKAYA

DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA

ANKARA

2021

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜÇ BOYUTLU BİYOBASKI TEKNOLOJİSİNİN YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ OKSİDATİF STRESE ETKİSİ

Damla ALKAYA

DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Üç Boyutlu Biyobaskı Teknolojisinin Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki Oksidatif Strese Etkisi" başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Damla ALKAYA

Tarih: 6/08/2021

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalında
Damla ALKAYA tarafından hazırlanan
"Üç Boyutlu Biyobaskı Teknolojisinin Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki Oksidatif Strese Etkisi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 6/08/2021

Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Doku Mühendisliği ve Yenileyici Tıp	3
1.2. Doku Mühendisliğinin Temel İlkeleri	5
1.2.1. Hücreler	6
1.2.2. İskeleler	6
1.2.3. Büyüme Faktörleri	7
1.3. Üç Boyutlu Biyobaskı	7
1.3.1. Üç Boyutlu Biyobaskı Stratejileri	9
1.4. Biyoyazıcılar	10
1.4.1. Mürekkep Püskürtmeli Biyoyazıcılar	11
1.4.2. Mikroekstrüzyon Temelli Biyoyazıcılar	12
1.4.3. Lazer Destekli Biyoyazıcılar	12
1.4.4. Stereolitografi Biyoyazıcıları	12
1.5. Biyobaskı Süreci	13
1.5.1. Görüntüleme ve Tasarım	13
1.5.2. Üç Boyutlu Biyobaskıda İskele Geometrisi	14
1.5.3. Malzeme ve Hücre Seçimi	15
1.6. Hidrojeller	20
1.6.1. Sodyum Aljinat (SA)	21
1.7. Çapraz Bağlama	22
1.8. Üç Boyutlu Biyobaskıda Hücre Seçimi ve Kök Hücreler	23
1.8.1. Mezenkimal Kök Hücreler	24
1.8.2. Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler	25
1.9. Üç Boyutlu Biyobaskının Sınırlılıkları	26
1.10. Oksidatif Stres	27
1.11. Tezin Amacı	32
2. GEREÇ VE YÖNTEM	34
2.1. Gereç	34
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Hücre Kültürü	36
2.2.2. Hücre Çözdürme ve Kültürün Hazırlanması	36
2.2.3. Hücre Kültürünün Pasajlanması	37
2.2.4. Hücre Sayımı ve Canlılığı	38
2.2.5. Üç Boyutlu Biyobaskı	39
2.2.6. Biyomürekkebin Hazırlanması	40
2.2.7. Üç Boyutlu Biyobaskı ve Çapraz Bağlama	42
2.2.8. Üç Boyutlu İskelelerin Mezenkimal Besiyeri Değişimi	44

2.2.9. Üç Boyutlu İskelelerde Floresan Boyama 45
2.2.10. Üç Boyutlu İskelelerde Oksidatif Stres Boyama 45
2.2.11. Üç Boyutlu İskeleden Hücre İzolasyonu 46
2.2.12. Ribonükleik Asit (RNA) İzolasyonu 47
2.2.13. Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit (cDNA) Sentezi 49
2.2.14. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 49
3. BULGULAR 51
3.1. Üç Boyutlu Biyoyazıcı ile Baskı Sırasında İskele Katmanlarından Desen Basımının Görüntülenmesi 51
3.2. İki Boyutlu Kültürdeki ve Üç Boyutlu Biyobaskı Sonrası İskelelerdeki İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Canlılığının Floresan Boyama Tekniği ile Belirlenmesi 53
3.3. Üç Boyutlu Biyobaskı Sonrası İskele Üzerindeki İnsan Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerindeki Oksidatif Stres ve Antioksidan Genlerindeki İfadesinin Analizi 57
3.4. Üç Boyutlu Biyobaskı Sonrası İskelelerdeki İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerdeki Stresin Oksidatif Stres Boyama Tekniği İle Belirlenmesi 68
4. TARTIŞMA 72
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 83
ÖZET 88
SUMMARY 89
KAYNAKLAR 90
EKLER 102
ÖZGEÇMİŞ **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

ÖNSÖZ

Doku mühendisliği ve yenileyici tıp, hasarlı veya yaralı dokuların iyileştirilebilmesi için umut vadetmektedir. Üç boyutlu biyobaskı, biyouyumlu malzemeler, hücreler ve destekleyici bileşenlerin uygulanmasına izin vererek doğal organları ve dokuları taklit etmek için karmaşık doku yapıları geliştirmek için kullanılan en yeni teknolojilerden biridir. Bununla birlikte, 3B biyobaskıda DM yapılmış iskeleleri hazırlamak için kullanılan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki oksidatif strese etkileri bilinmemektedir. Yapılan tez çalışmasında, 3B biyobaskı ile aljinat biyomürekkep konsantrasyon farkı ve biyobaskı desen farkının yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde oksidatif strese etkisi araştırılmıştır.

Kariyerimin önemli basamaklarından biri olan yüksek lisans eğitimimi Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü'nde yapmış olmaktan büyük bir mutluluk ve gurur duymaktayım.

Tez çalışmam boyunca Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'nun 315S102 numaralı Flag-Era projesi ile gerekli maddi desteği sağlamış olmasından dolayı ve laboratuvar ortamında sunduğu imkanlar için Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği'ne ve Kök Hücre Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

COVID-19 pandemisinin başlamış olduğu zorlu bir dönemde tez çalışmamı devam ettirebilmek için birlikte bu süreci en verimli şekilde bitirmemi sağlayan, akademik bilgisinin yanı sıra manevi desteğini bir an bile esirgemeyen, daima moral ve motivasyonumu destekleyen saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA hocama çok teşekkür ederim. Bilim yolunda bana bu fırsatı sunarak, değerli ekibinde çalışma fırsatı vermiş olmasından dolayı onur duymaktayım.

Çalışmalarım boyunca benden desteğini eksik etmeyen başta değerli ekip arkadaşlarım Cansu GÜRCAN ve ÖMÜR BEŞPINAR olmak üzere tüm ekip arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi AHMET CEYLAN hocama tecrübelerini benimle paylaştığı, vakit ayırdığı ve göstermiş olduğu sabır için çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca tüm ideallerimin peşinden koşmam için benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, sevgileri ile daima yanımda olan, emeklerini asla ödeyemeceğim annem Satı ALKAYA ve babam Ali ALKAYA'ya, biricik kardeşim Çağatay ALKAYA ve yol arkadaşım Uğur SEZGİN'e yanımda oldukları ve tez çalışmalarım boyunca göstermiş oldukları destek ve anlayış için çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

$\bullet O_2$	Süperoksit Anyon Molekülü
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
α	Alfa
β	Beta
2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
BMP	Kemik Morfogenetik Proteini
$C_6H_5Na_3O_7 \bullet 5,5H_2O$	Sodyum Sitrat
Ca	Kalsiyum
$CACl_2$	Kalsiyum Klorür
CAD-CAM	Bilgisayar Destekli Tasarım ve Bilgisayar Destekli Üretim
CAT	Katalaz
CD	Cluster of Differentiation Markers
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
cm^2	Santimetrekare
CO_2	Karbondioksit
CT	Bilgisayarlı Tomografi
Cu	Bakır
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, DNA'daki adenin-timinden zengin bölgelere güçlü bir şekilde bağlanan bir floresan boya
dH_2O	Distile Su
dk	Dakika
DM	Doku Mühendisliği
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit

DPBS	Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline
ECM	Hücre Dışı (Ekstraselüler) Matris
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EKH	Embriyonik Kök Hücre
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
FBS	Fetal Sığır Serumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGF	Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
GAPDH	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz, referans gen
GelMA	Jelatin-Metakriloil
GMP	İyi İmalat Uygulamaları
GPX	Glutatyon Peroksidaz
GVHD	Graft Versus Host Hastalığı
H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HA	Hiyaluronik Asit
HAMA	Hiyaluronik Asit-Metakrilat
HIF-1α	Hipoksi İndüklenebilir Faktörü-1α
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
IF	İmmünofloresan
iAKH	İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
iPKH	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KH	Kök Hücre
mg	Miligram
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Mn	Manganez
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
ng	Nanogram
nm	Nanometre

NO	Nitrik Oksit
O_2	Oksijen
O_2^-	Süperoksit
OH^-	Hidroksil
OS	Oksidatif Stres
PCL	Polikaprolakton
PE	Polietilen
PEG	Polietilen Glikol
PEG-DA	Poli (Etilen Glikol) Akrilat
Pen-Strep	Penisilin/Streptomisin
PGA	Poliglikolik Asit
PHB	Poli (3-Hidroksibütirik Asit)
PLA	Poli (L-Laktik Asit)
PLGA	Poli (Laktik-Coglikolik Asit)
PMMA	Polimetil Metakrilat
PTFE	Politetrafloroetilen
PU	Poliüretan
PVA	Poli (Vinil Alkol)
qRT-PCR	Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCF / g	Göreceli Santrifüj Kuvveti "Relative Centrifugal Force/Field"/Gravite
rDNase	Rekombinant Deoksiribonükleaz
RGD	Hücre Bağlanmasına Aracılık Eden Hücre Dışı Matris Proteini
RNA	Ribonükleik Asit
RNase	Ribonükleaz
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
s	Saniye
SA	Sodyum Aljinat
SLS	Seçici Lazer Sinterleme
SOD	Süperoksit Dismutaz
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü

UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Zn	Çinko

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Yenileyici tıp 4

Şekil 1.2. Doku mühendisliği 5

Şekil 1.3. Biyolojik baskının temel taşları olarak kabul edilen olayların zaman çizelgesi 8

Şekil 1.4. Biyoyazıcı çeşitleri 11

Şekil 1.5. Biyoyapay doku ve organ 3B biyobaskısı için seçilecek polimerlerin temel gereksinimleri 16

Şekil 1.6. Biyobaskı uygulamalarında kullanılan polimerler 19

Şekil 1.7. Multipotent mezenkimal stromal hücreleri tanımlamak için minimum kriterler 25

Şekil 1.8. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik: Oksidatif stres 28

Şekil 1.9. Tez çalışma planı 33

Şekil 2.1. İki boyutlu kültürde iAKH'nin görünümü 37

Şekil 2.2. Üç boyutlu biyobaskı için kullanılan EnvisionTec 3D Bioplotter Manufacturer biyoyazıcısı 40

Şekil 2.3. Biyomürekkep (SA+iAKH) doldurulmuş 3B biyoyazıcı kartuşu ve 0,20 mm baskı iğne adaptör (Needle) 42

Şekil 2.4. Üç boyutlu biyoyazıcıdan iskele basımı 43

Şekil 2.5. Üç boyutlu biyobaskı sonrası 3B iskele desenleri 44

Şekil 2.6. Üç boyutlu biyobaskı sonrası Sodyum Sitrat (155mM) ile muamele edilmiş iskelenin 50 dk boyunca çözünme aşamaları 47

Şekil 3.1. Üç boyutlu biyobaskıda katman katman ızgara (A) ve dalgalı (B) desen basımının biyoyazıcı kamerasından çekilmiş görüntüsü 52

Şekil 3.2. Üç boyutlu ızgara ve dalgalı desenli iskelelerin ters ışık (inverted) mikroskop görüntüsü 52

Şekil 3.3. İki boyutlu kültürdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki canlı/ölü boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü 54

Şekil 3.4. %8 SA biyomürekkepli kartuş ile ızgara ve dalgalı desenlerde 3B biyobasılmış 5 katmanlı iskelelerdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki canlı/ölü boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü 55

Şekil 3.5. %10 SA biyomürekkepli kartuş ile ızgara ve dalgalı desenlerde 3B biyobasılmış 5 katmanlı iskelelerdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki canlı/ölü boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü 56

Şekil 3.6. %8 SA konsantrasyonlu biyomürekkep ile 3B basılmış iskelelerin 1. günde ızgara ve dalgalı desen farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi 58

Şekil 3.7. %8 SA konsantrasyonlu biyomürekkep ile 3B basılmış iskelelerin 7. günde ızgara ve dalgalı desen farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi 59

Şekil 3.8. %10 SA konsantrasyonlu biyomürekkep ile 3B basılmış iskelelerin 1. günde ızgara ve dalgalı desen farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi 59

Şekil 3.9. %10 SA konsantrasyonlu biyomürekkep ile 3B basılmış iskelelerin 7. günde ızgara ve dalgalı desen farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi 60

Şekil 3.10. Üç boyutlu biyoyazıcıda basılmış ızgara desenli iskelelerin 1. gün %8 ve %10 SA konsantrasyon farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi 61

Şekil 3.11. Üç boyutlu biyoyazıcıda basılmış dalgalı desenli iskelelerin 1. gün %8 ve %10 SA konsantrasyon farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi 61

Şekil 3.12. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin SOD1 gen ifadesinin analizi 62

Şekil 3.13. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin SOD2 gen ifadesinin analizi 63

Şekil 3.14. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin CAT1 gen ifadesinin analizi 64

Şekil 3.15. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin GPX1 gen ifadesinin analizi 65

Şekil 3.16. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin HIF-1α gen ifadesinin analizi 66

Şekil 3.17. Üç boyutlu biyoyazıcıda %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desenlerde basılmış iskelelerden 1. günde izole edilen iAKH'lerin HIF-1α gen ifadesinin analizi 67

Şekil 3.18. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. günde izole edilen iAKH'lerin HIF-1α gen ifadesinin analizi 67

Şekil 3.19. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin HIF-1α gen ifadesinin analizi 68

Şekil 3.20. %8 SA biyomürekkepli kartuş ile ızgara ve dalgalı desenlerde 3B biyobasılmış 5 katmanlı iskelelerdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki oksidatif stres boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü 70

Şekil 3.21. %10 SA biyomürekkepli kartuş ile ızgara ve dalgalı desenlerde 3B biyobasılmış 5 katmanlı iskelelerdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki oksidatif stres boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü 71

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Enzim yapıda olan birinci savunma antioksidanları 29

Çizelge 2.1. Tez çalışması için kullanılan gereçler 34

Çizelge 2.2. Hemositometre metodu ile hücre sayımı hesaplama 38

1. GİRİŞ

İnsan vücudundaki hasarlı doku ve organların yenilenmesi sınırlı olmakla birlikte mevcut tedavi seçenekleri kişinin kendisinden doku elde etme veya nakil yoluyla gerçekleşmektedir. Bu tedavi seçenekleri ise donör azlığı ve donör morbiditesi gibi sınırlamalar içermektedir. Bununla birlikte doku mühendisliği ve yenileyici tıp stratejileri hasarlı veya yaralı dokuların iyileştirilebilmesi için umut vadetmektedir (Matai ve ark., 2020).

Doku mühendisliği (DM), hasarlı doku ve organların yenilenmesi, onarılması veya değiştirilmesi için umut verici bir stratejidir. DM stratejileri temel olarak hücreleri, biyomateryalleri ve sinyalleri (büyüme faktörleri vs.) içermektedir. Bu da implante edildiğinde doku yenilenmesini teşvik edecek bir yapı gelişimine olanak sağlamaktadır (Freeman ve Kelly, 2017). Üç boyutlu (3B) biyobaskı teknolojisi, biyomateryaller, hücreler, proteinler ve/veya genlerin kullanımıyla doğal dokuların kompozisyon ve organizasyon yönlerini taklit ederek, karmaşık anatomik yapıları doğru iskele geometrilerinin geliştirilmesine izin verir (Calvert, 2007; Mironov ve ark., 2003). Hücre bazlı terapiler, doğal formlarında veya belirli bir amaç için modifiye edilmiş/tasarlanmış ve bu konuda fazlaca umut vadetmektedir. Kök hücreler (KH), kendini yenileyebilen ve özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen ana hücrelerdir. Farklılaşma kapasitelerine göre, totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücreler olarak sınıflandırılabilirler (Dergisi ve Ate, 2016). Bir çok hücre kaynağı bulunmasının yanı sıra terapötik çok yönlülüğünden dolayı bu uygulamalar için en uygun hücre kaynağı olarak mezenkimal kök hücreler (MKH) önerilmiştir (Cossu ve ark., 2017; Fitzsimmons ve ark., 2018). Mezenkimal kök hücreler, kemik iliğinden türemiş olan ve ilgili uyaranlarla osteojenik, kondrojenik ve adipojenik olmak üzere üç temel hücre serisine farklılaşabilme kabiliyetine sahip CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49e (α5-integrin) gibi belirteçleri ifade eden, morfolojileri fibroblastlara benzeri olan multipotent kök hücrelerdir (Chen ve ark., 2007; Pansky ve ark., 2007; Pittenger ve ark., 1999). Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleriyle birlikte immünodüzenleyici olmaları ve doku hasarlarında mikro

çevrelerini yapılandırabilen biyoaktif makromoleküller salgılamaları gibi özelliklere sahip olmaları onları doku mühendisliği ve yenileyici tıp için kullanılmalarına olanak sağlamıştır (Caplan, 2007).

Üç boyutlu biyobaskı, DM ve yenileyici tıpta doğal doku ve organları taklit etmek ve karmaşık doku yapıları geliştirmek için oldukça kullanılan en yeni teknolojilerden biridir. Biyobaskı, fonksiyonel doku veya organları üretmek için önceden belirlenmiş bir yapısal mimaride hücre yüklü biyomalzemelerin katman katman biriktirilmesini içerir. Bu teknik, biyomateryalleri, canlı hücreleri ve kontrollü sistemleri karmaşık yapılar oluşturmak için kullanmakla birlikte daha gelişmiş yapılar üzerinde mevcut diğer yöntemlerden daha kesin bir kontrole sahip olduğunu göstermiştir. Böylece, kontrollü gözenekliliğe, geçirgenliğe ve mekanik özelliklere sahip doku mühendisliği yapı iskeleleri, biyomedikal cihazlar ve doku modelleri gibi çok karmaşık yapıların imalatı mümkün olmaktadır (Gopinathan ve Noh, 2018).

Üç boyutlu biyobaskı, gelişimsel biyoloji, kök hücre bilimi, kimya, bilgisayar bilimi ve malzeme biliminden bilgi gerektiren disiplinlerarası bir alandır (Lee ve Cho, 2016). Dolayısıyla, 3B biyobaskı, tüm üretim süreçlerinde çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır. Örneğin, hücre kapsüllenmiş materyaller, baskıdan önce depolama sırasında uzun süreler boyunca sıklıkla hücrelere zarar verebilecek kimyasal çapraz bağlayıcılara maruz kalır. Biriktirme sırasında, baskının kendisinin neden olduğu mekanik stres, ciddi hücre hasarına ve hücre fonksiyonunun kaybına neden olabilir (Miller, 2014). Yeni doku basıldıktan sonra, 3B yapıdan dolayı özellikle basılı materyallerin küçük vaskülaritesi nedeniyle hücrelere besin ve oksijen tedariği sınırlı olabilmektedir (Muraoka ve ark., 2013). Üç boyutlu biyobaskılı bir doku üretmek için, hücrelerin hassasiyeti ve korunmasının önemli olmakla birlikte baskı işleminde hücrelerin hayatta kalması gerekmektedir. Biyobaskıdan sonra da hücre canlılığı, kullanılan biyomürekkebin ve baskı işleminin türüne bağlı olarak değişebilmektedir (Fedorovich ve ark., 2008). Diğer bir göz önünde bulundrulması gereken nokta da biyobaskılanan hücrelerin maruz kaldığı oksidatf strestir. Oksidatif stres (OS), reaktif oksijen ve azot türlerinin (ROS ve RNS, sırasıyla) düzensiz üretimi ve/veya atılması ile karakterize edilir. Reaktif oksijen türleri, öncelikle mitokondri olmak üzere hücre

organellerinde gerçekleşen metabolik olaylar sonucu veya iskemi-reperfüzyon, inflamasyon, yaşlanma, radyasyona maruziyet, yüksek basınç ve çeşitli kimyasallara maruz kalma gibi çeşitli nedenlere üretilirler. Bununla birlikte oldukça yüksek reaktiviteye sahiplerdir (Ugurel ve ark., 2017; L. J. Yan, 2014; L. J. Yan ve Sohal, 1998). Bununla birlikte serbest radikallerin birikmesi DNA, protein ve lipitler dahil olmak üzere tüm biyomoleküllere zarar verebilir (Denu ve Hematti, 2016).

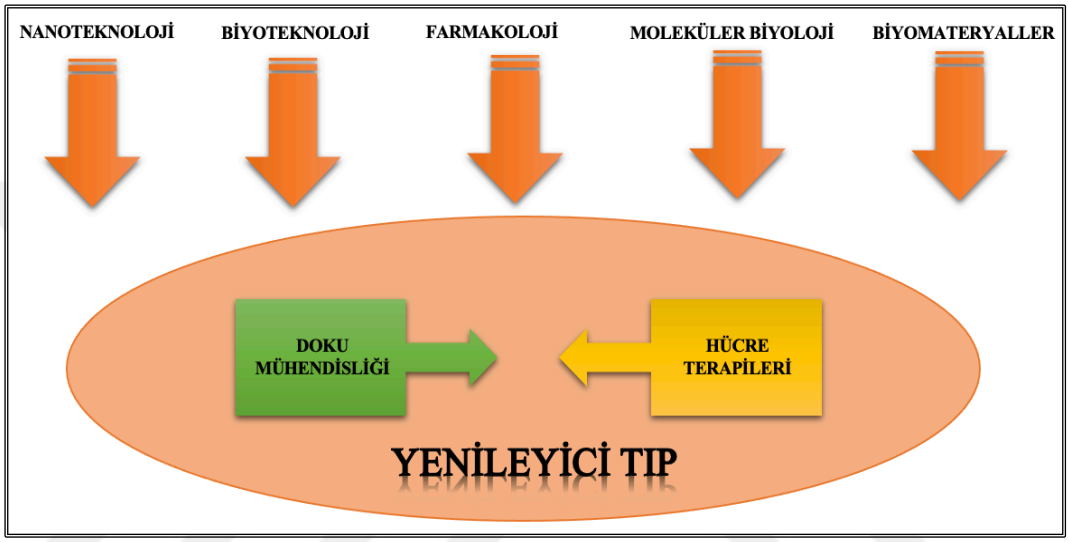
1.1. Doku Mühendisliği ve Yenileyici Tıp

Dokular veya organlar kanser, çeşitli anomali durumları veya travmalar nedeniyle ciddi bir hasar aldığında veya kaybedildiğinde, geleneksel farmasötik tedaviler artık uygulanamaz hale geldiğinde, yapay organlar (dokular dahil) veya organ nakli, harap olmuş doku veya organları yeniden yapılandırmak için ilk seçenektir (Ikada, 2006). Fakat organ nakilleri donör azlığı ve donör morbiditesi gibi sınırlamalar içermektedir (Matai ve ark., 2020).

Doku mühendisliği (DM), doku ve organ rekonstrüksiyonuna alternatif bir yaklaşım olarak yaklaşık otuz yıl önce yeni bir paradigma olarak ortaya çıkmıştır. Doku mühendisliğinin hastanın kendi doku ve organlarını tamamen zayıf biyouyumluluktan, düşük biyoişlevsellikten ve ayrıca şiddetli bağışıklık reddinden tamamen arındırmak gibi avantajları bulunmaktadır. Bu olağanüstü avantajları nedeniyle, doku mühendisliği genellikle ideal bir tıbbi tedavi olarak kabul edilmektedir (Ikada, 2006). Doku mühendisliği, hasarlı doku ve organların yenilenmesi, onarılması ya da değiştirilmesini amaçlayan nispeten yeni bir alandır. Doku mühendisliği stratejileri, doku benzeri yapılar oluşturmak için uygun biyokimyasal (örneğin, büyüme faktörleri) ve fiziksel (örneğin, döngüsel mekanik yükleme) faktörleri ve bunların kombinasyonlarını, canlı hücreleri ve biyouyumlu malzemeleri içermektedir.

Yenileyici tıp terimi genellikle doku mühendisliği ile eşanlamlı olarak kullanılmasına karşın, doku mühendisliğindeki gibi iskele kullanılmadan hücrelerle ve

genelliklede kök hücrelerin bir hücre kaynağı olarak kullanılmasını içermektedir (Şekil 1.1) (Berthiaume ve ark., 2011). Yeni bir dönem olarak Yenileyici Tıp' iki ABD araştırma grubunun insan embriyonik kök hücre (iEKH) ve embriyonik germ hücre hatları türettiklerini açıklamalarıyla başlamıştır (Shamblott ve ark., 1998; Thomson, 1998). Çığır açan bu başarılardan sonra, araştırma odağı doku mühendisliği ve kök hücreler üzerine yoğunlaşmıştır (Ikada, 2006).

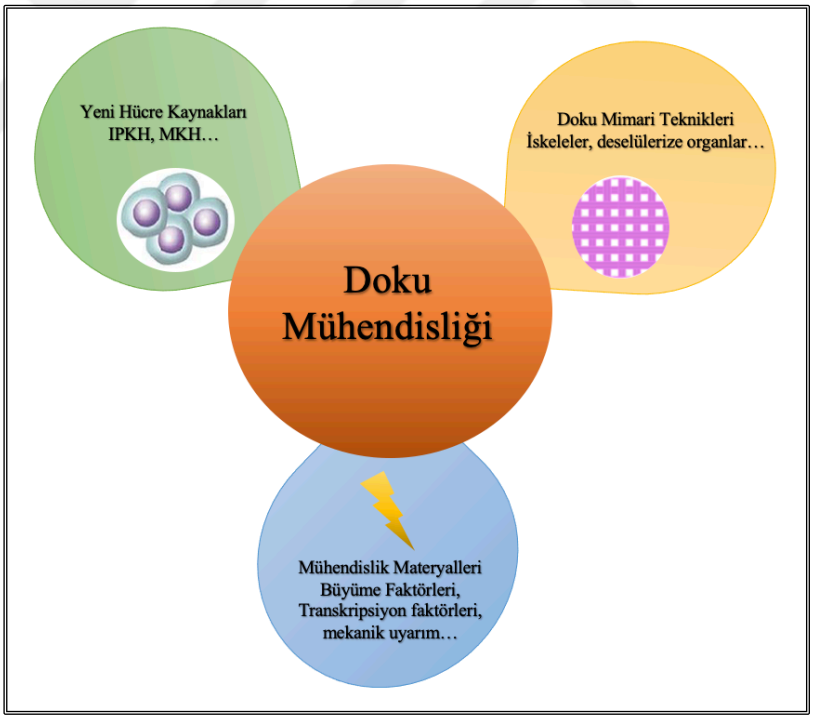


Şekil 1.1. Yenileyici tıp.

Geliştirilen ilk doku temelli tedaviler deri aşılama teknikleriydi. Daha sonra, allogreft cilt bankasını mümkün kılan hücreleri ve dokuları koruma teknikleri geldi ve bu deri greftlerini kullanıma hazır bir ürün haline getirdi. Birden fazla araştırmacı tarafından kullanıldığı bildirilen ilk sentetik deri ikamesi 1962'de geliştirildi. Ancak ilk başarılı doku mühendisliği ürünü cilt ürünleri 1970'lerin sonlarında ve 1980'lerin başında üretildi. Çoğu kişi bunun modern doku mühendisliğinin gerçekten başladığı zaman olduğu konusunda hemfikirdir ancak "doku mühendisliği" terimi daha sonra 1987 civarında ortaya çıkmıştır (Berthiaume ve ark., 2011).

1.2. Doku Mühendisliğinin Temel İlkeleri

Hücre, iskele ve büyüme faktörleri doku mühendisliği için üç temel malzemedir (Şekil 1.2). Hücre, yeni doku için matris sentezlerken, iskele, hücrelerin görevlerini etkili bir şekilde yerine getirebilmeleri için uygun ortamı sağlar. Büyüme faktörleri ise, hücrelerin yeni doku üretimini teşvik eder. Çeşitli doku türlerini yenilemek için çok sayıda araştırma yapılmış olsa da, hücre kaynağı, iskele yapımı, hücre tohumlaması, kültür ortamı, matris üretim analizi, hücre-iskele yapısının mekanik özellikleri ve bu yenileyici programda yer alan birçok kritik faktör bulunmaktadır (Ikada, 2006). Etkili bir doku mühendisliği için temel ihtiyaç, hücrelerin doğal dokuda olduğu gibi işlev görmesine izin veren hücresel ortamı taklit etmektir. DM, çoğu zaman hücre, çevre, malzemelerin ve mekanik ortamın yanı sıra kimyasal ortamın da uygun şekilde kontrol edilmesi yoluyla *in vivo* ortamın bazı kritik yönlerini taklit eder.



Şekil 1.2. Doku mühendisliği.

1.2.1. Hücreler

Doku mühendisliğine uygulanabilir hücreler, otolog (hastanın kendi), allojenik (hasta dışında insan) ve ksenojenik (hayvan kökenli) olarak sınıflandırılabilir. Otolog hücreler, aktiviteleri yüksek kaldığı sürece doku mühendisliği için en uygun hücrelerdir. Allojenik ve ksenojenik hücreler immünojenik oldukları için bu heterojen hücrelerden yeni bir doku tasarlandığı zaman immünosupresif bir tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır (Ikada, 2006). Çoğu doku mühendisliği, canlı hücreleri kullanır ve yeterli hücre sağlamak kritik öneme sahip bir konudur. Hücreler tipik olarak genellikle çok sınırlı miktarda tedarik edilen donör dokudan veya kök veya progenitör hücrelerden türetilmektedir (Berthiaume ve ark., 2011).

1.2.2. İskeleler

Farklı üç boyutlu biçime sahip doku ve organların çoğu, hücrelerden oluşmaları için desteğe ihtiyaç duymaktadır. Bu destek, iskele, şablon veya yapay hücre dışı matris (ECM) olarak adlandırılmaktadır. İskelenin temel işlevi, hücrelerin çoğalmasına, farklılaşmasına ve biyosentezine yardımcı olan doğal ECM'yi taklit etmektir (Ikada, 2006).

Hücre iskeleleri genellikle aşağıdaki amaçlardan en az birine hizmet etmeyi amaçlar:

1. Hücre tutunması ve hücre göçü,
2. Biyokimyasal faktörlerin salınımı,
3. Besinlerin, ifade edilmiş ürünlerin ve atıkların difüzyonu için gerekli gözenekli ortam ve
4. Mekanik sertlik (Berthiaume ve ark., 2011).

1.2.3. Büyüme Faktörleri

Hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında rol oynayan bir dizi protein vardır. Bu proteinler, vücutta hücrelerin kendileri tarafından (otokrin) veya çevreleyen komşu hücrelerle (parakrin) iletişimin bir sonucu olarak endojen olarak salgılanmaktadır. Bu proteinlere hücre büyüme faktörü denir (Ikada, 2006). Sıklıkla uygulanan büyüme faktörleri arasında kemik morfogenetik proteinleri (BMP), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF veya FGF-2), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü-(TGF-β) bulunmaktadır. Bunlar çözünür faktörler olmasına rağmen, iskele üretimi sırasında ECM'ye dahil edilebilirler. Doğal ECM' in *in vivo* temel yapısal olmayan işlevlerinden biri, büyüme faktörlerini ECM'ye bağlı hücrelere bağlamak, tutmak ve sunmaktır (Berthiaume ve ark., 2011).

1.3. Üç Boyutlu Biyobaskı

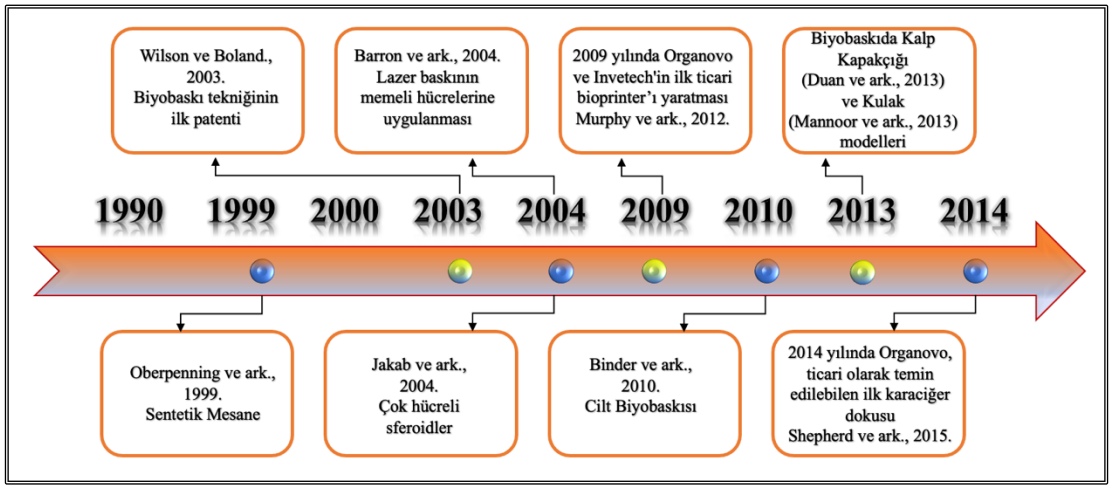
Hızla artan organ nakli talebine karşın organ kıtlığı ve organ vericisi bulmak konusunda yaşanan zorluklar küresel bir krizdir (Abouna, 2008; Zhang ve ark., 2019).

Üç boyutlu (3B) baskı ilk olarak 1986'da Charles W. Hull tarafından 'Stereolitografi' adını verdiği yöntem ile tanımlanmıştır. Ultraviyole ışıkla sertleştirilebilen bir malzemenin ince katmanlarını, katı bir 3B yapı oluşturmak için sırayla katmanlar halinde basmış ve sıvı fotopolimer tabanlı bu teknolojinin patentini almıştır (Hull, 1984). Aynı yıl, Austin Texas Üniversitesi'nden bir yüksek lisans öğrencisi olan Carl Deckard, seçici lazer sinterleme (SLS) baskı sürecini geliştirdi (Deckard ve ark., 1992). Bu iki teknik birlikte, doku mühendisliği ve yenileyici tıpta yaygın olarak kullanılan bir biyoteknoloji tekniği olarak benimsenen 3B baskının doğuşu olarak kabul edilmektedir (Hull, 1984).

Geçtiğimiz yıllarda, hayvan modelleri ve iki boyutlu (2B) hücre kültürü doğrulama yöntemleri, hastalık çalışmalarında ve ilaç keşiflerinde yaygın olarak kullanılmıştır. Fakat hayvan modelleri insan mekanizmalarını zayıf bir şekilde taklit

ettiği ve etik sorunlar gibi zorluklar bulundurması sebebiyle 2B kültür yöntemleri mikro ortamı yeniden üretmekte ve organ düzeyinde fizyolojiyi düzgün bir şekilde özetlemekte başarısız olmuştur (Jang ve ark., 2016). Bu nedenle, üç boyutlu (3B) *in vitro* modellere olan talep ortaya çıktı ve insan doku ve organ mekanizmalarını taklit etme imkânı sunarak bu zorlukların üstesinden gelmeyi amaçlamıştır. Bu teknoloji, belirli geometrilere ve heterojeniteye sahip 3B doku yapılarını tasarlama ve *in vivo* benzerlerinin hem yapılarını hem de işlevlerini taklit etme imkanı sunmuştur (Zhang ve ark., 2017).

İlk olarak Langer ve Vacanti (Langer ve Vacanti, 1993) tarafından sunulan doku mühendisliği yaklaşımları, 1999 yılında hastadan alınan hücrelerle kaplanan sentetik mesane iskelesi üretmek için kullanılmıştır (Şekil 1.3) (Oberpenning ve ark., 1999). İskele üretimi için ‘’laboratuvarda üretilen organ’’ olarak, biyobaskı teknikleriyle gelecekteki mühendislik organları için zemin hazırlamıştır. Bu ilerlemeye rağmen, fonksiyonel yapay doku ve organların üretimi, daha karmaşık, hücreler arası daha iyi etkileşim ve geleneksel doku mühendisliği yöntemleriyle elde edilemeyen vaskülarizasyon gerektirmektedir.



Şekil 1.3. Biyolojik baskının temel taşları olarak kabul edilen olayların zaman çizelgesi (Barron ve ark., 2004; Binder ve ark., 2010; Duan ve ark., 2013; Jakab ve ark., 2004; Mannoor ve ark., 2013; Murphy ve ark., 2012; Oberpenning ve ark., 1999; Shepherd ve ark., 2015; Wilson ve Boland, 2003).

Üç boyutlu biyobaskı, canlı hücreleri yazdırarak üç boyutlu bir biyomateryalin iskelesini oluşturmayı amaçlamaktadır. Bu yenilikçi teknoloji, polimerler ve canlı

hücreler eşzamanlı olarak önceden tasarlanmış katman katman doğru bir şekilde istifleyerek konumlandırılmasıyla biriktirerek üç boyutlu yararlı canlı dokuların tekrarlanabilir ve otomatik olarak üretilmesini sağlar. İki boyutlu hücre kültürleri (Devillard ve ark., 2014) gibi herhangi bir yaklaşım tarafından yapılamayan 3B bir nesnenin, doğru ve ölçeklenebilir geometrilerde yapılmasına izin verir. Şu anda, bu teknoloji büyük ilgi görmekte ve yenileyici ilaçlar, doku mühendisliği ve transplantasyonu, ilaç taranmaları ve kanser araştırmaları gibi geniş spektrumlu uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücrelerin hassas ve kontrollü biriktirilmesi ile hormonlar, ilaçlar ve büyüme faktörlerinin kullanımına da izin vererek böylece gelişmiş doku yenilenmesine de olanak sağlamaktadır. Ayrıca, doğal olanları taklit ederek doku yapılarının, organların ve organoidlerin ve çip üzerindeki organların gelişimi için bir temel teşkil etmektedir (Knowlton ve ark., 2016; Peng ve ark., 2017). Bugüne kadar, kemik, kıkırdak, kalp dokuları ve kalp kapakçığı, nöral, akciğer, karaciğer, pankreas, deri, retina, vasküler ve kompozit dokular dahil olmak üzere birçok biyomateryal bu teknoloji aracılığıyla üretilmiştir (Ozbolat ve Yu, 2013). Doku ve organ nakli sırasında çeşitli faydalar sunmakla birlikte tedavi süresini de kısaltmaktadır (Vijayavenkataraman ve ark., 2016).

1.3.1. Üç Boyutlu Biyobaskı Stratejileri

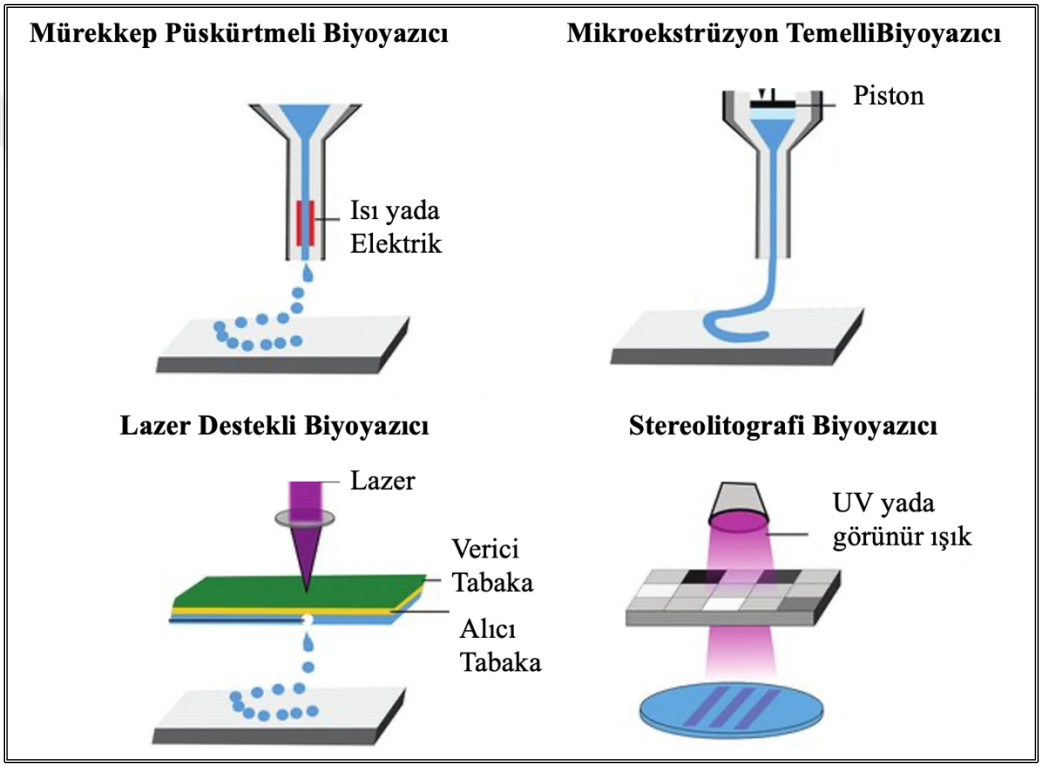
Üç boyutlu biyobaskı, üç temel yaklaşıma dayanmaktadır: Biyomimikri, kendi kendine (otonom) montaj ve mini dokular (Murphy ve Atala, 2014). Biyomimikri (yeni malzemeler geliştirmek için doğadan ilham alma), bir doku veya organın hücresel ve hücre dışı bileşenlerinin özdeş taklitlerinin üretimini içerir (Ingber ve ark., 2006). Bu, dokuların spesifik hücresel bileşenlerin yeniden üretilmesiyle elde edilebilir. Bu yaklaşımın başarılı olabilmesi için biyolojik dokuların mikro ölçekte taklit edilmesi gerekir. Bu nedenle, hücre tiplerinin spesifik düzenlenmesi, çözünür veya çözünmez faktörlerin oranları, ECM'nin bileşimi ve mikro ortamdaki biyolojik kuvvetlerin doğası dahil olmak üzere mikro ortamın anlaşılması gerekmektedir. Otonom kendi kendine montaj (biyobaskılı dokuların gelişimini yönlendirmek için hücresel organizasyonu kullanma), bir rehber olarak embriyonik organ gelişimini

kullanmaktır. Gelişmekte olan bir dokunun erken hücresel bileşenlerini, istenilen biyolojik mikro mimariyi ve kendi ECM bileşenlerini, uygun hücre sinyalizasyonunu ve otonom organizasyon ve modellemeyi üretir (Marga ve ark., 2007; Steer ve Nigam, 2004). Otonom kendi kendine montaj, doku oluşumunu, lokalizasyonunu, fonksiyonel ve yapısal özelliklerini yöneten, histogenezin birincil itici gücünü oluşturarak hücreye dayanmaktadır (Derby, 2012; Kasza ve ark., 2007). Mini dokular (karmaşık sistemler üretmek için dokuların yapı taşlarını tanımlama ve yeniden oluşturma), daha küçük organlar ve dokular, fonksiyonel yapı blokları (Kelm ve ark., 2010; Mironov ve ark., 2009) veya mini dokuları içerir. Bunlar, bir böbreğin nefronu gibi bir dokunun en küçük yapısal ve işlevsel bileşeni olarak tanımlanabilirler. Mini dokular, tasarım, kendi kendine montaj veya her ikisinin bir kombinasyonu ile üretilebilir ve daha büyük yapılar şeklinde monte edilebilirler. Mini dokularla ilgili olarak iki ana strateji vardır. Bunlardan birincisi, kendi kendine birleşen hücre küreleri (mini dokulara benzer) biyolojik olarak ilham alan tasarım ve organizasyon kullanılarak bir makro dokuya birleştirilir (Kelm ve ark., 2010; Mironov ve ark., 2009). İkinci ise, bir doku ünitesinin doğru, yüksek çözünürlüklü taklitleri tasarlanır ve daha sonra işlevsel bir makro dokuya kendi kendine bir araya gelmesine izin verilir. Tüm bu stratejilerin kombinasyonları, çok sayıda işlevsel, yapısal ve mekanik bileşen ve özellik içeren karmaşık bir 3B biyolojik yapıyı basmak için gereklidir.

1.4. Biyoyazıcılar

Biyobaskı stratejilerinden herhangi birinin üretimi için biyolojik yazıcılar kullanılmaktadır. Biyoyazıcı, farklı biyolojik uygulamalar için çeşitli biyomürekkepler kullanılarak doku ve organlar gibi 3B yapıların yazdırılması için kullanılan bir cihazdır. Tipik bir biyoyazıcı, yüksek çözünürlük ve doğrulukla yapıları imal etmek, serbest hareket sağlamak ve yeterli hareket hızı sağlamak için çeşitli biyomateryalleri aynı anda dağıtma yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda kullanıcı dostu, tam otomatik, kolay sterilize edilebilen, nispeten uygun fiyatlı, dayanıklı, çok yönlü ve kompakt cihazlardır (Dababneh ve Ozbolat, 2014).

Biyolojik baskı teknolojisi hızla ilerlerken mürekkep püskürtmeli veya damlacık, mikroekstrüzyon temelli, lazer destekli ve stereolitografik biyoyazıcılar olmak üzere temelde dört biyoyazıcı tekniği bulunmaktadır (Şekil 1.4) (Dababneh ve Ozbolat, 2014; Ozbolat ve Hospodiuk, 2016). Üç boyutlu biyoyazıcılarda doku ve organ üretimi ile hayvan modelleri kullanmadan, ilaçların organ ve dokulara etkisi araştırılabilecektir. Böylece, ilaç araştırmaları için hayvan kullanımını minimize edilmiş, hücre-doku ilişkisi daha iyi anlaşılmış ve sonuçta nakil için de tam bir fonksiyonel doku veya organ üretmek mümkün olacaktır.



Şekil 1.4. Biyoyazıcı çeşitleri (Foyt ve ark., 2018).

1.4.1. Mürekkep Püskürtmeli Biyoyazıcılar

Mürekkep püskürtmeli biyoyazıcı sistemi, termal, basınç veya akustik odaklı mekanizmalara dayanır ve yüksek verimli bir şekilde hücre süspansiyonu damlacıklarının üretimi için sırasıyla ısı enerjisi, elektrik enerjisi ve ses enerjisini kullanır (Şekil 1.4). Damlacık temelli bu biyoyazıcılar, basitlikleri, çok yönlülükleri

ve canlı hücreler, büyüme faktörleri, genler ve eczacılık gibi çeşitli biyolojik maddeleri dağıtma potansiyelleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Saunders ve Derby, 2014).

1.4.2. Mikroekstrüzyon Temelli Biyoyazıcılar

Mikroekstrüzyon temelli biyobaskı sistemi, sırasıyla bir sıvı dağıtım sistemi ve ekstrüzyon ve biyobaskı için otomatik bir robotik sistemin bir karışımıdır. Bu biyoyazıcılar, mekanik veya pnömatik tahrikli sistemleri kullanır ve bir filament şeklinde canlı hücreleri biriktirir (Şekil 1.4) (Ozbolat ve Hospodiuk, 2016). Bu tür sistemlerde biyomürekkep, silindirik bir filaman içinde kapsüllenmiş canlı hücrelerin hassas bir şekilde dağıtılmasını sağlayan bilgisayar kontrollü bir şekilde bir biriktirme yapılarak dağıtılmaktadır.

1.4.3. Lazer Destekli Biyoyazıcılar

Verici bir slayttan alıcı bir slayta canlı hücreler ve biyomalzemeler lazer darbesiyle ışınlanan bir malzemeye dahil edilir ve bir alıcı substrat üzerinde toplanır (Şekil 1.4). Bu biyoyazıcı tekniği itilen miktarın iyi kontrolünü sağlama ve alt tabakanın bozulmasını önleme, canlı hücreler, biyomalzemeler, büyüme faktörleri, genler ve vektörler ve ilaçlar vb. gibi çeşitli biyolojiklerin dağıtılmasında çeşitli avantajlar sunar. Bununla birlikte, kontrol parametrelerinin hassasiyeti nedeniyle uygulanması zor olmaya devam etmektedir (Duocastella ve ark., 2007; Mézel ve ark., 2010).

1.4.4. Stereolitografi Biyoyazıcıları

Stereolitografi biyoyazıcıları, lazer destekli yazıcılardan modifiye edilmiştir. Aynı şekilde, lazer destekli biyoyazıcılar gibi stereolitografi biyoyazıcılarda iskelenin imalatı sırasında katman-katman modelinde biyobağın oluşması için ışığı kullanır (Şekil 1.4). Bir lazer ve x-y-z kontrollü aşamalar kullanarak

ışıkla sertleşen polimer veya reçineden katı yapıları üretmek için kullanılır (Melchels ve ark., 2010). Baskı çözünürlüğü lazer enerjisine ve odağa bağlıdır. Genellikle, bu biyoyazıcılar, bir yapıdaki karmaşık uçaklar için bile aynı baskı süresini sağlayan ve bu nedenle geleneksel biyoyazıcılara göre daha avantajlı olan dijital bir projektör kullanır. Ayrıca, bu tür yazıcıların kullanımıda oldukça basittir (Gou ve ark., 2014). Genel olarak, teknik aselüler yapı iskeleleri üretmek için kullanılmış olsa da, araştırmacılar fotopolimerize edilebilir proteinleri ve hücresel ipuçlarını stereolitografi kullanarak iskelelere dahil etmişlerdir (Castro ve ark., 2015).

1.5. Biyobaskı Süreci

Biyolojik baskı teknolojisi üç ana bileşeni gerektirmektedir. Bunlar 3B yazıcılar, polimer çözümü ve canlı hücrelerdir. Biyobaskı sürecindeki ana adımlar ise, görüntüleme ve tasarım, malzeme ve hücre seçimi ve doku yapısının basımıdır. Basılı yapı daha sonra bazı durumlarda *in vitro* olgunlaşma süresinden sonra transplante edilir veya *in vitro* analiz için ayrılır (Murphy ve Atala, 2014).

1.5.1. Görüntüleme ve Tasarım

Doku ve organların karmaşık mimarisini yeniden üretmek için öncelikli olarak bileşenlerinin bileşimi ve organizasyonunun kapsamlı bir şekilde anlaşılması gerekir. Tıbbi görüntüleme teknolojileri, doku mühendisleri tarafından hücre, doku, organ ve organizma seviyelerinde üç boyutlu yapılar ve işlevleri hakkında bilgi sağlamak için kullanılan vazgeçilmez bir araçtır. Bu teknolojiler, bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans görüntülemedir (MRI) gibi invazif olmayan görüntüleme yöntemlerini içerir. Doku veya organ mimarisinin bilgisayar tabanlı 3B modellerini üretmek için bilgisayar destekli tasarım ve bilgisayar destekli üretim (CAD-CAM) araçları ve matematiksel modelleme teknikleri kullanılır (Horn ve Harrysson, 2012). Bu, canlı hücreleri, pre-polimer hidrojelleri (biyomateryaller) ve büyüme faktörlerini biriktirmek için gelişmiş bir üretim platformu sağlar (Murphy ve

Atala, 2014; Ng ve ark., 2016). Dijital tasarımı tamamlanan doku veya organ modeli, prototip oluşturma ve üretim için sayısal olarak kontrol edilebilen biyobaskı sistemleri ile arayüzlenir. Üç boyutlu oluşturulmuş model, biyoyazıcı sistemine aktarılan ince 2B yatay dilimlere (özelleştirilebilir boyut ve yönelimle) bölünür. İki boyutlu yatay dilimlerde bulunan anatomik ve mimari bilgiler, biyobaskı cihazına katman katman biriktirme talimatları sunar (Murphy ve Atala, 2014).

1.5.2. Üç Boyutlu Biyobaskıda İskele Geometrisi

İskele geometrisinin hücre davranışını nasıl etkilediğini araştırmak ve optimum iskele geometrisi elde etmek için, çeşitli geometrik desenlere sahip 3B yazdırılmış iskeleler üzerindeki mezenkimal kök hücrelerin yapışması değerlendirilmiş ve daha küçük kare gözenekli iskelelere sahip iskelelerin yüksek MKH yapışmasına katkısı olduğu gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2016).

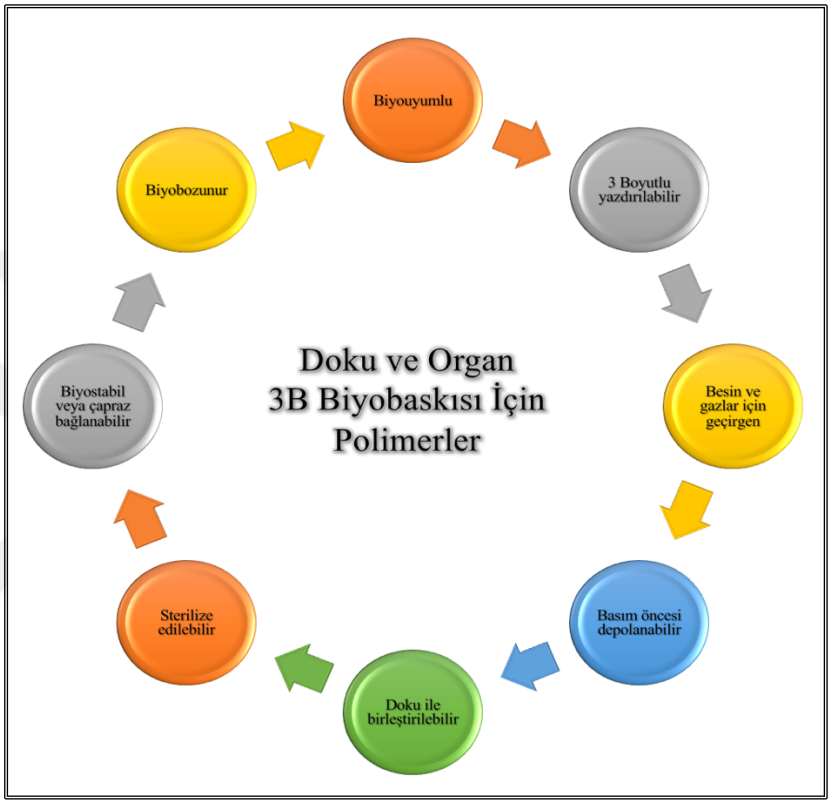
Geleneksel doku mühendisliği yaklaşımlarına dayanan kümelenmeyi teşvik etme yaklaşımları, kapsülleme veya tek hücreli süspansiyonları gözenekli bir yapı iskelesi üzerine ekmeyi içerir (Glicklis ve ark., 2000; Underhill ve ark., 2007). İskele tasarımı, örneğin, nekrotik çekirdek oluşumunu önlemek için agregat boyutunu sınırlandırmak veya *in vivo* implantasyondan hemen sonra besin difüzyonunu ve vaskülarizasyonu kolaylaştırmak için bitişik agregatlar arasındaki ara bağlantıyı teşvik etmek için çeşitli yollarla uyarlanmalıdır (Baranski ve ark., 2013; Lin ve Chang, 2008). Üç boyutlu iskeleler içinde kümeleşmenin modülasyonu, elektrospin, dondurarak döküm, tuzla özütleme veya gaz kabarcıkları gibi iskele üretim stratejilerinin doğasında bulunan sınırlamalara bağlıdır (Lee ve ark., 2005; Li ve Yang, 2001; Lien ve ark., 2009; Lowery ve ark., 2010; Ranucci ve ark., 2000). Bu yöntemlerde, iskele gözenek boyutu, geometrisi ve birbirine bağlanabilirlik üzerinde yalnızca sınırlı bir kontrol mümkündür. Üç boyutlu baskı, tek tip ve tekrarlanabilir üretim, kullanıcı hatalarının azaltılması ve iskele gözenek boyutu, ara bağlantı ve geometri üzerinde hassas kontrol dahil olmak üzere geleneksel iskele üretim tekniklerine göre çeşitli avantajlara sahiptir (Gariboldi ve Best, 2015). Altıgen lobül benzeri geometrilerin

kültürlenmiş hepatositler üzerinde yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (Liu Tsang ve ark., 2007; Ma ve ark., 2016) Bu nedenle, üç boyutlu yazdırılmış iskele gözenek geometrisinin etkileri mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi dışındaki dokular için veya yumuşak doku mühendisliğindeki uygulamalar için titizlikle araştırılmamıştır. Bu, kısmen, çoğunlukla hidrojeller olmak üzere yumuşak malzemelerin 3B baskısındaki zorluklardan kaynaklanıyor olabilir.

1.5.3. Malzeme ve Hücre Seçimi

Başlangıçta 3B baskı teknolojileri, metallerin, seramiklerin ve termoplastik polimerlerin basımı gibi biyolojik olmayan uygulamalar için tasarlanmıştı. Genellikle organik çözücülerin, yüksek sıcaklıkların veya çapraz bağlama ajanlarının kullanımını içeriyordu. Bu koşullar, canlı hücreler ve biyolojik malzemelerle uyumlu değildi. Bu nedenle, yalnızca biyolojik malzemeler ve baskı süreciyle uyumlu değil, aynı zamanda canlı doku yapıları için istenen mekanik ve fonksiyonel özellikleri de sağlayabilen uygun biyolojik malzemeleri bulmak 3B biyobaskının önceliklerinden biri olmuştur. Polimer solüsyonu ve canlı hücreler biyomürekkebi oluşturur. Bu bileşenlerin seçimi sırasında seçilen polimer çözeltisinin özellikleri ve bu özelliklerin yeni doku oluşumu, hücre göçünü, besin maddelerini ve oksijen difüzyonununa engel olmadan düşük viskozite, düşük sertlik ve düşük çapraz bağlanma gibi çeşitli faktörleri göz önünde bulundurulur. Öte yandan, seçilen polimerlerin yüksek mekanik özellikler, boyutsal doğruluk ve daha viskoz, sert ve hızlı jelleşen malzemeler gerektiren daha iyi yapısal özellikler göstermesi gerekir. Bu özellikler birbiriyle çelişir, bu nedenle yüksek hücre canlılığına sahip yapıların biyobaskısını sağlamak için seçilen polimerik malzemelerin yapısal, fizikomekanik ve biyolojik özellikleri arasında bir denge korunması son derece önemlidir (Aljohani ve ark., 2018). Bu sebeple uygun bir hücre içeren 3B basılabilir biyomürekkep hazırlamak için polimerlerin, biyoyapay organların 3B biyobaskısı ve klinik uygulamalar için bazı temel gereksinimi karşılaması gerekmektedir (Wang, 2019) (Şekil 1.5). Biyolojik olarak uyumlu (toksik olmayan veya belirgin olmayan toksisite, immünolojik reaksiyon yok veya çok az), 3B biyoyazıcılar kullanılarak biyolojik olarak yazdırılabilir, yeterince güçlü mekanik

özelliklere sahip biyolojik olarak kararlı veya çapraz bağlanabilir, biyolojik olarak parçalanabilir (özellikle biyolojik bozunma hızı, yeni doku / organ oluşturma hızıyla eşleşmelidir), konak vasküler ve sinir ağları ile dikilebilir, besinler ve gazlar için geçirgen, basılmadan önce biyolojik olarak depolanabilir ve sterilize edilebilir olmalıdır.



Şekil 1.5. Biyoyapay doku ve organ 3B biyobaskısı için seçilecek polimerlerin temel gereksinimleri (Wang, 2019).

Basılabilirlik: Uygun bir malzemenin önemli bir özelliği, istenen uzaysal ve zamansal kontrol ile doğru ve kesin bir şekilde biriktirilebilmesidir. Genel iskele geometrisini kontrol etmek için, hem doğru bir şekilde malzemeyi biriktirmek hem de uzamsal çözünürlüğü korumak önemlidir. Zamansal çözünürlük, ayarlanması çok uzun süren malzemeler, iskelenin uzamsal çözünürlüğünü etkilerken çok hızlı yerleştirilen malzemeler nozülde tıkanmaya neden olabilir. Göz önünde bulundurulması gereken diğer faktörler ise, hücrelerin veya biyomoleküllerin baskı sırasında kayma gerilimi veya yüksek sıcaklıklarla karşılaşıp karşılaşmayacağıdır (Mehrban ve ark., 2016). Biyoyazıcı ile baskıda, işlemeyi ve biriktirmeyi kolaylaştıran

özellikler arasında viskozite, jelleşme yöntemleri ve reolojik özellikler yer alabilir (Murphy ve Atala, 2014). Başarılı bir transplantasyon için inflamasyonu en aza indirmeye ve sitotoksik yan etkiler üretmeyecek materyaller gereklidir.

Biyouyumluluk: Konakçıda istenmeyen herhangi bir lokal veya sistemik etki ortaya çıkarmadan endojen doku ile bir arada bulunmaya, pasif olarak istenen etkilere izin vermesi veya aktif olarak üretmesidir (Williams, 2008).

Biyobozunurluk ve yan ürünler: Bir malzeme iskelesi bozuldukça, gömülü hücreler proteazlar salgılar ve ardından yeni dokuyu tanımlayan ECM proteinleri üretir (West ve Hubbell, 1999). Malzemelerin bozunma kinetiği anlaşılmalı ve kontrol edilmelidir. Materyal kimyası, oksitleyici ajanlar, enzimler veya iyonlaştırıcı radyasyon gibi çeşitli nedenlerle bir materyalin daha küçük kimyasal birimlere ayrışması/bozunması yüzey (materyallerin katman katman kaybı) veya yığın (tüm materyalin parçalanması) şeklinde iki türlü gerçekleşir (Shah ve ark., 2008). Bozunma, numune kütlesinde azalma, mekanik dayanım kaybı ve kimyasal bağlarda değişiklikler şeklinde görülür. Materyal kaybı ve genel iskelenin mekanik bütünlüğündeki azalma hücresel yanıtı değiştirebileceği için kontrollü bozunma hayati önem taşır (Göpferich, 1996). Örneğin, bozunma sırasında yapı iskeleleri daha gözenekli hale gelebilir ve bu da hücre göçü ve besin alımı üzerinde derin bir etkiye sebep olacaktır. Doğru boyutları koruyan nispeten inert ve basılabilir bir malzeme yine de toksik olan veya vücut tarafından kolayca çıkarılmayan (Salacinski ve ark., 2002) yan ürünler üretebilir ve bu nedenle bir malzemenin bozunma davranışını değerlendirmek için kimyasal bileşimi, termal özellikleri, yüzey alanı / hacim oranı ve stereokimya gibi faktörleri de dikkate alınmalıdır. Sonuç olarak, bozunma oranları, hücrelerin kendi ECM'lerini üretme yetenekleriyle eşleştirilmeli, bozunma yan ürünleri toksik olmamalı ve malzemeler uygun şişme veya kasılma özellikleri göstermelidir (Murphy ve Atala, 2014).

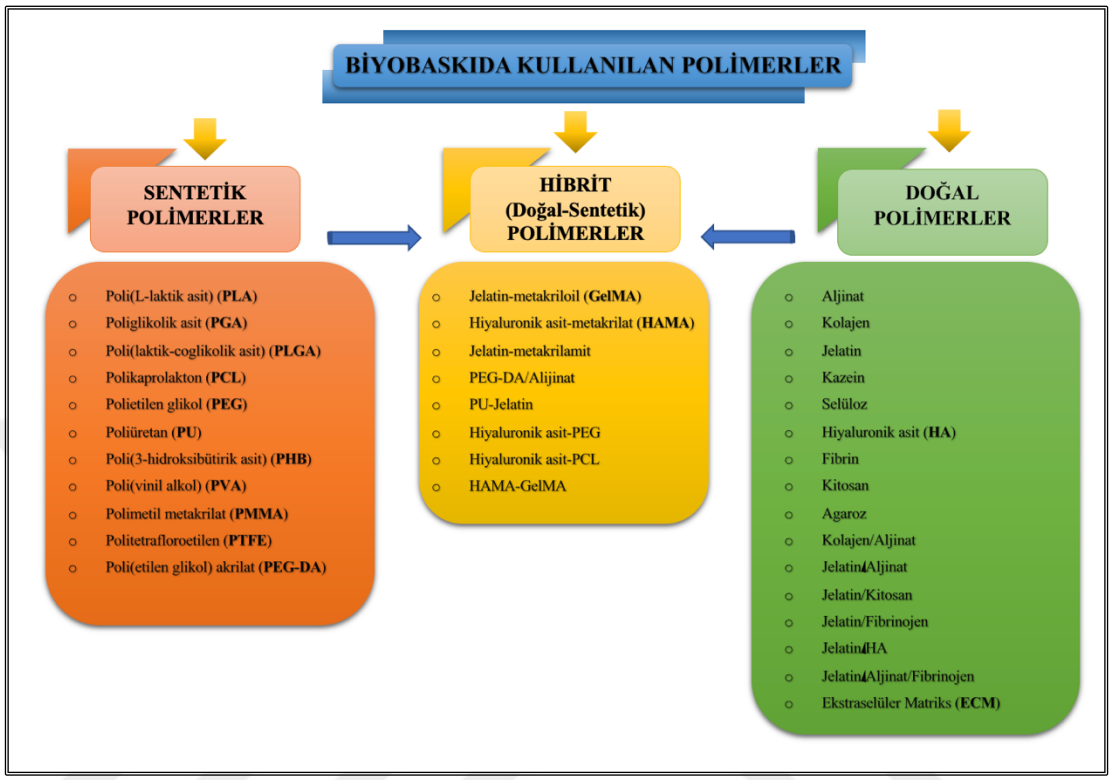
Yapısal ve mekanik özellikler: Bir 3B yapının korunması ve sürdürülebilirliği ve yapının devam eden işlevleri için belirli kuvvetlere direnmek veya kuvvet üretmek için uygun bir malzeme seçimi gereklidir. Malzemeler, üretimi yapılacak olan çeşitli doku türleri için farklı yapısal gereksinimlere ihtiyaç duyan mukavemet için sert

termoplastik polimerlerden hücre uyumluluğu için yumuşak hidrojellere kadar yapının gerekli mekanik özelliklerine göre dikkatlice seçilmelidir (Ananthanarayanan ve ark., 2011; Hutmacher, 2000; Murphy ve ark., 2013; Ringeisen ve ark., 2004).

Malzeme biyomimikrisi: Doku mühendisliği yapılmış bir yapıdaki 3B ortam, hem endojen hem de eksojen olarak hücrelerin tutunması, göçü, çoğalması ve işlevi üzerinde aktif bir etkiye sebep olabilir (Behonick ve Werb, 2003; Discher ve ark., 2005). İstenen yapısal, fonksiyonel ve dinamik malzeme özellikleri dokuya özgü endojen malzeme bileşimleri bilgisine dayanmalıdır. Malzemelerin nano ölçekli özellikleri, hücre yapışmasını, hücre yönelimini, hücre hareketliliğini, yüzey antijen görüntüsünü, hücre iskeleti yoğunlaşmasını ve transkripsiyonel aktiviteyi ve gen ifadesini düzenleyen hücre içi sinyal yollarının modülasyonunu etkileyebilir (Stevens ve George, 2005). Spesifik fizyolojik fonksiyonlara sahip materyalleri tasarlamaya yönelik bir biyomimikri yaklaşımı, ilgilenilen dokudaki ECM bileşenlerinin doğal olarak oluşan dokuya özgü kompozisyonunun ve lokalizasyonunun anlaşılmasını gerektirir. Doku hücresizleştirme yöntemlerindeki son gelişmeler de ECM bileşimlerinin, lokalizasyonunun ve biyolojik işlevlerin ayrıntılı analizi için sağlam ECM yapı iskeletleri sağlayabilir (Baptista ve ark., 2009).

Onarım ve yenilenme için yenileyici tıp alanında kullanılan materyaller ağırlıklı olarak ya doğal olarak türetilmiş polimerlere (aljinat, selüloz, jelatin, kolajen, kitosan, fibrin ve hiyaluronik asit (HA) gibi genellikle hayvan veya insan dokularından izole edilmiş polimerler) ya da sentetik moleküllere (polietilen glikol; PEG) (Hunt ve Grover, 2010; Li ve Kawashita, 2011; Spiller ve ark., 2011; Sun ve ark., 2012) dayanmaktadır. Buna bağlı olarak biyobaskı uygulamaları için çok çeşitli doğal, sentetik ve hibrit polimerler kullanılmaktadır (Wang, 2019) (Şekil 1.6). Doğal polimerlerin 3B biyobaskı ve diğer doku mühendisliği uygulamaları için avantajları, insan ECM'sine benzerlikleri ve doğal biyoaktiviteleridir. Sentetik polimerlerin avantajı ise, belirli uygulamalara uyacak şekilde belirli fiziksel özelliklerle uyarlanabilmektedirler. Sentetik polimerlerin zayıf biyolojik uyumluluk, toksik bozunma ürünleri ve bozunma sırasında mekanik özelliklerin kaybı gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Buna rağmen, hem hidrofilik hem de emici olan sentetik hidrojeller,

sentez sırasında fiziksel özelliklerini kontrol etme kolaylığı sağladığı için 3B biyobaskıda yenileyici tıp uygulamaları için kullanılmaktadır (Raphael ve ark., 2017).



Şekil 1.6. Biyobaskı uygulamalarında kullanılan polimerler (Wang, 2019).

Biyolojik materyallerin çeşitliliği arttıkça, tıbbi uygulamalar için yazdırılabilir materyallerin istenen özelliklerinin listesi daha spesifik ve karmaşık hale gelmiştir. Malzemeler, 3B biyobasımı kolaylaştırmak için uygun çapraz bağlama mekanizmalarına sahip olmalı, uzun vadede transplantasyon için biyolojik olarak uyumlu olmalı ve kısa vadeli stabiliteye sahip olmalıdır (Murphy ve Atala, 2014). Kısa vadeli stabilite için gözenekler, kanallar ve ağlar gibi yapılar doku yapılarının çökmemesi ve başlangıçtaki mekanik özelliklerini korumak için gereklidir. Basılmış dokular *in vivo* geliştikçe, hücresel ve fizyolojik ihtiyaçlar tarafından yönlendirilen yapıların oluşumunu kolaylaştırarak yeniden şekillenmeye imkân sağlamalıdır. En önemlisi, malzemeler hücresel bağlanmayı, çoğalmayı ve hücrenin işlevselliği desteklemelidir (Murphy ve ark., 2013). Materyal seçimi, materyalin baskı işlemi sırasında hücre canlılığını koruma kabiliyetinden ve biyoyazıcı tipinden de etkilenebilir (Chang ve ark., 2008; Hopp ve ark., 2005; Xu ve ark., 2005, Xu ve ark.,

2006). Biyolojik baskı için ideal polimerik malzemeler, nispeten yüksek sıcaklıkta bozulmadan kalmalıdır. İdeal olarak, termal olarak kararlı polimerler düşük viskoziteye sahiptir ve 37 °C 'de katılaşır (Zhang ve ark., 2016).

1.6. Hidrojeller

Hidrojeller, belirli fiziksel (ör., ısıya duyarlı), kimyasal (ör., kovalent bağ) veya biyokimyasal (ör., enzimatik) koşullar altında büyük miktarlarda su ve jeli emebilen ve tutabilen 3B hidrofilik polimer ağlarıdır. Hidrojellerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, uygun polimer bileşenleri, inorganik çözücüler ve jelleşme protokolleri seçilerek belirli biyomedikal uygulamalar için tasarlanabilir (Fedorovich ve ark., 2011; Hou ve ark., 2015; Kong ve ark., 2004).

Hidrojeller, yüksek moleküler ağırlıklı çapraz bağlı yapılardır ve biyomürekkebin temel bileşenleridir. Aslında, hidrojeller sıvı bileşeninin su gibi jöle tipi malzemelere benzerler ancak akışkanın içindeki üç boyutlu çapraz bağlı polimer ağından dolayı canlı dokulardakine benzer özellikler sağlayan pratik olarak kararlı durumda herhangi bir akış meydana getirmeyen malzemelerdir. Mikroekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcılar için özellikle, biyomürekkebin fiziko-mekanik özelliklerini belirlemeleri ve benzersiz kimyasal ve fiziksel özellikleri, yüksek su içeriği ve *in vivo* biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle biyo bağlantılarda hücre matrisi olarak uygulanabilen tartışmasız en kapsamlı biyomalzemelerdir (Kong ve ark., 2004). Çünkü hücre matrisi olarak bağlanabilirler ve yerel dokuyu değiştirmek veya taklit etmek için modifiye edilebilirler (Wong ve ark., 2000). Hidrojellerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücrelerin performansında oldukça etkileyici olacaktır. Bununla birlikte, hidrojeller doğaları gereği zayıftır ve kemik, kıkırdak gibi mekanik olarak güçlü bir ECM gerektiren doku ve organlar için 3B yapıları destekleme ihtiyacını karşılayamayabilirler.

Geleneksel hidrojeller, canlı hücrelere uygun koruma sağlayamama ve stabilizasyonları sırasında düşük çözünürlüğü koruyamama gibi çeşitli zorluklarla

karşı karşıyadır. Bu nedenle, yüksek çözünürlüklü biyolojik baskı ve hücre canlılığı için hidrojellerin mekanik ve biyolojik özellikleri geliştirilmelidir (Aljohani ve ark., 2018). Farklı biyouyumlulukları ve basılabilirlikleri nedeniyle, biyomürekkep üretimi için kullanılan jelatin, agaroz, polietilen glikol (PEG)-diakrilat ve aljinat gibi hücre büyümesini destekleyen doğal ve sentetik olan çeşitli hidrojeller bulunmaktadır (Datta, 2020).

1.6.1. Sodyum Aljinat (SA)

Aljinat veya sodyum aljinat (SA), deniz yosunundan elde edilen anyonik bir polisakkarittir. Doğal hücre dışı matrislere yapısal benzerliğe sahiptir. Buyüzden çeşitli biyomedikal uygulamaların yanı sıra biyoaktif maddelerin verilmesinde ve yara iyileşmesinde yaygın olarak uygulanmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilen, immünojenik olmayan ve toksik olmayan bir polisakkarit polimer olan sodyum aljinat doğal olarak mevcuttur; mannuronik ve guluronik asitlerden oluşur (Yu ve ark., 2013). Mannuronik asit β-(1→4) bağlantılarını oluşturur ve bu nedenle doğrusal ve esnek bir yapı sergiler. Aljinik asit polimer zincirindeki ana elementler, çapraz bağlanmaya izin veren karboksilik asit grubudur. Bu, aljinatı sıvı halinden yarı katı bir jel haline dönüştürür. Sodyum Aljinat, doğal ECM ile yapısal benzerlikleri ve mükemmel biyouyumluluk, düşük maliyet, yüksek viskozite ve oda sıcaklığında hızlı jelleşme kolaylığına sahip olması nedeniyle, biyomürekkep hazırlama için kullanılan toplam polimer dağılımının % 24'ünü oluşturduğu için biyobaskı uygulamalarında ilgi gören bir adaydır (Ahn ve ark., 2012; Carrow ve ark., 2015; Jia ve ark., 2014).

Bununla birlikte, RGD (hücre bağlanmasına aracılık eden hücre dışı matris proteini) gibi hücre adhezyon kısımlarına sahip değildir, bu nedenle hücre yapışmasını ve proliferasyonunu yeterince desteklemeyebilir. Bu tür sınırlamalar, hücre yapışkan moleküllerinin eklenmesi ve uyumlu polimerler ile harmanlanmasıyla aşılır. Mikroekstrüzyon 3B biyobaskıda en yaygın olarak biyomürekkep olarak kullanılan polisakkarit, çeşitli hücre dostu özellikleri nedeniyle aljinattır (Datta, 2020).

Hücre kapsülleme için genellikle aljinat hidrojeller uygulanır. Tüm prosedür, hücrelerin aljinat çözeltisi içinde karıştırılmasıyla hazırlanır ve karıştırma işleminden sonra, aljinat-hücre karışımı, bir kalsiyum klorür çözelti banyosuna alınır. Ancak düşük konsantrasyonlarda (%1-2), düşük viskozite nedeniyle aljinat çözeltisi 3B biyoyazıcıdan yazdırılamaz. Aljinatın hücre dışı matrislere yapısal karşılığı, mükemmel bir biyomateryal yaratır. Matris sertliği, kök hücre farklılaşmasının işlevsel bir belirleyicisidir ve aljinat, kök hücre büyümesini yönetmek için potansiyel bir materyal oluşturur. Aljinat, hücre büyümesini desteklemeye yardımcı olur ve ayrıca hem *rovo* hem de *in vitro* farklılaşmaya kadar uzanan yüksek birçok yönlülüğe sahiptir. Örneğin, 3B biyobaskı uygulamaları için, mikroekstrüzyon baskı hızlı jelleşme gerektirir. Bu durumda, aljinat, çok değerlikli bir katyon ile birleştirildiğinde, jellerin sabit sıcaklıkta birikmesine ve birikmesine izin veren yüksek jelleşme prosedürlerini önerir. Ayrıca hücreleri kapsüllemek için de uygulanır. Aljinat biyomürekkebinin sertliği ve bileşim özellikleri, kök hücrelerin farklılaşmasını yönlendirmek için ayarlanabilir. Kahverengi alg hücre duvarlarından ekstrakte edilerek ve belirli koşullarda hidrojel oluşturan bir deniz malzemesi olduğu için maliyeti de düşüktür. Bu avantajlar nedeniyle biyomühendisler ve malzeme bilimcileri, doku mühendisliği ve yenileyici ilaçlarda biyomürekkeplerin hazırlanmasında aljinat kullanırlar. 3B biyoyazıcı (Jia ve ark., 2016) ve sodyum aljinat uygulamaları ve özellikleri (Christensen ve ark., 2015) ile doku üretimi şu anda ayrı olarak incelenmektedir.

1.7. Çapraz Bağlama

Genel olarak, tüm biyomürekkepler, biyobaskıdan sonra hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını desteklemesi gereken iskele benzeri yapılar oluşturmalıdır. Bu yapıların oluşumu, foto, kimyasal veya çapraz bağlanan polimerler olan hidrojel prepolimer çözeltileri kullanılarak sağlanabilir (Araujo ve ark., 2014; Bajaj ve ark., 2014). İyonik çapraz bağlama, hücrelerin minimum hasara neden olduğu bir yöntemdir. Çapraz bağlanma süreci orta derecede hızlı gerçekleşir. Biyobaskılı doku yapılarının uzun vadeli stabilitesi, ancak, biyobaskılı yapıları stabilize etmek için

ikincil bir çapraz bağlama mekanizmasına bağlıdır (Colosi ve ark., 2016). İki genel çapraz bağlama mekanizması vardır. Birincisi, kovalent olmayan etkileşimler yoluyla fiziksel çapraz bağlanma; ikincisi ise, kovalent bağların etkileşimi ile kimyasal çapraz bağlama (Malda ve ark., 2013). Örneğin, aljinat çözeltilerinin katı bir fiziksel hidrojel (Augst ve ark., 2006; Christensen ve ark., 2015) oluşturmak için Ca^{2+} iyonlarının varlığında hızla çapraz bağlanabileceği iyi bilinmektedir . Jelatin metakriloil (GelMA) hidrojelleri gibi diğer sistemler, ışığa maruz kalındığında bir foto başlatıcı varlığında kalıcı 3B polimerik ağlar oluşturmak için foto çapraz bağlanabilir (Nichol ve ark., 2010; Yue ve ark., 2015). Fiziksel çapraz jeller uzun bir zaman süresi boyunca, tipik olarak stabil değildir. Biyobaskı yapıları üretilirken sadece zamansal stabilite gereklidir (Bertassoni ve ark., 2014; Kolesky ve ark., 2014; Miller ve ark., 2012). Bunun tersine, kimyasal çapraz bağlanmış hidrojeller daha uzun vadeli stabiliteye sahiptir ve biyobaskının biyomimetik ECM olarak işlev görmesi için uygundur.

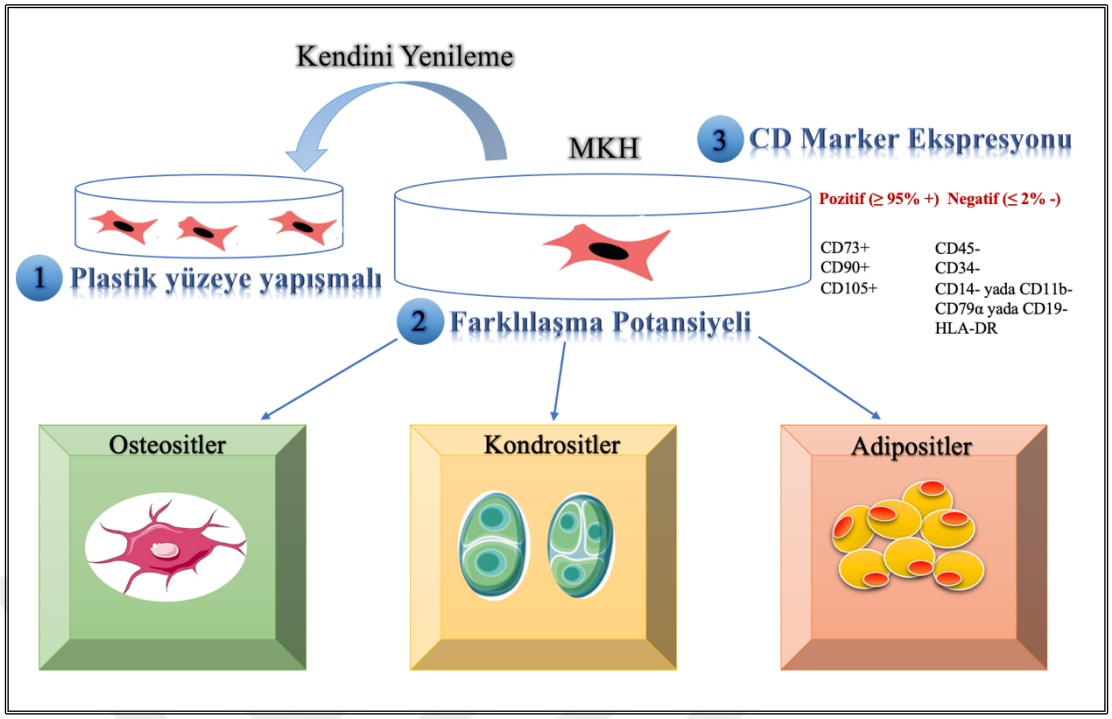
1.8. Üç Boyutlu Biyobaskıda Hücre Seçimi ve Kök Hücreler

Biyolojik baskı için ideal hücre tipi seçerken, hücrelerin erişilebilirliğine ve kullanılabilirliğine, kendi kendini yenileme ve çoğalma kapasitesine, farklılaşma profiline, hücresel tümör oluşturma potansiyeline ve ayrıca kapsülleme ve baskıyı takiben canlılığı korumasına dikkat etmek gereklidir. Biyobaskı için kök hücreler, pluripotent oldukları ve uygun fiziksel ve kimyasal uyarıcılara maruz kaldıklarında diğer hücre tiplerine farklılaşabildikleri için özellikle çekici hücre tipleridir (Prisk ve Huard, 2005). Bazı kök hücreler vücudumuzda bir iç onarım sistemi olarak çalışır ve birçok yetişkin dokuda bulunurlar. Gerektiğinde hastalık veya yaralanma sırasında diğer hücreleri yenilemek için bölünürler (Nirmalanandhan ve Sittampalam, 2009). Kök hücreler, bölündükleri zaman ya bir kök hücre olarak kalırlar ya da kas, kan veya beyin hücresi gibi özel işlevleri bulunan özelleşmiş başka bir hücreye farklılaşma potansiyeline sahiptir. Kök hücreler, kendi kendine çoğalma ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma gibi yeteneklere sahip olduklarından, biyobaskı sırasında kullanılan diğer hücre türlerine kıyasla daha önemli faydalar sunarlar (Jakab ve ark., 2010). Doku

mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan üç kök hücre türü arasında mezenkimal kök hücreler (MKH)'ler, embriyonik kök hücreler (EKH)'ler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH)'ler bulunur.

1.8.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Genellikle kemik iliğinden veya yağ dokularından izole edilen yetişkin multipotent kök hücreler olan MKH'ler, *in vitro* olarak osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşma potansiyeline sahip aderan hücrelerdir (Nombela-Arrieta ve ark., 2011). İnsan MKH'leri, bir hücre yüzey belirteçleri panelini (CD73, CD90 ve CD105) ifade ederken endotelyal veya hematopoietik hücre belirteçlerinden (CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR) yoksundur (Şekil 1.7) (Dominici ve ark., 2006). Birçok çalışma, mezenkimal stromal hücre farklılaşmasının, endotelyal hücreler (Oswald ve ark., 2004), kardiyomiyositler (Makino ve ark., 1999), hepatositler (Snykers ve ark., 2009) ve nöral hücreler (Arthur ve ark., 2008; Phinney ve Prockop, 2007) dahil olmak üzere mezodermal ve mezodermal olmayan birçok diğer hücre tipine farklılaştığını bildirmiştir. Bu hücrelerin büyük miktarları yağ dokularından elde edilebildiği için MKH'lerin birçok avantajı vardır (Lindroos ve ark., 2011). Amniyotik sıvıdan türetilen MKH'ler *, in vitro* olarak sürdürülebilir uzun bir süre boyunca kültürlenebilir (Skardal ve ark., 2012). EKH'ler ve iPKH'lerin aksine, *in vitro* tümörjenite göstermezler , bu da farklılaşmamış MKH'lerin allogreft implantasyonu için kullanılabileceği anlamına gelir (De Coppi ve ark., 2007; Skardal ve ark., 2012). Ayrıca, farklılaşmamış MKH'ler, transplantasyondan sonra greft reddi riskini azaltabilen immünomodülatör özelliklere sahiptir (Gao ve ark., 2016). Böylece hastadan elde edilen yetişkin kök hücreler, bağışıklık reddini hafifletme avantajına sahiptir. MKHler, yeni doku üretmek (örneğin, kıkırdak onarımı), doku hasarının iyileştirilmesine yardımcı olmak (örneğin, kardiyovasküler hastalık), diğer hücreler ve dokuların iyileştirilmesini teşvik etmek (örneğin, hematopoietik hücreler ve pankreas adacıkları) ve immün temelli patolojilerin (örneğin, graft-host hastalığı, GVHD) tedavi edilmesinde farklı tedavi modlarında potansiyel kullanımları için incelenmektelerdir (Denu ve Hematti, 2016).



Şekil 1.7. Multipotent mezenkimal stromal hücreleri tanımlamak için minimum kriterler (Dominici ve ark., 2006).

1.8.2. Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Yağ dokusu, birçok soydan hücreye farklılaşabilen bol ve erişilebilir bir yetişkin kök hücre kaynağını temsil eder. Çeşitli literatür incelemeleri, kemik iliği, yağ dokusu ve göbek kordonundan elde edilen MKH'lerin fibroblast benzeri morfoloji, immün fenotip, izolasyon başarı oranı, koloni sıklığı ve farklılaşma kapasitesi sunarak hiçbir farklılık göstermediğini göstermektedir (Izadpanah ve ark., 2006; Kern ve ark., 2006). Bununla birlikte, yenileyici tıp uygulamaları için bir kök hücrenin ideal olarak aşağıdaki kriterleri karşılaması gerektiği önerilmiştir (Gimble, 2003; Gimble ve ark., 2007):

1. Tedavi protokolüne olanak verecek miktarda hücre elde edilebilir.
2. Minimal invaziv bir prosedürle hasat edilebilir.
3. Düzenlenebilir ve tekrarlanabilir bir şekilde birden fazla hücre soyu boyunca farklılaştırılabilir.
4. Otolog veya allojenik bir konağa güvenli ve etkili bir şekilde nakledilebilir.

5. Mevcut İyi İmalat Uygulamaları (GMP) yönergelerine uygun olarak üretilebilir.

Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin tüm bu kriterleri karşıladığı düşünülebilir. Modern popülasyonlarda artan obezite ile subkutan (deri altı) yağ dokusu bol miktarda bulunur ve kolayca erişilebilir. Yağ dokusunu hasat etmek için bir liposakşın prosedürü kemik iliği aspirasyonundan daha az invazivdir. Genel olarak, liposakşın prosedüründe teknik olarak daha az hasta rahatsızlığı ve donör morbiditesi üretir. Lokal anestezi altında küçük miktarlarda yağ dokusu (100-200 ml) elde edilebilir. Bununla birlikte, 1g yağ dokudan yaklaşık 5×10^3 kök hücre elde edilir (Kitagawa ve ark., 2006). Bu da 1g kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin sayısından 500 kat daha fazladır. Bu nedenle, yağ doku, zengin bir kök hücre kaynağı olarak düşünülebilir (Fraser ve ark., 2006).

1.9. Üç Boyutlu Biyobaskının Sınırlılıkları

Modern 3B biyobaskı teknolojisinin sunduğu kapsamlı avantajlara rağmen, 3B dokular için gerekli artan karmaşıklık nedeniyle, 3B biyobaskı tüm üretim alanlarında birçok zorlukla karşı karşıyadır. Örneğin, hücre kapsüllenmiş malzemeler, hücrelere zarar verebilecek şekilde, basımla birlikte uzun süreler boyunca kimyasal çapraz bağlayıcılara maruz kalmaktadır. Katmanlama anında, baskının kendisi tarafından üretilen mekanik stres de hücre işlevinde hasarla sonuçlanabilmektedir (Jia ve ark., 2014). Biyomürekkebin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin ayarlanmış özellikleriyle ilgili de çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Basımda kullanılacak hidrojellerin örneğin, kemik ve kıkırdak gibi sert dokuların büyümesini destekleyecek kadar sertliğinin ayarlanması gerekmektedir. Ayrıca sınırlı kullanılabilirlik, canlılık, adhezyon ve hücrelerin seçilen polimer bazlı yapı iskeletlerinde çoğalması, farklı dokuların biyolojik olarak yazdırılmasını engellemektedir.

Hücrelerin fizyolojik durumlarını sürdürme ve *in vivo* ortamda özel işlev geliştirme konusunda sınırlı yetenekleri vardır (Gu ve ark., 2015). Bununla birlikte,

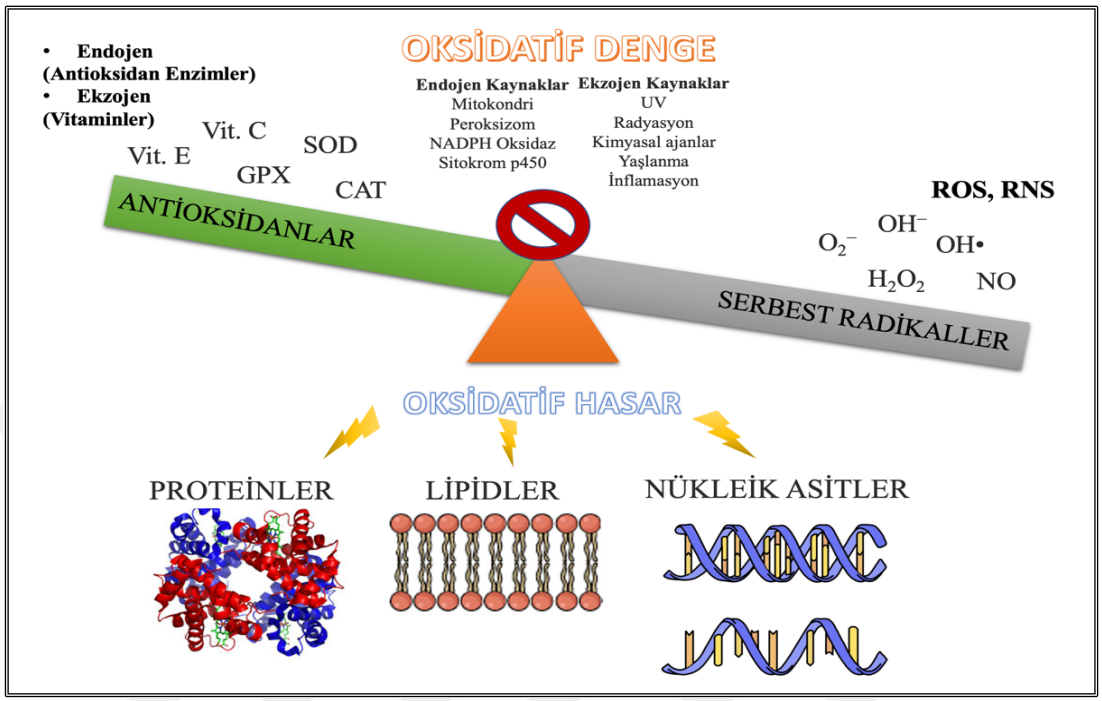
farklı donörlerden alınan hücreler immünojenik yanıta sebep olabilmektedir (Ozbolat ve Yu, 2013) Kök hücre kullanımında ise, tüm hücre tiplerine farklılaşma konusunda sınırlı çalışma yapılabilmektedir (Mandrycky ve ark., 2016). Benzer şekilde, çeşitli hücre tiplerinin eşzamanlı biyobaskısında ise, baskı sürecini daha da karmaşık hale getiren farklı biyomürekkeplerin hazırlanmasını gerektirmektedir. Ayrıca, bu biyomürekkeplerin raf ömrü sınırlıdır ve depolama zorlukları vardır (Murphy ve Atala, 2014). Tüm bunlarla birlikte, baskı koşullarının optimizasyonu 3B yazıcıların etkinliğini düşürmekte ve doğal benzeri tam ölçekli organların biyolojik olarak basılmasını sınırlamaktadır (Yu ve ark., 2014).

1.10. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, süperoksit radikalleri (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH•) ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen (ROS) ve azot türlerinin (RNS) düzensiz üretimi ve/veya atılması ile karakterize edilir. Serbest radikallerin birikmesi DNA, protein ve lipitler dahil olmak üzere tüm biyomoleküllere zarar verebilir (Denu ve Hematti, 2016). Reaktif oksijen türleri, mitokondri başta olmak üzere hücrelerin organellerinde meydana gelen metabolik olaylar sonucu yada yaşlanma, radyasyon, inflamasyon, basınç, kimyasallara maruz kalma gibi çeşitli sebeplere bağlı olarakta meydana gelebilen oldukça yüksek reaktiviteye sahip türlerdir (Ugurel ve ark., 2017; Yan, 2014; Yan ve Sohal, 1998).

ROS'un zararlı olduğu kavramı, ROS detoksifiye edici enzimlerin (Süperoksit dismutaz, katalaz, vb.), ROS tutucuların (örn., Vitamin C ve E) ve nötrofillerin bakterisit aktivitesinin keşfedilmesiyle doğrulanmıştır (Atashi ve ark., 2015). ROS'un düzeyi hücre için oldukça önemlidir. Düşük ROS seviyesi, birçok patofizyolojik süreçte anahtar bir sinyal molekülü iken, aşırı ROS hücresel bileşenlere zarar verme ve hücre ölümünü başlatmada oldukça kritik bir rol oynamaktadır (Fuhrmann ve Brüne, 2017). Yüksek ROS seviyeleri hücresel hasar ve fonksiyon bozukluğuna neden olur, ancak hücresel proliferasyonu, farklılaşmayı ve hayatta kalmayı sürdürmek için

düşük ROS seviyesinin gerekli ve avantajlı olduğu düşünülmektedir (Atashi ve ark., 2015; D'Autréaux ve Toledano, 2007; Kobayashi ve Suda, 2012).



Şekil 1.8. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik: Oksidatif stres.

Oksidatif stres, antioksidan ve oksidan seviyeleri (serbest radikaller veya reaktif türler) arasındaki fizyolojik dengesizliğin bir sonucu olarak oksidanlar lehine ortaya çıkan hücresel bir durumdur (Şekil 1.8). Serbest radikallerin üretimi, vücudun doğal antioksidan savunma mekanizmalarının başa çıkabileceği seviyeyi aştığında gerçekleşmektedir. Antioksidanların bir kısmını hücrelerin kendisi tarafından enzimatik olarak üretilirken, bir kısmı da (enzimatik olmayan) dışardan alınmaktadır. Antioksidanların dört farklı mekanizması vardır:

1. ROS türlerinin tutulmasını ya da daha zayıf moleküllere dönüştürülerek etkisizleştirilmesini sağlayan temizleme etkisi (antioksidanlar ve mikromoleküller),
2. ROS türevlerine bir hidrojen aktararak etkilerinin ya da reaksiyon hızlarının azaltılmasına bağlı olan baskılama etkisi,

3. ROS türevlerinin lipit, protein ve DNA yapılarında oluşturdukları biyolojik hasarın onarım etkisi,
4. ROS türevlerinin bağlayarak, zincirlerini kırıp işlevlerinin engellenmesine bağlı olan zincir koparma etkisi (Valko ve ark., 2007).

Çizelge 1.1. Enzim yapıda olan birinci savunma antioksidanları.

BİRİNCİ SAVUNMA ANTİOKSİDANLARI	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit (O_2^-) radikalini temizler. **$O_2^- + 2H+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$**
Katalaz (CAT)	Yüksek konsantrasyondaki hidrojen peroksiti (H_2O_2) ortamdan uzaklaştırır. **$2H_2O_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$**
Glutatyon peroksidaz (GPx)	Düşük konsantrasyondaki hidrojen peroksiti (H_2O_2) ortamdan uzaklaştırır. **$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$** (**GSH**: Redükte glutatyon, **GSSG**: Okside glutatyon)

Çok sayıda çalışmada antioksidanların çeşitli faydaları olmasının yanısıra serbest radikaller ile antioksidanlar arasında ters korelasyon olduğu da vurgulanmıştır. Canlı sistemlerde antioksidan savunma ağını oluşturan antioksidanlar farklı düzeylerde hareket ederler. Bu düzeyler, radikalleri önleyici, radikalleri temizleyici ve radikallerden kaynaklanan hasar onarımı olabilmektedir. Hücrelerde birinci savunma antioksidanları, serbest radikallerin oluşumunu baskılayan veya önleyen bir antioksidanlar sistemidir (Çizelge 1.1). Serbest radikal veya diğer radikallerin üretimini tetikleme kabiliyetine sahip herhangi bir molekülü nötralize etmekte oldukça hızlılardır. Birinci savunma antioksidanları üç anahtar enzim içermektedir. Bunlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX) enzimleridir. Bu enzimler sırasıyla süperoksit radikalini bozar, hidrojen peroksitleri zararsız moleküllere (H_2O_2, alkol ve O_2) dönüştürmektedirler (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

Süperoksit dismutaz (SOD), hücrelerdeki ilk detoksifikasyon enzimi ve en güçlü antioksidandır. ROS türlerine karşı birinci basamak savunma sisteminin bir bileşeni olarak görev yapan önemli olan endojen bir antioksidan enzimdir. SOD, iki süperoksit anyon molekülünün ($\bullet O_2$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüştürülmesini katalizleyerek süperoksit anyonu daha az zararlı hale dönüştürmektedir. SOD, bir metaloenzimdir ve bu sebeple aktivitesi için bir metal kofaktöre ihtiyaç duymaktadır. Enzimin aktif bölgesindeki metal iyon türüne göre SOD'un üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlardan Cu-Zn-SOD (SOD 1), Mn-SOD (SOD 2) ve Cu-SOD (SOD 3)'tür (Dringen ve ark., 2005; Fridovich, 1995). SOD1 (Cu-Zn-SOD), neredeyse sadece hücre içi sitoplazmik boşluklarda bulunan bakır ve çinko içeren, zararlı süperoksit radikallerini moleküler O_2 ve H_2O_2'e dönüştüren bir homodimerdir. SOD2 (Mn-SOD), bir manganez içeren tetramer yapıdaki bu enzim aerobik hücrelerin mitokondrisinde bulunmaktadır ve hücre farklılaşmasında, tümorogenezisde ve pulmoner toksisite ile uyarılan hipokside rol oynamaktadır (Takada ve ark., 2002; Zelko ve ark., 2002). Mitokondride, O_2'nin H_2O'ya indirgenmesi sırasında toplam O_2 tüketiminin %1-2'lik kısmı H_2O_2 ve süperoksit gibi toksik türlerin oluşumuna neden olmaktadır. Mitokondride zamanla artan bu süperoksit radikalleri hasara sebep olmaktadır. ROS'un sebep olduğu bu hasarlar antioksidan savunma sistemleri ile dengelenmektedir (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Mitokondride oluşan süperoksit radikalleri ilk savunma olarak Mn-SOD (SOD 2) ve glutatyon peroksidaz (GPX) enzimleri tarafından bertaraf edilmektedir. Ancak H_2O_2'nun bir kısmı mitokondriden sitoplazmaya geçebilmektedir. Mitokondriden sitozole geçen H_2O_2 peroksizomlardan sentezlenen CAT enzimi tarafından detoksifiye edilmektedir. CAT, GPX'e göre daha kararlı H_2O_2 konsantrasyonlarını temizlemektedir. GPX daha düşük konsantrasyonlarda mitokondri ve bazen de sitozoldeki H_2O_2'yi parçalayabilmektedir (Radi ve ark., 1991). GPX1 hemen hemen her dokuda bulunan selenyum bağımlı bir antioksidandır (Fattman ve ark., 2003).

Hipoksi, yetersiz oksijen kaynağı nedeniyle dokunun metabolizmasında, fonksiyonunda ve morfolojik yapısında anormal değişikliklere neden olan patolojik bir süreçtir. Hipoksiye, artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin eşlik ettiği ve dolayısıyla oksidatif stresi tetiklediği bildirilmiştir (Smith ve ark., 2017). Hipoksi

indüklenebilir faktörü-1α (HIF-1α), hipoksiye hücresel yanıt olarak önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve hipoksik şartlarda aktive olur ve oksijen homeostazının geri kazanılmasına yardımcı olmaktadır (Carmeliet ve ark., 1998; Laderoute ve ark., 2006). Hipoksiye yanıt olarak hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi çeşitli süreçlerde yer alan yüzlerce genin transkripsiyonunu düzenlemektedir (Semenza, 2012). Çeşitli çalışmalar, HIF-1α'nın enerji üretimini oksidatif fosforilasyondan glikolize çoklu yollarla değiştirerek hücresel ROS üretimini azalttığını göstermiştir (Semenza, 2011). Hipoksiye yanıt olarak apoptoz indüklenebilir. Hipoksinin şiddeti, hücrelerin apoptotik hale gelip gelmediğini veya hipoksiye uyum sağlayıp hayatta kalacağını belirlemektedir. Besinlerden yoksun hipoksik bir ortam, hücrenin enerjiye bağlı apoptoz geçirmesini önler ve hücreler nekrotik hale gelir. Apoptoz düzenleyici proteinler hassas bir şekilde dengelenmiştir. Hücreler bu çevresel strese adapte olurlar ve böylece tekrarlanan hipoksi dönemlerinden sonra, hipoksinin neden olduğu apoptoza direnç için seçim meydana gelebilmektedir (Greijer ve Van Der Wall, 2004). Aynı zamanda hipoksi, HIF-1α aktivasyonu yoluyla iAKH çoğalmasını arttırığı ve tenosit farklılaşmasını arttırdığı bilinmektedir (Kakudo ve ark., 2015; Yang Yu ve ark., 2016).

Başlangıçta, MKH'ler düşük ROS seviyelerine ve başlıca hücresel antioksidan olan yüksek glutatyon seviyelerine sahiptir (Valle-Prieto ve Conget, 2010). Bununla birlikte, bazı raporlar, MKH'lerin düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve daha farklılaşmış hücre tiplerine kıyasla oksidatif strese daha duyarlı olduklarını ileri sürmektedir (Ko ve ark., 2011; Orciani ve ark., 2010). Genel olarak, artan ROS miktarı, MKH proliferasyonunu inhibe eder, yaşlanmayı artırır, adipojenikliği artırır, ancak osteojenik farklılaşmayı azaltır ve MKH immünomodülasyonunu inhibe eder (Denu ve Hematti, 2016). MKH'lerde aşırı ROS, kendi kendini yenilemeyi, farklılaşma kapasitesini ve proliferasyonu bozabilir (Alves ve ark., 2010; Choo ve ark., 2014; Ito ve ark., 2004; Ko ve ark., 2011; Meagher ve ark., 1988). Buna paralel olarak antioksidanlar MKH proliferasyonunu uyarır (Zou ve ark., 2004). MKH engraftmentini teşvik etmek ve doku onarımını geliştirmek için hem MKH'lerin kendi kültür genişleme üretim fazında hem de hasarlı doku mikro ortamında ROS'u azaltmak için MKH'leri manipüle etme yöntemlerini belirlemeye büyük ihtiyaç vardır. Bu

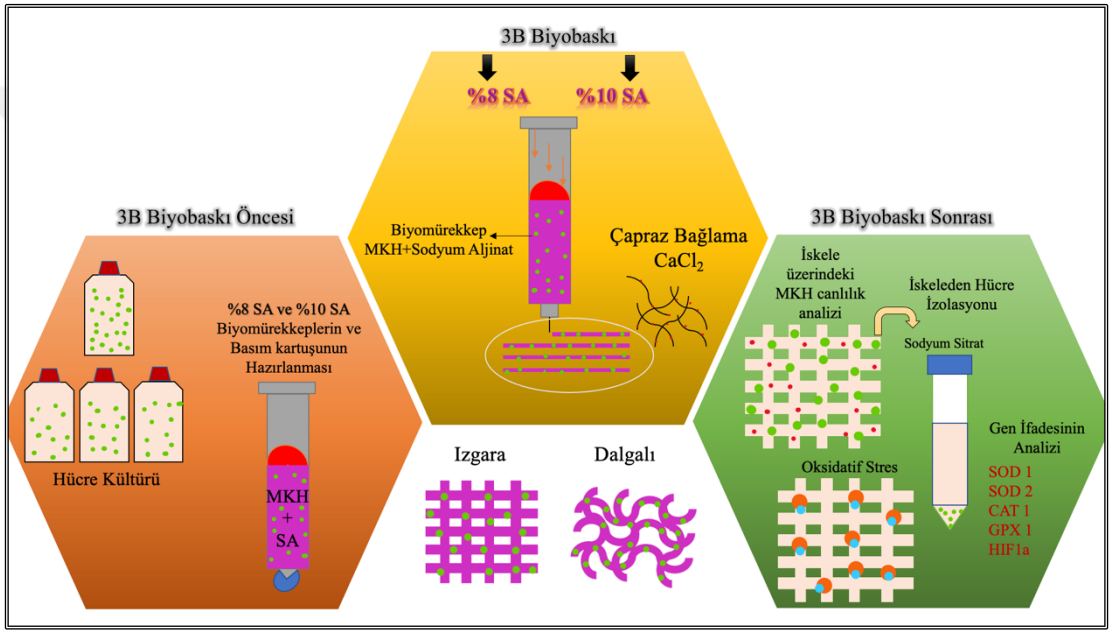
yüzden oksidatif stresin MKH biyolojisine katkılarının anlaşılmasını gerekmektedir (Denu ve Hematti, 2016).

Üç boyutlu biyobaskı, gelişimsel biyoloji, kök hücre bilimi, kimya, bilgisayar bilimi ve malzeme biliminden bilgi gerektiren disiplinler arası bir alandır (Lee ve Cho, 2016). Dolayısıyla, 3B biyobaskı, tüm üretim süreçlerinde çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır. Örneğin, hücre kapsüllenmiş materyaller, baskıdan önce depolama sırasında uzun süreler boyunca sıklıkla hücrelere zarar verebilecek kimyasal çapraz bağlayıcılara maruz kalır. Biriktirme sırasında, baskının kendisinin neden olduğu mekanik stres, hücre hasarına ve hücre fonksiyonunun kaybına neden olabilir (Miller, 2014). Yeni doku basıldıktan sonra, üç boyutlu yapı yoluyla hücrelere besin sağlamak özellikle basılı materyallerin küçük vaskülaritesi nedeniyle sınırlıdır (Muraoka ve ark., 2013). Üç boyutlu biyobaskı ile bir doku üretmek için öncelikle hücrelerin hassasiyeti ve korunması sağlanmalı böylece baskı işleminde hücrelerin hayatta kalması gerekir. Biyobaskıdan sonra da hücre canlılığı, kullanılan biyomürekkebin ve baskı işleminin türüne bağlı olarak değişebilmektedir (Fedorovich ve ark., 2008).

1.11. Tezin Amacı

MKH'ler, 3B biyobaskıda bir miktar başarı ile kullanılmış olsalar da tam olarak baskı potansiyellerine ulaşmaları için iyileştirilmesi gereken bazı durumlar vardır. ROS üretiminin ve/veya atılmasının biyobaskıda MKH'ler üzerindeki etkisini bilmek gerekmektedir. Oksidatif zorluklara karşı antioksidan koruma seviyesi, hala kök hücreler için eksiktir. Bununla birlikte mevcut 3B biyobaskı teknolojisiyle ilgili de çeşitli zorluklar bulunmakta ve olası çözümler araştırılmaktadır. Gelişiminin erken aşamalarında olmasına rağmen, 3B biyobaskı teknolojisinin potansiyel faydaları oldukça fazladır ve yakın gelecekte biyomedikal, eczacılık ve diğer bazı alanlarda yeni kapılar açması beklenmektedir. Üç boyutlu biyobaskı teknolojisinde etkin bir şekilde MKH'lerin kullanılabilmesi için hücre canlılığına etkisi ve MKH'lerde yarattığı oksidatif stres etkisinin daha kapsamlı çalışılması ve anlaşılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, 3B biyobaskı ile hücreli iskele basımında kullanılan aljinat biyomürekkep konsantrasyon farkı ve biyobaskı desen farklarının insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (iAKH) üzerinde oksidatif stres etkisinin gösterilemesi amaçlanmaktadır (Şekil 1.9). Tezden elde edilecek sonuçlar doğrultusunda DM ve yenileyici tıp alanında hasarlı veya yaralı dokuların onarımı ve yenilenebilmesi amacıyla 3B biyobaskı teknolojisi kullanılarak 3B doku iskelelerinin etkili üretimi ve kullanımı için daha fazla bilgi edinebilmesi ve yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesi bakımından önem taşımaktadır.



Şekil 1.9. Tez çalışma planı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Çizelge 2.1. Tez çalışmasında kullanılan gereçler.

Gerecin Kullanıldığı Yöntemler	Gereç Adı ve Katalog Numarası
Hücre Kültürü	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (1X) [+] 4,5g/L D-Glucose [+] 4mM L-Glutamine [-] Sodium Pyruvate (LOT: 2025465, REF: 01-052-1A, BI Biological Industries) Fetal Sığır Serumu (FBS) (Fetal Bovine Serum) (LOT: 08F0597K, REF: 10500-064, Gibco) Penisilin/Streptomisin (Pen-Strep) [+] 10,000 Units/mL Penicilin [+] 10,000 ug/mL Streptomycin (LOT: 1741837, REF: 15140-122, Gibco) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (1X) [-] Calcium [-] Magnesium (LOT: 2044855, REF: 02-023-1A, BI Biological Industries) %0,05 Trypsin-EDTA (1X) (LOT: 1945195, REF: 25300-054, Gibco) Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) (Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-Basic) [Amino Acid 1-155] Lyophilized (LOT: 1898343, REF: PHG0264, Gibco)
Üç Boyutlu Biyobaskı	Sodium Alginate (W201502-1Kg) (LOT: MKCC4541, CAS NO: 9005-38-3, Sigma Aldrich) Calcium chloride dried powdered BioChemica ($CaCl_2$ M=110,99g/mol) (LOT: 4B008868, CAS NO: 10043-52-4, AppliChem Panreac)
Hücre Sayımı ve Canlılık Analizi	LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit (LOT: 2015555, REF: L3224, Thermo Fisher Scientific)

Oksidatif Stres Analizi	CellROX™ Deep Red Reagent (LOT: 1874026, REF: C10422, Thermo Fisher) Fluoroshield Mounting Medium With DAPI (LOT: GR3221112-2, Sigma Aldrich)
Hücre İzolasyonu	Sodium Citrate (6431-1Kg) ($C_6H_5Na_3O_7$•5,5H_2O M=357,16g/mol) (CAT NO: 203 A630831)
Ribonükleik Asit (RNA) İzolasyonu	NucleoSpinRNA Mini Kit (LOT: 1706/004, REF: 740955.50, Macherey-Nagel) 2-Mercaptoethanol (Cat. No: 31350-010, Gibco)
Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit (cDNA) Sentezi	iScript™ cDNA Synthesis Kit (Cat. No. #170-8891, BIORAD)
Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	Sso Advanced™ Universal SYBR® Green (Cat. No. #172-5271, BIORAD)

2.2. Yöntem

Bu tez çalışması için gerekli olan EnvisionTec 3D Bioplotter cihazı Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü tarafından temin edilmiş olup tez çalışması için Çizelge 2.1'deki gereçler seçilerek planlanan deneyler Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Araştırma Laboratuvarı bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. Hücre Kültürü

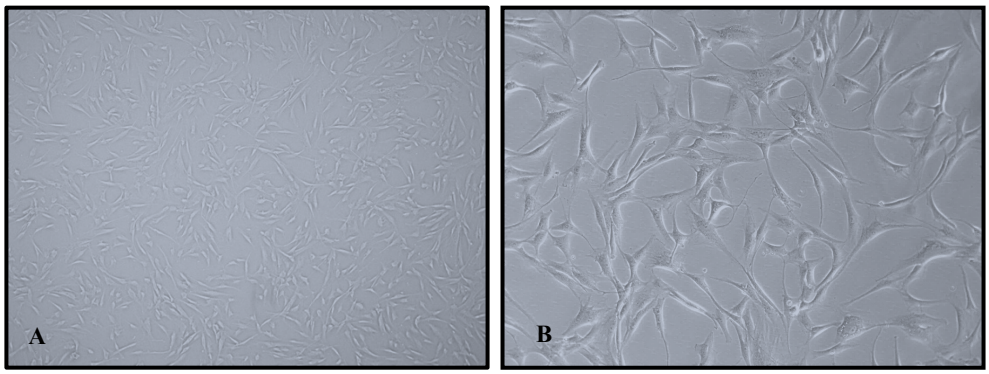
2.2.2. Hücre Çözdürme ve Kültürün Hazırlanması

Tez çalışması için kullanılan insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler LONZA'dan ticari olarak tedarik edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan iAKH ile ilgili bilgiler aşağıdadır:

- Hücre: İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAKH)
- ≥1 milyon hücre içeren 1 x cryo tüp iAKH
- Mezenkimal Besiyeri Ortamının içeriği: DMEM, %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 nanogram/mililitre (ng/ml) FGF

Satın alınan hücreler, kullanılmadıkları zaman boyunca sıvı azot tankında uygun koşullarda saklanmaktadır. Hücreler kültürleneceği zaman, hücreleri osmotik şoktan korumak için sıvı azot tankından çıkap hızlı bir şekilde çözdürmek gerekmektedir. Sıvı azot tankından çıkarılan cryovial tüp içerisindeki dondurulmuş iAKH, su banyosunda çözdürülmüştür. Daha sonra tüpün etrafı, olası bir kontaminasyonu önlemek amacıyla kurulanıp, etanolle silinmiştir. Cryovial tüp, Laminar sınıf II kabin içerisine steril olarak alınmıştır. Cryovial tüp içerisindeki iAKH, serolojik cam pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüpe alınmıştır. +4 santigrat derece (°C)'de stoklanan mezenkimal besiyeri (DMEM, %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF), önceden su banyosunda 37°C'de ısıtılmıştır. Cryovial tüp içerisindeki hücrelerin kalan içeriği de iyice 1 ml besiyeri ortamı ile yıkanarak alınıp falkon tüpe aktarılmıştır. Daha sonra, 4-5 ml mezenkimal besiyerinden alınarak yavaş yavaş falkon tüp içine alınmış hücrelere eklenmiştir. Falkon tüpteki hücre ve mezenkimal besiyeri içeriği 300 x g'de 5 dakika (dk) santrifüj edilmişir. Tüpteki süpernatant kısım aspire edilerek atılmıştır. Hücre pelleti, çok sert olmayacan şekilde vurularak homojen bir şekilde çözdürülmüştür. Pellet üzerine yavaş bir şekilde 15 ml taze mezenkimal besiyerinden eklenmiş ve süspanse haldeki hücreler T-75 santimetrekare (cm^2) kültür kabına alınmıştır. Hücre

kültür kabı ZEISS marka inverted (ters ışık) mikroskopta kontrol edildikten sonra %5 karbondioksit (CO_2) ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırılmıştır.



Şekil 2.1. İki boyutlu kültürde iAKH'nin görünümü (A) 5X, (B) 10X.

2.2.3. Hücre Kültürünün Pasajlanması

Kültürlerde çoğalan hücrelerin içinde bulundukları mezenkimal besiyerindeki besinleri büyük ölçüde tükettiklerinde ya da üreme ortamındaki kültür kabı yüzeyinin tamamını kullanarak sıkışık (konfluent) duruma geldiklerinde çoğalma hızları düşer ve kültür kabında artık yeterince yer kalmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizmadan dolayı zamanla tamamen durur. Bu dönemde, metabolik atıklardan uzaklaştırmak, kültürün büyümesi ve hücrelerin çoğalarak yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesini sağlamak amacıyla kültürün pasajlanması gerekmektedir (Şekil 2.1).

İnkübatörde kültüre edilen hücrelerin yoğunluğu yaklaşık %70-80'e ulaşınca pasajlama işlemi yapılmıştır. Kültür kaplarındaki ortam içeriği olan eski besiyeri aspire edilmiştir. Hücreler, 6-7 ml DPBS (1X) ile yıkanmıştır. Böylece ortam serum içeriğinden, metabolik atıklardan ve ölü hücrelerden temizlenmiştir. DPBS aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra kültür kabı yüzeyinde yapışık bulunan hücreleri kaldırıp süspanse hale getirmek amacıyla 1,5 ml olacak şekilde tripsin-EDTA ile kültür kabı yüzeyi tamamen kaplanmıştır. Tripsin enziminin aktive olabilmesi için kültür kabı inkübatöre alınarak 1-2 dk inkübe edilmiştir. İnkübatörden çıkarılan kültür kabına hafifçe vurularak hücreler kültür kabı yüzeyinden tamamen kaldırılmıştır.

Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı ters ışık mikroskobundan bakılarak kontrol edilmiştir. Tripsin aktivasyonunu durdurmak için hücrelerin üzerine 4,5 ml besiyeri (tripsin-EDTA üç katı) eklendikten sonra pipetaj yapılmıştır. Homojen hale gelmiş olan hücre süspansiyonu ihtiyaca göre yeni bir kültür kabına ekimi yapılmış veya atılmıştır. Pasajı yapılan kültür kaplarına alınmış olan hücre süspansiyonlarının üzerine 12-13 ml yeni taze besiyeri eklenmiştir. Kültür kabı kapağı kapatıldıktan sonra kabın üzerine hücre adı, pasaj sayısı, pasajlama oranı ve tarih not edilmiştir. Son olarak ise, kültür kabı ZEISS marka inverted (ters ışık) mikroskopta kontrol edildikten sonra %5 CO_2 ve 37°C koşullarındaki inkübatöre kaldırılmıştır.

2.2.4. Hücre Sayımı ve Canlılığı

Yapılacak çalışmalarda uygun hücre miktarının tespit edilebilmesi için hücre sayımı yapılmaktadır. Hücre sayımı için, manuel sayım yapılan en genel metot olan hemositometre kullanılmaktadır. Bu metot, iki bölmeye ayrılmış 1x1 mm boyutunda 9 kareden oluşan düz ve kalın, sayım odacıklı lam üzerine lamel konması ile uygulanmaktadır. Hemositometre ve lamel öncelikle saf su sonra etanolle silinerek temizlenmiştir. Hemositometre üzerine lamel kapatılmıştır.

Çizelge 2.2. Hemositometre metodu ile hücre sayımı hesaplama.

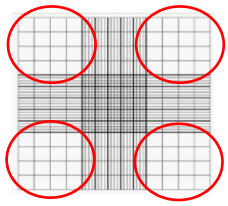
$X = (A/4) \times DF \times 10^4 \times T$

X = Toplam hacimdeki hücre sayısı

A = Sayılan 4 alandaki toplam hücre sayısı

T = Toplam Hacim

DF = Dilüsyon faktörü



Örnek: 10 ul hücre süspansiyonunu 30 ul besiyeri ile ekleyerek dilüe ettiğinizde DF = 4'tür (1:4).

Pasaj için kültür kabından kaldırılmış hücre süspansiyonu, pasaj yapılmadan önce pipetaj yapılarak homojen bir hücre dağılımı olmasına dikkat edilmiştir. Daha sonra sayım için lamel kapalı hemositometreye 10 mikrolitre (µl) hücre süspansiyonu eklenmiştir. Hücre süspansiyonu, lam lamel arasına doldurulduktan sonra ZEISS marka inverted (ters ışık) mikroskop altında gözlenmiş ve seçilmiş 4 bölgedeki kare

çizgiler içindeki hücreler sayılmıştır. Sayılan toplam hücre sayısı 4 bölgede sayıldığı için 4'e bölünerek ortalaması alınmıştır. Son olarak hesapta çıkan hücre sayısı 10^4 ile çarpılmış ve 1 ml'deki hücre sayısı elde edilmiştir. Ne kadar hücre ekilmek isteniliyorsa, miktarı bu sayıma göre hesaplanmıştır (Çizelge 2.2).

Hücre Canlılığı için, kontrol grubu olarak T-75 kültür kabındaki aderan iAKH'lere 1. ve 7. gün sonunda ticari olaran tedarik edilen Thermo Fisher Scientific LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity kit protokolü uygulanarak floresan boyama yapılmıştır. Kültür kabındaki besiyeri içeriği aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Aderan (yüzeye yapışık) hücreler üzerine 6-7 ml DPBS eklenerek yıkama işlemi yapıldıktan sonra DPBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Kit protokolü karanlık ortamda çalışılmak üzere, kit içerisinde bulunan Calcein-AM ve Ethidium homodimer-1 (EthD-1) içerikleri önceden oda sıcaklığına çıkarılmıştır. Protokole göre;

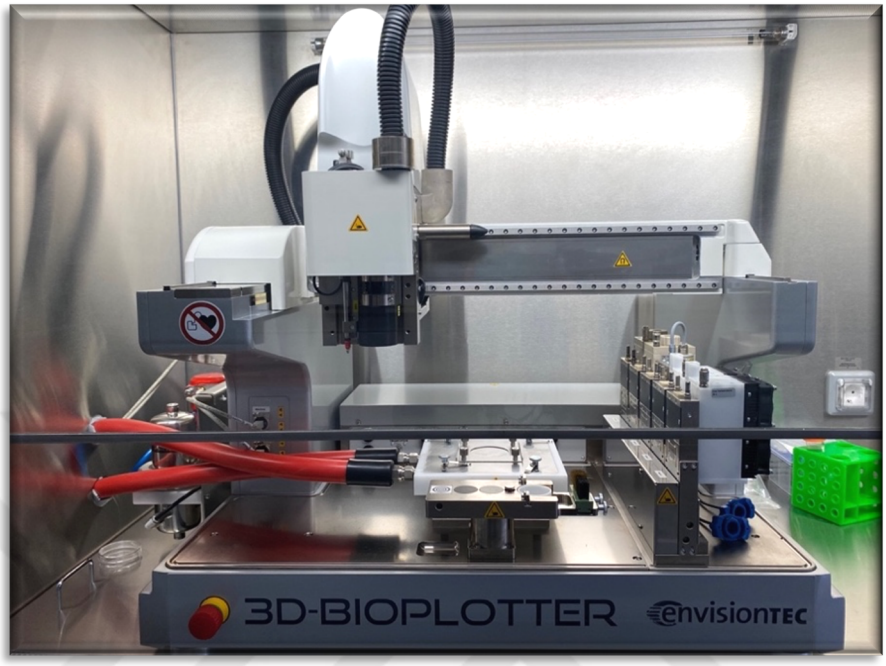
- 2,5 ml DPBS
- 5 µl Ethidium homodimer-1 (EthD-1)
- 1,25 µl Calcein-AM

15 ml falkon tüp içerisine alınarak vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. DPBS ile yıkanmış hücreler üzerine yüzeyi kaplayacak şekilde kit karışımı eklenmiştir. Karanlık, oda sıcaklığında (20-25°C) 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra boyanan hücreler EVOS marka floresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir.

2.2.5. Üç Boyutlu Biyobaskı

Doku mühendisliği ve üretim ortamında kullanılmak üzere tasarlanmış bir araç olan çok yönlü 3B biyobaskı için EnvisionTec 3D Bioplotter Manufacturer biyoyazıcısı kullanılmıştır (Şekil 2.2). Bu biyoyazıcı, bir yazılım ile bütün baskı parametrelerinin (sıcaklık, hız, basınç vb.) tam olarak kontrol edilmesini, iğne kalibrasyonu ve uygun baskılar sağlamak için dahili bir kamera sistemi, sıcaklık kontrolü için platform ve sensör portları, daha fazla malzeme çeşitliliği ve ince ayarlı

ortamlar sağlamaktadır. Bir yapıda en fazla 5 materyali kartuş yuvaları sayesinde, ultraviyole (UV), ısıtılmış ve soğutulmuş platform seçenekleriyle kullanabilmektedir.



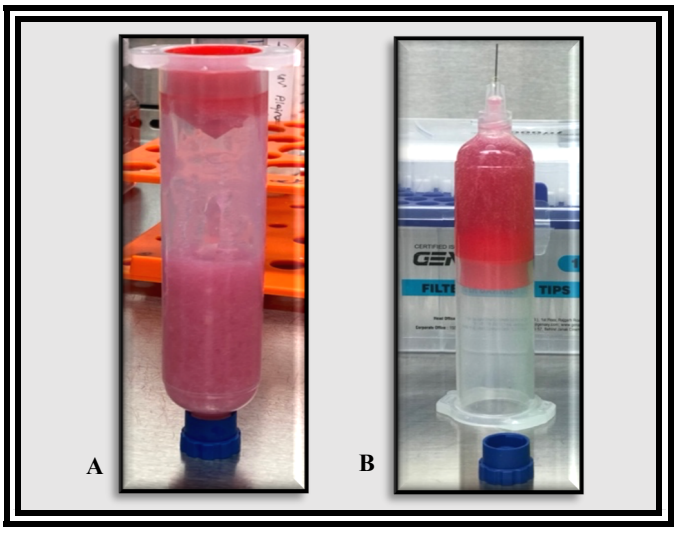
Şekil 2.2. Üç boyutlu biyobaskı için kullanılan EnvisionTec 3D Bioplotter Manufacturer biyoyazıcısı.

2.2.6. Biyomürekkebin Hazırlanması

Polimer çözeltiler ve canlı hücreler birlikte biyomürekkebi oluşturmaktadır. Biyomürekkep hazırlanırken %8 ve %10 olmak üzere iki farklı SA konsantrasyonu ve her bir kartuş için yaklaşık 8 milyon hücre/ml kullanılmıştır. Bununla birlikte %8 ve %10'luk iki farklı konsantrasyonda iki biyobaskı kartuşu hazırlanmıştır (Şekil 2.3). Üç boyutlu biyoyazıcı ile uygun baskı planı için yeterli biyomürekkep miktarı en az 20 mL olarak optimize edilmiştir. Bu optimizasyona göre,

- 20 ml %8'lik biyomürekkep çözeltisi için 1,6 g toz SA tartılmıştır.
- 20 ml %10'luk biyomürekkep çözeltisi için 2 g toz SA tartılmıştır.

Toz haldeki sodyum aljinat (SA), iki farklı konsantrasyon için tartıldıktan sonra steril bir petri içine alınarak steril bir ortam olan laminar sınıf II kabin içerisine alınarak 1 saat ultraviyole (UV) ile sterilize edilmiştir. Hücre ekili olan kültür kabı kabin içerisine alınmış içerisinde bulunan besiyeri ortamı aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 6-7 ml DPBS ile 1 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. DPBS aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra T-75 kültür kabı içine 1,5 ml tripsin yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde eklenmiş ve %5 CO_2 ve 37°C koşullarındaki inkübatörde 1-2 dk inkübasyona bırakılmıştır. Tripsin ile yüzeyden kaldırılan hücrelerin üzerine 4,5 ml (tripsinin üç katı) mezenkimal besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu pipetaj ile homojenize edilmiş ve hemositometre metodu ile hücre sayımı yapılmıştır. Bu şekilde yaklaşık 8 milyon hücre/mL biyomürekkep hazırlığı için süspanse hale getirilmiştir. Steril toz SA 50 ml'lik steril falkon tüp içerisine alınmıştır. Üzerine 3-4 ml mezenkimal besiyerinden eklenmiş ve otoklavda önceden sterilize edilmiş metal bir spatül yardımıyla karıştırılarak toz haldeki SA viskoz hale getirilmiştir. Daha sonra 8 milyon hücre/ml viskoz haldeki SA üzerine eklenerek total hacim 20 ml'e mezenkimal besiyeri ile tamamlanmıştır. 20 ml'lik hazırlanmış hücre+SA biyomürekkebi spatül yardımıyla EnvisionTec 3D Bioplotter Manufacturer biyoyazıcısı için tasarlanmış düşük sıcaklık (0°-70°C) baskı kafasına uygun tek kullanımlık steril veya önceden otoklavlanarak sterilize edilmiş polietilen (PE) kartuşlara aktarılmıştır. Tek kullanımlık veya UV ile sterilize edilmiş ve biyoyazıcı için tasarlanmış olan mavi vidalı kapak kartuş ucuna takılmış ve kırmızı piston kapaklar da kartuş içine hava kabarcıkları kalmayacak şekilde itilerek yerleştirilmiştir.



Şekil 2.3. Biyomürekkep (SA+iAKH) doldurulmuş (A) 3B biyoyazıcı kartuşu ve 0,20 mm baskı iğne adaptör (Needle) (B).

2.2.7. Üç Boyutlu Biyobaskı ve Çapraz Bağlama

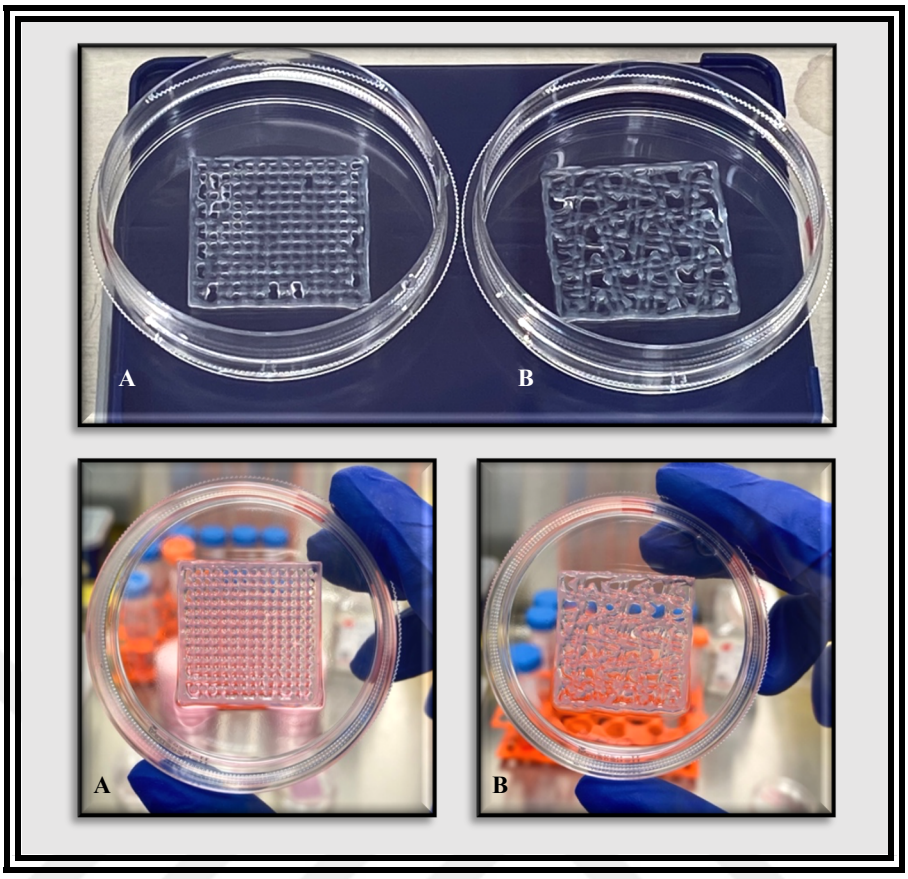
Biyomürekkep hazırlanıp steril kartuş içine alındıktan sonra mavi vidalı kapak çıkarılarak kartuş ucuna 0,20 mm iğne adaptör (needle) takılmıştır. Son olarak hazırlanmış olan kartuş 3B biyoyazıcının kartuş yuvasına yerleştirilmiştir. Basım merkezine 60 milimetre (mm) steril petri kapağı açılarak yerleştirilmiş ve biyoyazıcı bilgisayarındaki yazılımdan kalibrasyon yapılmıştır. Daha sonra kartuş yuvasının pozisyonu iğne temizleme istasyonuna alınarak iğne adaptörün ucundaki temiz akış kontrol edilmiştir. Basım için ızgara ve dalgalı olmak üzere iki farklı desen projesi biyoyazıcının programından önceden tasarlanmıştır. Tasarlanan desen projesi biyoyazıcı yazılımına yüklenip yazılım arayüzünden seçilmiştir. Üç boyutlu biyobaskı için biyoyazıcı yazılımından manuel olarak kontrol edilen parametrelerin (sıcaklık, basınç, hız vb.) 27°C, 4 bar, 8 mm/s ayarlaması yapılarak basıma başlanmıştır. Viskoz SA+hücre biyomürekkebi, biyoyazıcı mikro ekstrüzyon yöntemi ile hareket eden kartuş yuvasıdaki iğne ucundan basınç yardımıyla petri üzerine şeritler halinde akarak yazdırılmaktadır (Şekil 2.4). Desen projesinin önceden seçimi sayesinde, bir sonraki katman yazılırken şeritlerin yönü, mekanik özelliği ve matematiksel tanımlanmış gözenekleri istenilen şekilde yönlendirilmiş ve istenilen örgü yapı oluşturulmuştur. Aynı hazırlık ve basım protokolleriyle SA konsantrasyonu ve biyoyazıcı programı

arayüzünden desen projesi değişikliği yapılarak sırasıyla %8'lik ızgara ve dalgalı, %10'luk ızgara ve dalgalı desenleri 3B olacak şekilde katman katman, bir iskelede toplamda beş katman olacak şekilde basılmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.4. Üç boyutlu biyoyazıcıdan iskele basımı.

Baskı sonrası iskelelerin uzun vadeli stabilitesi, için ikincil bir çapraz bağlama gerekmektedir. Beş katmanlı basılmış her bir iskelenin üzerini kapatacak kadar yaklaşık 1-2 ml önceden hazırlanmış ve 0,20 µm filteden geçirilmiş steril 100mM kalsiyum klorür ($CaCl_2$) eklenerek 15 dk bekletilmiştir. Böylece viskoz halde basılan iskelenin baskı şeklini koruyabilmesi için iyonik zincirler arası köprüler oluşturarak çok değerlikli bir katyon (Ca^{2+}) özelliği gösteren $CaCl_2$ ile hızlı bir polimerleşme sağlanmıştır. Sonrasında, petriden $CaCl_2$ aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. İskele, üzerini kapatacak kadar 1-2 ml DPBS eklenip 1-2 kez iyice yıkanarak $CaCl_2$ uzaklaştırılmıştır. DPBS aspire edildikten sonra iskele üzerine önceden su banyosunda (37°C'de) ısıtılmış 2 ml mezenkimal besiyeri eklenmiştir. Petri üzerine tarih, SA konsantrasyonu, baskı deseni ve hücre adı mutlaka not edilmiştir. Son olarak petri %5 CO_2 ve 37°C koşullarındaki inkübatöre kaldırılmıştır.



Şekil 2.5. Üç boyutlu biyobaskı sonrası 3B iskele desenleri. (A) Izgara, (B) Dalgalı.

2.2.8. Üç Boyutlu İskelelerin Mezenkimal Besiyeri Değişimi

Basım sonrası inkübatöre kaldırılan ve 7. gün analizleri için inkübe edilmiş 3B iskeleleri fazla metabolik atıklardan arındırmak ve hücrelerin çoğalarak yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesini sağlamak için 3. günde besiyeri değişimi yapılmıştır. Petrideki eski besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. İskele üzerini kapatacak kadar 1-2 ml DPBS eklenerek 1-2 kez iyice yıkanmıştır. Daha sonra DPBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Su banyosunda (37°C'de) önceden ısıtılmış olan taze mezenkimal besiyeri eklenerek petri tekrar %5 CO_2 ve 37°C koşullarındaki inkübatöre kaldırılmıştır.

2.2.9. Üç Boyutlu İskelelerde Floresan Boyama

Basım sonrası inkübatöre kaldırılan %8 ve %10 SA konsantrasyonlarındaki ızgara ve dalgalı desenli 3B iskeleler içine kapsüllenmiş iAKH'lerin canlılık analizi için basımın 1. günü ve 7. günlerinde her bir deney grubu için ayrı ayrı, ticari olaran tedarik edilen Thermo Fisher Scientific LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity kit protokolü uygulanarak floresan boyama yapılmıştır.

Petrideki besiyeri içeriği aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. İskele üzerini kapatacak kadar 1-2 ml DPBS eklenerek iyice yıkama işlemi yapıldıktan sonra DPBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Kit protokolü karanlık ortamda çalışılmak üzere, kit içerisinde bulunan Calcein-AM ve Ethidium homodimer-1 (EthD-1) içerikleri önceden oda sıcaklığına çıkarılmıştır. Protokole göre;

- 2,5 ml DPBS
- 5 µl Ethidium homodimer-1 (EthD-1)
- 1,25 µl Calcein-AM

15 ml falkon tüp içerisine alınarak vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. DPBS ile yıkanmış iskele üzerini kapatacak kadar 1-2 ml kit karışımı eklenmiştir. Karanlık, oda ısısında (20-25°C) 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra boyanan iskeleler EVOS marka floresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir. Calcein-AM (yeşil) ile boyanmış canlı hücreleri ve EthD-1 (kırmızı) ile boyanmış ölü hücreleri ifade etmektedir.

2.2.10. Üç Boyutlu İskelelerde Oksidatif Stres Boyama

Üç boyutlu biyobaskıda, biyomürekkebin %8 ve %10'luk SA konsantrasyon farkı ve biyoyazcıdan baskı sırasındaki ızgara ve dalgalı desen farkının 1. ve 7. günlerde iAKH'lerdeki oksidatif stresi üzerine etkisinin tespiti için CellROX™ Deep Red Reagent kiti kullanılmıştır. Petri içindeki mezenkimal besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. İskele üzerini kapatacak kadar 1-2 ml DPBS eklenip 1-2 kez iyice

yıkandıktan sonra DPBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Kit protokolü karanlık ortamda çalışılmak üzere, kit içerisinde bulunan CellROX® Deep Red Reagent içeriği önceden oda sıcaklığına çıkarılmıştır. Protokole göre;

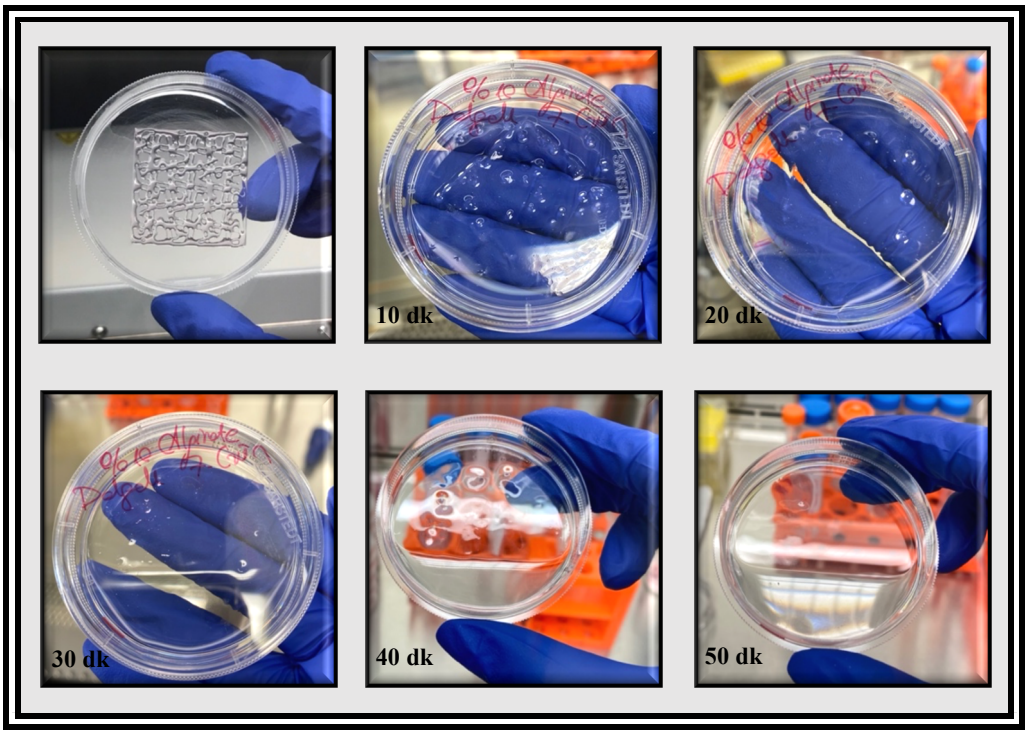
- 3 ml DPBS
- 6 µl CellROX® Deep Red Reagent (5 µM)

15 ml falkon tüp içerisine alınarak vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. DPBS ile yıkanmış iskele üzerini kapatacak kadar 1-2 ml kit karışımı eklenmiştir. Petri %5 CO_2 ve 37°C koşullarındaki inkübatörde 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra kit karışımı aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. DPBS ile üç kez iyice yıkama yapılmıştır. Son yıkamadan sonra DPBS aspire edilmiştir. İskele üzerine üzerini kapatacak kadar soğuk metanol eklenip -20°C'de 15 dk fikse edilmiştir. Tekrar DPBS ile 1 kez yıkanmıştır. DPBS aspire edildikten sonra iskele üzerine hücre çekirdeğini de boyayarak görüntülemek için DAPI damlatılmıştır. Boyanan iskeleler EVOS marka floresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir. DAPI hücre çekirdeğinde mavi renkte, CELLROX ise ROS varlığında sitoplazmada kırmızı renkte floresan göstermektedir.

2.2.11. Üç Boyutlu İskeleden Hücre İzolasyonu

%8 ve %10'luk SA konsantrasyonlarındaki ızgara ve dalgalı desenli iskelelerden, basım sonrası 1. gün ve 7. günlerinde her bir deney grubundan gen ifadesinin analizi için hücre izolasyonu yapılmıştır (Şekil 2.6). Petri içindeki mezenkimal besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. İskele üzerini kapatacak kadar 1-2 ml DPBS eklenip 1-2 kez iyice yıkanmıştır. DPBS aspire edildikten sonra SA iskele içindeki kapsüllenmiş hücrelerin izolasyonu için iskele üzerini iyice kapatacak kadar 2 ml önceden hazırlannmış ve 0,20 µm filteden geçirilmiş steril 155mM sodyum sitrat çözeltisi eklenmiştir (de Camargo Bittencourt ve ark., 2009). Petri %5 CO_2 ve 37°C koşullarındaki inkübatörde 50 dk inkübe edilerek hücreleri kapsülleyen SA'ın çözünmesi ve hücrelerin serbest kalması sağlanmıştır (Wu ve ark., 2016). Daha sonra petrilerdeki hücre süspansiyonu 15 ml falkona toplanmış ve 300 x g'de 5 dk

santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatant kısım aspire edilerek atılmıştır. Hücre pelleti, çok sert olmayacak şekilde vurularak homojen bir şekilde çözdürülmüştür. Pellet üzerine, RNA izolasyonu için kullanılan Macherey-Nagel marka NucleoSpinRNA Mini Kit içeriğindeki, kit prosedürüne göre içerisine 250 µl 2-Merkaptoetanol eklenmiş olan liziz solüsyonundan 350 µl eklenmiştir. Son olarak, RNA izolasyonunun hemen yapılacağı durumlarda kit protokolü uygulanmıştır. Ancak, RNA izolasyonunun hemen akabinde yapılamayacağı durumlarda mikrosantrifüj tüpüne (ependorf) alınarak -20°C koşullarında saklanmıştır.



Şekil 2.6. Üç boyutlu biyobaskı sonrası Sodyum Sitrat (155mM) ile muamele edilmiş iskelenin 50 dk boyunca çözünme aşamaları.

2.2.12. Ribonükleik Asit (RNA) İzolasyonu

Üç boyutlu iskeleden hücre izolasyonu yapıldıktan sonra pellet üzerine, RNA izolasyonu için kullanılan Macherey-Nagel marka NucleoSpinRNA Mini Kit içeriğindeki, kit prosedürüne göre içerisine 250 µl 2-Merkaptoetanol eklenmiş olan liziz solüsyonundan 350 µl eklenerek hücre liziz işlemi yapılmıştır. Liziz edilmiş olan

hücrelerden NucleoSpinRNA Mini Kit protokolü kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA kolayca parçanabildiğinden RNA izolasyon basamakları buz dolu köpük kutu içerisinde çalışılmıştır. Uygulanan protokol işlemleri;

- Liziz edilen hücreler mor rengindeki kolonlu tüplere alınarak 11.000 x g'de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Mor kolonlu filtreler atılmıştır. Tüp içeriğine 350 µl %70'lik etanol eklenip, pipetaj işlemi yapılmış sonrasında vortekslenmiştir. Sonrasında açık mavi rengindeki kolonlu tüplere alınarak 11.000 x g 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü atılarak açık mavi kolonlu filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Açık mavi renkteki filtre üzerine 350 µl MDB (membrane desalting buffer) eklendikten sonra 11.000 x g'de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Daha sonra filtre üzerine 95µl rekombinant deoksiribonükleaz (rDNase) karışımı eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Son 1 dakika içerisinde ise, 11.000 x g'de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Toplama tüpü atılarak açık mavi kolonlu filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Yıkama ve kurutma basamağına gelindiğinde 200 µl RAW2 eklenerek 11.000 x g'de 30 saniye santrifüj işlemi yapılmıştır. Sonrasında 600 µl RA3 eklenmiş ve 11.000 x g 30 saniye santrifüj işlemi yapılmıştır. En son basamak olarak ise 250 µl RA3 eklenerek 11.000 x g 2 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Her yıkama işleminden sonra birikmemesi için toplama tüpü atılarak açık mavi kolonlu filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- RNA izolasyonun son aşaması olarak mikrosantrifüj (ependorf) tüp içine yerleştirilmiş açık mavi renkli kolonlu filtre üzerine 50 µl RNase-free su ilave edilerek 11.000 x g 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Verimli izolasyon işlemi için bu aşama 2 defa yapılmıştır.
- Elde edilmiş olan RNA örnekleri tarih ve örnek adı yazılarak etiketlemesi yapılmış ve tüplere alınarak -20°C'ye kaldırılmıştır.

2.2.13. Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit (cDNA) Sentezi

İki boyutlu kültürde 1. ve 7. günlerinde 2 kontrol grubu iAKH'lerin ve 3B biyobaskıda %8 ve %10'luk SA konsantrasyonlu ve ızgara ve dalgalı desen farkı olan iskelelerden 1. ve 7. günlerinde toplam 8 deney grubu iAKH'lerin hücre izolasyonu yapıldıktan sonra RNA izolasyonu yapılmıştır.

İzolasyonu yapılmış olan RNA örnekleri, NanoDrop cihazında nükleik asit derişimi (ng/µl) ve saflık ölçümü yapılmıştır. RNA miktar hesabı, 500 ng/sonuçta çıkan ölçümün derişim miktarı şeklinde hesaplanmaktadır. Çıkan sonuç 15 µl'den büyükse 15 µl'nin tamamı alınmaktadır. Küçükse 15 µl'ye tamamlanacak şekilde RNase-free su eklenmektedir. Elde edilmiş olan RNA örnekleri ticari olarak satın alınmış olan iScript cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Örnek başına kit içindeki reaksiyon karışımından 4 µl, enzimden ise 1 µl alınarak mikrosantrifüj tüpünde toplanmıştır. Tüpteki cDNA sentez karışımdan alınarak 96 kuyucuklu (saydam) plaka kuyucuklarına örnek sayısı kadar 5 µl porsiyonlanmıştır. Üzerlerine her kuyucuk için toplam hacim 20 µl olacak şekilde hesaplanan RNA miktarları eklenmiştir. RNA ve cDNA sentez karışımı eklenerek hazırlanmış 96 kuyucuklu (saydam) plaka, Bio-Rad CFX Connect Real Time System cihazında bulunan iScript cDNA Synthesis Kit'ine ait protokol seçilerek inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon: 25dk 25°C; 30dk 42°C; 5dk 85°C; 5dk 4°C'de gerçekleşmiştir. Sonuçta sentezlenmiş olan cDNA'lar, 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere alıp tarih, örnek adı yazılarak etiketlenmiştir. cDNA sentezine alınan örneklerden RNA miktarı çok olanların sentezlenen cDNA'ları 1:2 oranında RNase-free H_2O ile seyreltilmiştir. Son olarak sentezlenmiş cDNA'lar, -20°C'de saklanmıştır.

2.2.14. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Tez çalışmasında kullanılmış olan primerler Oligomer (SOD1, SOD2, CAT1, GPX1 HIF-1α primerleri) ve Metabion (GAPDH primeri) firmalarından satın alınmıştır. Kullanılmış olan primerlerin dizin bilgisi Ek 1 'de yer almaktadır. Ticari

olarak satın alınmış olan liyofilize primerler iyonize su ile sulandırılmış (firma tarafından primerlerin üzerinde belirtilen miktarlar) ve son derişim 5 pmol/µl olacak halde ana stok oluşturulmuştur. qRT-PCR için ticari olarak satın alınmış olan SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix protokolüne göre reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. qRT-PCR ışık almayan ortamda çalışılmıştır. Protokole göre her gen için karışım miktarı; SYBR Green'den 10 µl, dH_2O'den 6 µl, ileri (forward) primer'den 1 µl, geri (reverse) primer'den 1 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Yukarıda bulunan karışım qRT-PCR'ın oluşmasını sağlayacak olan reaksiyonun karışımıdır. 96 kuyucuklu (saydam) plakadaki her bir kuyucuğa 18µl konacak şekilde hazırlanmış olan bu karışımdan eklenmiştir. Bu kuyucukların üzerine ise cDNA örneklerinden 2µl eklenmiştir. Her kuyucuğun toplam son hacmi 20 µl olmaktadır. Bio-Rad cihazında bulunan SSO Advanced SYBR protokolü seçilmiş ve inkübasyon yapılmıştır. Denatürasyon sonrasonda primer bağlanması ve uzama basamakları gerçekleşmiştir. İnkübasyondaki her döngü: 30s 95°C; 10s 95°C; 30s 60°C şeklinde tamamlanmıştır. Primer bağlanma ve uzamanın basamakları reaksiyonda 40 döngü olacak şekilde gerçekleşmektedir.

Veri analizinde Yaklaşım Metodu olan Delta-Delta Ct Metodu kullanılmıştır. Seçilmiş olan referans gen (GAPDH) ile örneklerdeki bakılacak gen arasındaki fark alınmıştır. Bunun sonucunda elde edilmiş olan veriler, ΔCt değerini vermektedir. Örneklerin ΔCt değerlerinden, kontrol grubunun ΔCt değerlerinin ortalamasını çıkararak ΔΔCt değeri bulunmuştur. Son olarak 2^-ΔΔCt değeri hesaplandıktan sonra analiz sonuçlarına ulaşılmıştır.

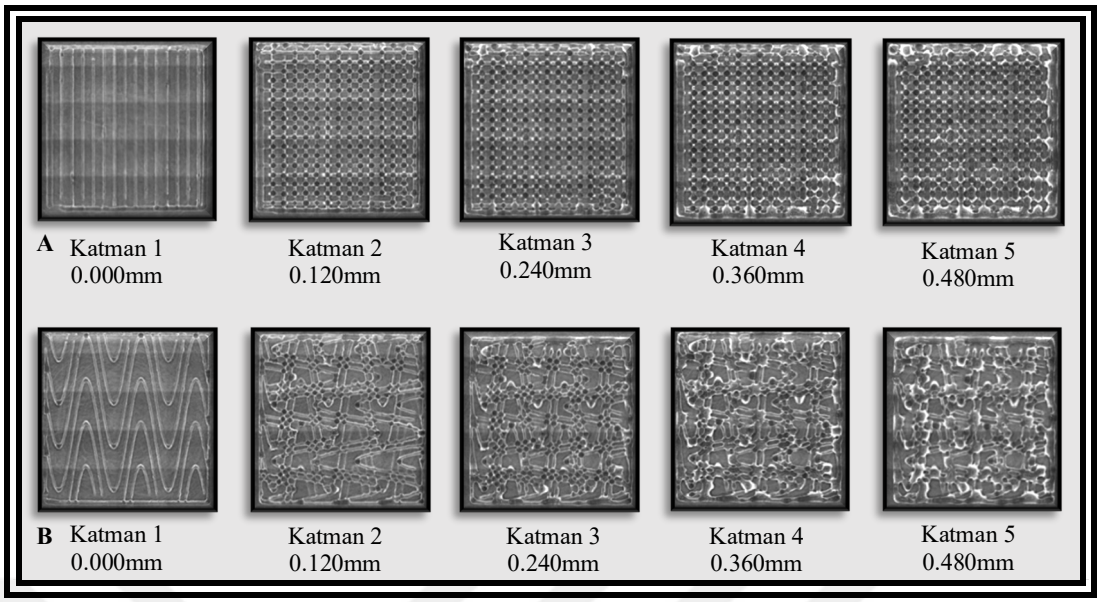
3. BULGULAR

3.1. Üç Boyutlu Biyoyazıcı ile Baskı Sırasında İskele Katmanlarından Desen Basımının Görüntülenmesi

%8 ve %10'luk SA konsantrasyonlarının her birine yaklaşık 8 milyon hücre/ml insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler eklenerek steril koşullarda iki farklı biyomürekkep kartuşlar,

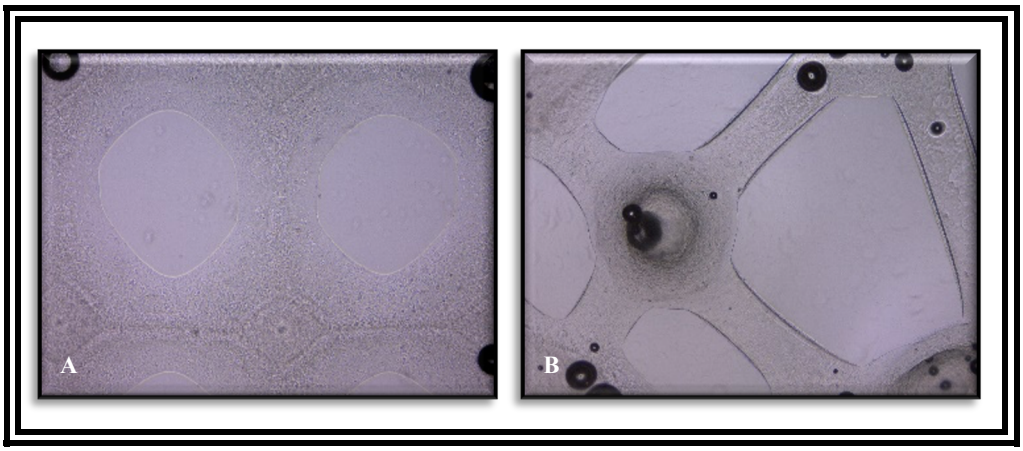
- %8'lik kartuş: 1,6 g toz SA+20 ml Mezenkimal Besiyeri (DMEM, %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF) + 8milyon hücre/ml hücre süspansiyonu
- %10'luk kartuş: 2 g toz SA+20 ml Mezenkimal Besiyeri (DMEM, %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF) + 8milyon hücre/ml hücre süspansiyonu şeklinde hazırlanmıştır.

Hazırlanan kartuşlar, EnvisionTec 3D Bioplotter cihazına yerleştirilerek 0,20 mm needle, 4 bar basınç, 8 mm/s yazılım ayarlamaları yapılarak aynı koşullarda biyoyazıcı yuvasına yerleştirilmiş 60 mm steril petri içerisine %8 ve %10'luk biyomürekkeplerden ızgara ve dalgalı desenli her bir iskelede toplam beş katman olacak şekilde iskeleler basılmıştır. Üç boyutlu biyobaskı sırasında EnvisionTec 3D Bioplotter cihazında bulunan kamera yardımıyla her bir katman basımı sonrasında fotoğraf alınmıştır (Şekil 3.1). Fotoğraflarda aljinatın yüksek viskozitesinden dolayı her basılan katman sonrası iskele biyomürekkebinin yayıldığı gözlenmiştir.



Şekil 3.1. Üç boyutlu biyobaskıda katman katman ızgara (A) ve dalgalı (B) desen basımının biyoyazıcı kamerasından çekilmiş görüntüsü.

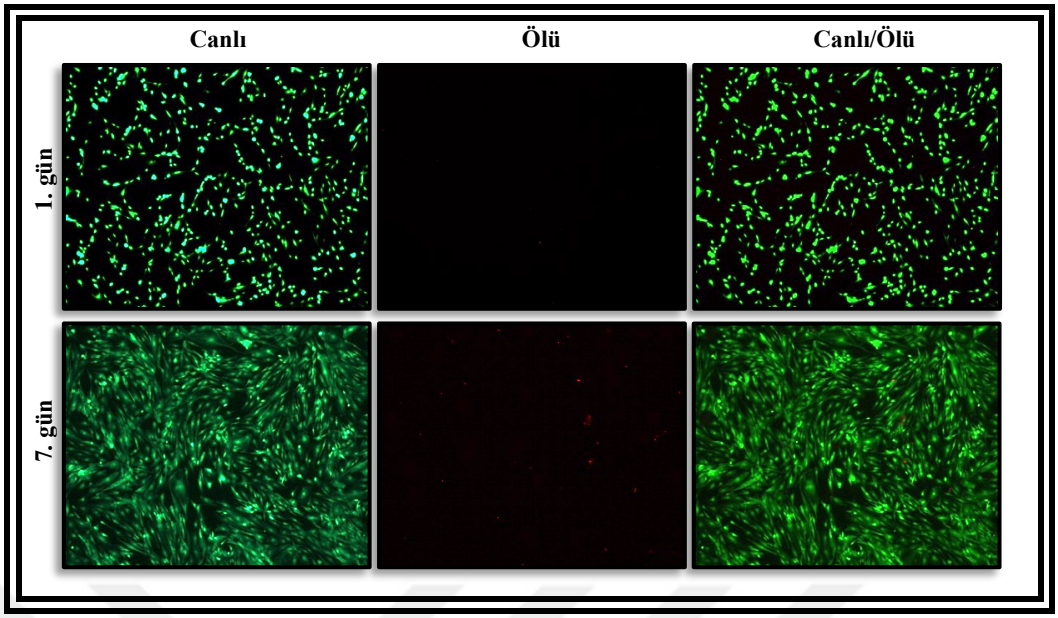
Desen geometrisinin korunması açısından beş katmanlı iskele basımı sonrası her bir iskele, uzun vadeli stabilite için en az 15 dk steril 100mM $CaCl_2$ ile muamele edilmiştir. Böylece iskele biyomürekkebinde bulunan aljinatın polimerize olması sağlanmış ve iskele sertliğiyle birlikte desen bütünlüğünün korunduğu ters ışık (inverted) mikroskobunda yakından gözlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Üç boyutlu ızgara (A) ve dalgalı (B) desenli iskelelerin ters ışık (inverted) mikroskop görüntüsü (X5).

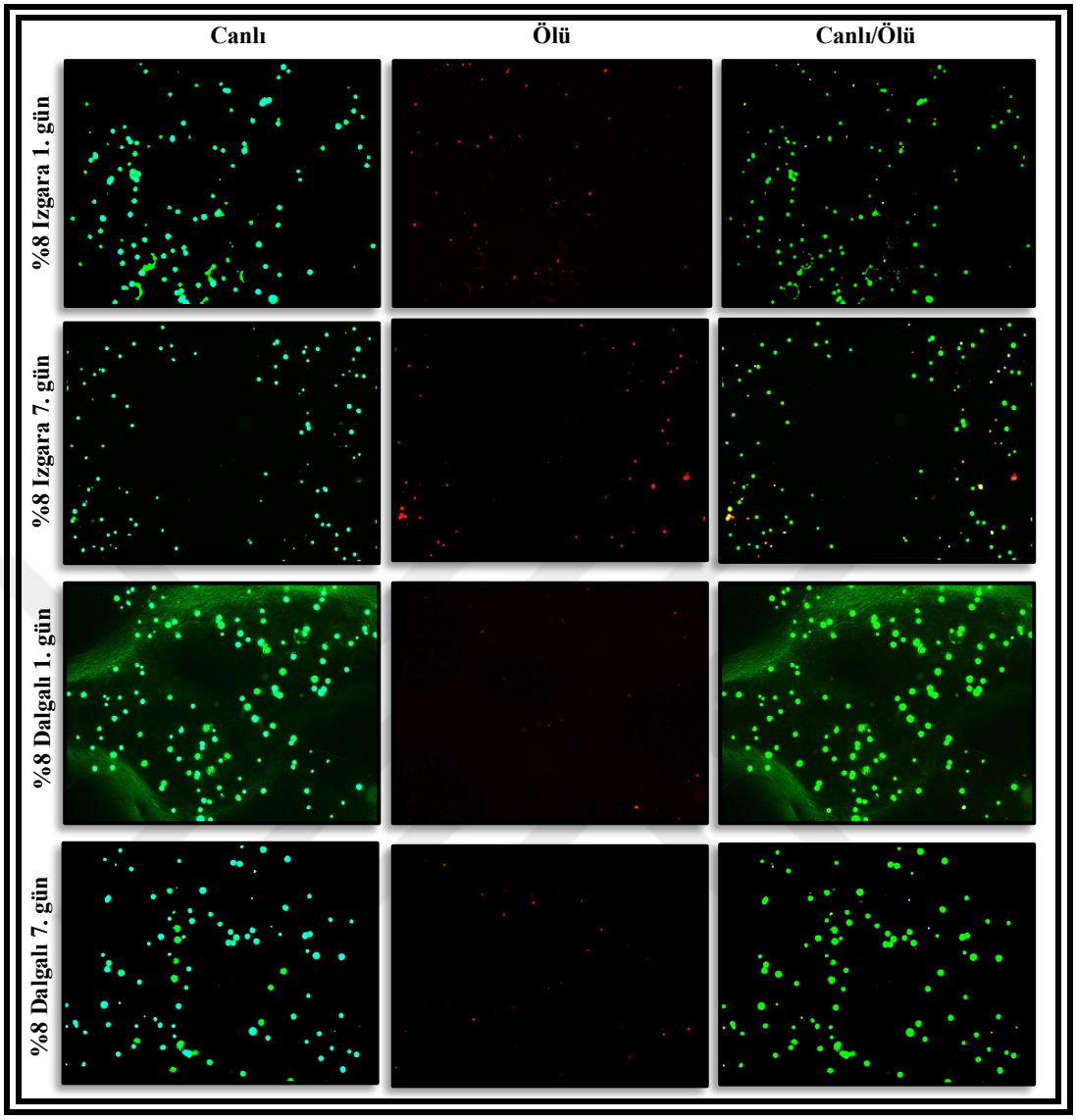
3.2. İki Boyutlu Kültürdeki ve Üç Boyutlu Biyobaskı Sonrası İskelelerdeki İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Canlılığının Floresan Boyama Tekniği ile Belirlenmesi

Gen ifade analizinden sonra elde edilen sonuçları desteklemek amacıyla 3B biyobaskıya alınmadan önce kontrol grubu olarak 2B kültürdeki ve biyobaskı sonrası iskelelere tutunmuş iAKH'lerin canlılığını belirlemek amacıyla floresan boyama yapılmıştır. Canlılık analizi yapabilmek için kontrol grubu olarak 2B kültürdeki insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve 3B biyobaskı ile basılan hücreli iskeleler ticari olaran tedarik edilen Thermo Fisher Scientific LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity kit protokolü uygulanarak her bir deney grubunun 1. gün ve 7. günlerinde floresan boyama yapılmıştır. Kit, bir popülasyondaki hücrelerin canlılığını belirlemek için esteraz aktivitesi ve plazma membran bütünlüğüne dayanarak sonuç veren iki renkli bir test sunmaktadır. Her yerde bulunan hücre içi esteraz aktivitesi ve sağlam bir plazma membranı, canlı hücrelerin ayırt edici özellikleridir. Hücre içi esteraz aktivitesini göstermek için yeşil floresan-Calcein-AM ve plazma membran bütünlüğünün kaybını belirtmek için kırmızı floresan-Etidyum homodimer-1 (EthD-1) ile eşzamanlı olarak boyayarak canlı ölü hücre analizini hızlı bir şekilde yapabilmektedir. Kit protokolüne göre; 2,5 ml DPBS, 5 µl Ethidium homodimer-1 (EthD-1), 1,25 µl Calcein-AM 15 ml falkon tüp içine alınarak vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. DPBS ile yıkanmış 2B kültür kabındaki aderan iAKH'lerin ve 3B biyobaskı ile basılmış iskelelerin üzerini kapatacak kadar her bir örnek için yaklaşık 1-2 ml kit karışımı olacak şekilde eklenmiştir. Karanlık, oda ısısında (20-25°C) 30 dk inkübe edildikten sonra boyanan 2B kültür kabı ve iskeleler EVOS marka floresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir. IF (immünofloresan) mikroskopta Calcein-AM ile boyanmış canlı hücreleri yeşil renkte ve EthD-1 ile boyanmış ölü hücreleri kırmızı renkte gözlenmektedir.



Şekil 3.3. İki boyutlu kültürdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki canlı/ölü boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü (5X).

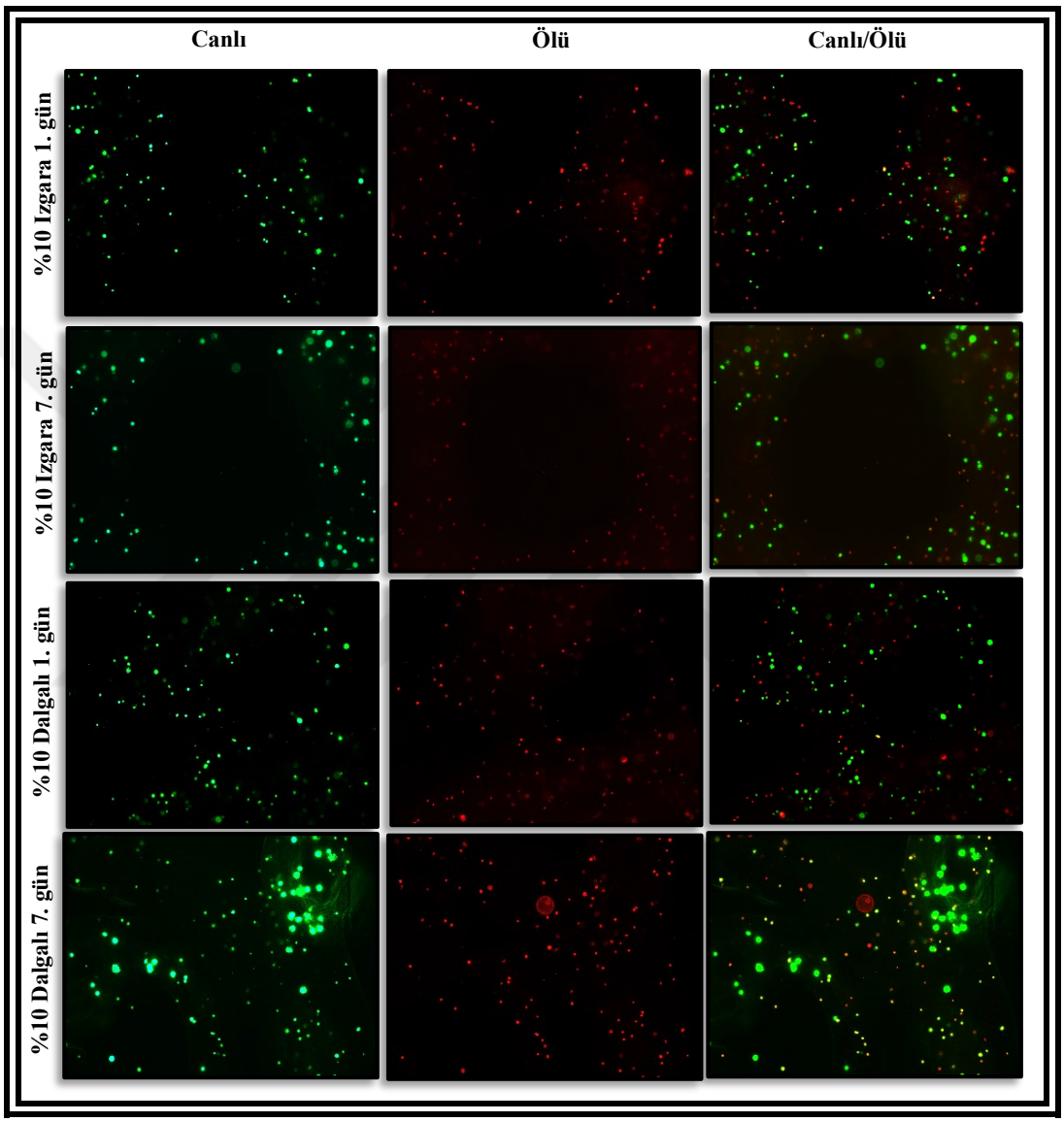
Kontrol grubu 2B kültürdeki iAKH hücrelerinin 1. ve 7. günlerdeki floresan boyama sonuçlarına göre (Şekil 3.3), kültür kabına aderan haldeki insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 7. günde 1. güne göre hücre proliferasyonuna bağlı olarak yeşil renkli canlı hücrelerin yoğunluğunda artış gözlenmiştir. İki boyutlu kültürdeki hücrelerin 3. günde mezenkimal besiyeri değişimi yapılmıştır. Bununla birlikte T-75 kültür kabında mezenkimal besiyeri ortamındaki insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler 7. günde artık sıkışık (konfluent) duruma geldiği, hem mezenkimal besiyeri ortamının hücreler için yetersiz kalması ve metabolik atıkların ortamda çoğalmasıyla hem de kültür kabında hücre çoğalmasına bağlı daha fazla yer kalmadığı için kontakt inhibisyon mekanizması ile hücre proliferasyonunun durmasına bağlı olarak 7. günde 1. güne göre kırmızı renkli ölü hücrelerin yoğunluğunda artış gözlenmiştir.



Şekil 3.4. %8 SA biyomürekkepli kartuş ile ızgara ve dalgalı desenlerde 3B biyobasılmış 5 katmanlı iskelelerdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki canlı/ölü boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü (5X).

Üç boyutlu biyobaskı sonrası %8 ve %10'luk SA konsantrasyonlarında beş katmanlı basılmış ızgara ve dalgalı desenli 3B iskeleler, floresan boyama sonrası IF mikroskopta katmanların derinliği göz önüne alınarak analiz edilmiştir. Üç boyutlu biyobaskı sonrası %8 SA biyomürekkep konsantrasyonundaki (Şekil 3.4) ve %10 SA biyomürekkep konsantrasyonundaki (Şekil 3.5) ızgara ve dalgalı baskı desenleri ile basılmış iskelelerdeki iAKH'lerin floresan boyama sonuçlarına göre, %8'lik ızgara ve dalgalı desenli iskelelerdeki iAKH'lerin her iki desen içinde 7. günlerindeki ölü hücre yoğunluğunun 1. günlerine göre daha yoğun olduğu gözlenmiştir. %8 SA

konsantrasyonunda basılmış iskelelerden ızgara desenli iskelelerdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerde dalgalı desenli iskelelerdeki iAKH'lere göre ölü hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.5. %10 SA biyomürekkepli kartuş ile ızgara ve dalgalı desenlerde 3B biyobasılmış 5 katmanlı iskelelerdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki canlı/ölü boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü (5X).

Baskı deseni farketmeksizin %10 SA konsantrasyonlu 3B iskelelerdeki ölü hücre yoğunluğunun %8 SA konsantrasyonlu 3B iskelelerdekine göre çok daha yoğun olduğu açık bir şekilde gözlenmiştir. %10 SA ızgara desenli basılmış iskelelerdeki hücrelerin 1. gündeki ölü hücre yoğunluğunun 7. günden daha fazla olduğu

gözlenmiştir. %10 SA dalgalı desenli iskelelerde ise, 7. gündeki ölü hücre yoğunluğunun 1. günden daha fazla olduğu gözlenmiştir. Baskı desenlerine bakıldığında ise 1. günde ızgara desenli, 7. günde ise dalgalı desenli iskelelerdeki ölü hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlenmiştir.

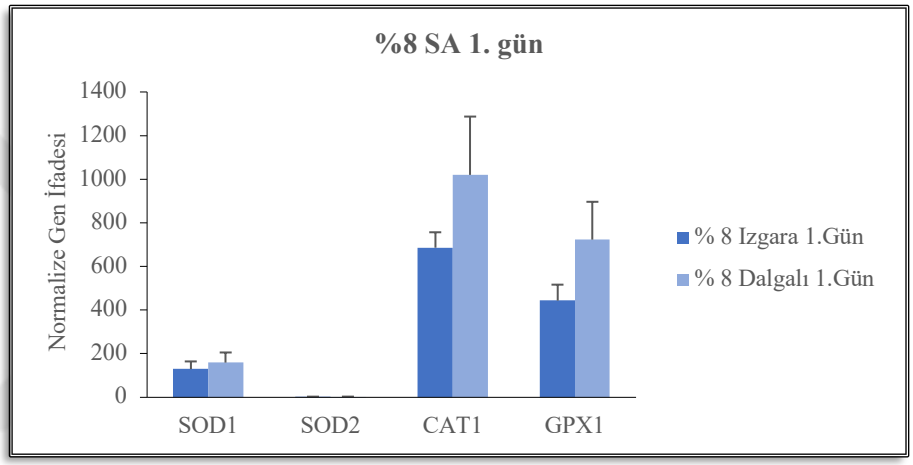
3.3. Üç Boyutlu Biyobaskı Sonrası İskele Üzerindeki İnsan Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerindeki Oksidatif Stres ve Antioksidan Genlerindeki İfadesinin Analizi

İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, 3B biyobaskı için hazırlanmış olan %8 SA ve %10 SA konsantrasyonlarındaki biyomürekkeplerle ızgara ve dalgalı desen olmak üzere iki farklı desen tasarımı kullanılarak beş katmanlı iskelelerin 3B biyobasımı sonrasında, iskelelerdeki hücreler üzerindeki oksidatif strese etkisinin araştırılmasında 1. ve 7. günlerde gen ifadelerinin tespiti için eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Analizlerde ROS'a karşı birinci savunma antioksidanlarından enzimatik antioksidan genleri olan, sitozolik süperoksit dismutaz (SOD1), mitokondriyal süperoksit dismutaz (SOD2), katalaz (CAT1), glutatyon peroksidaz 1 (GPX1) ve hipoksik şartlarda aktive edilen bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi ile indüklenen faktör-lα (HIF-1α) genleri seçilmiştir. Bu genler, referans gen olarak seçilen GAPDH'e göre analiz edilmiştir.

%8 ve %10 SA konsantrasyonlarında hazırlanan hücreli biyomürekkeplerle her bir konsantrasyon için ızgara ve dalgalı desenlerde beş katmanlı 3B hücreli iskeleler basılmıştır. Basım sonrası 15 dk $CaCl_2$ ile çapraz bağlama işlemi uygulanmıştır. PBS ile yıkama işlemi sonrası mezenkimal besiyeri ortamına alınıp inkübe edilen iskelelerden 1. ve 7. günlerde sodyum sitrat işlemi ile hücre izolasyonu yapılmıştır. İskelelerden izole edilen iAKH'lerden RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu yapılan örneklerden cDNA sentezi yapılmıştır. Son olarak ise bu örneklerden SOD1, SOD2, CAT1, GPX1 ve HIF-1α gen ifadelerine bakılmak amacıyla eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Referans gen olarak GAPDH seçilmiştir. Kontrol grubu olarak

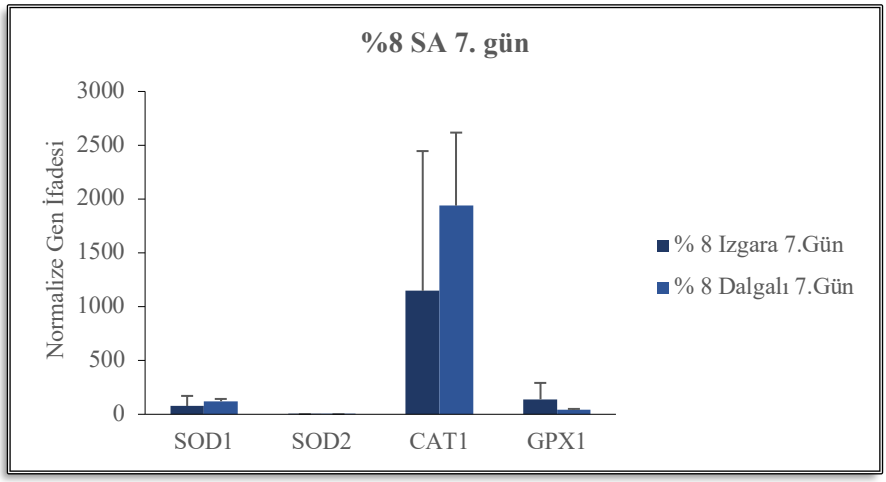
yalnızca mezenkimal besiyerinde 2B olarak kültüre edilmiş olan iAKH'ler seçilmiştir. Bu kontrol grubuna göre gen ifadelerinin normalizasyonu yapılmıştır.

Üç boyutlu biyoyazıcı ile %8 ve %10 SA konsantrasyonlu hazırlanmış olan biyomürekkepler ile ızgara ve dalgalı desen projeleri ile beş katmanlı basılmış olan iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası yapılan eş zamanlı PCR analizinde gen ifadelerinin desen farkına göre sonuçları şu şekildedir:



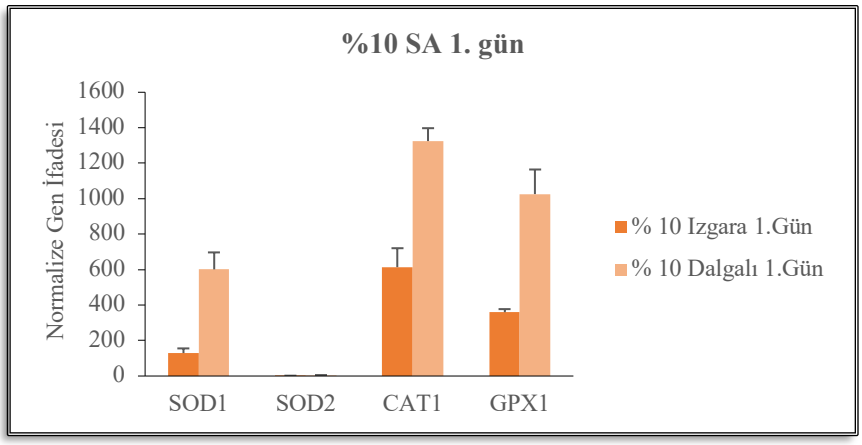
Şekil 3.6. %8 SA konsantrasyonlu biyomürekkep ile 3B basılmış iskelelerin 1. günde ızgara ve dalgalı desen farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi.

%8 SA biyomürekkep ile basılmış iskelelerin 1. gün gen ifadesi sonuçlarına göre desen farkına bağlı olarak ızgara ve dalgalı desenlerde basılan iskelelerdeki gen ifadeleri karşılaştırıldığında (Şekil 3.6), dalgalı desenli iskeledeki antioksidan genlerin ifadesinin ızgara desenli iskeledeki gen ifadelerine göre daha fazla olduğu görülmüştür. SOD2 geninin ifadesinin her iki desen için de düşük olduğu gözlenmiş olup ayrı bir grafikte incelenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.7. %8 SA konsantrasyonlu biyomürekkep ile 3B basılmış iskelelerin 7. günde ızgara ve dalgalı desen farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi.

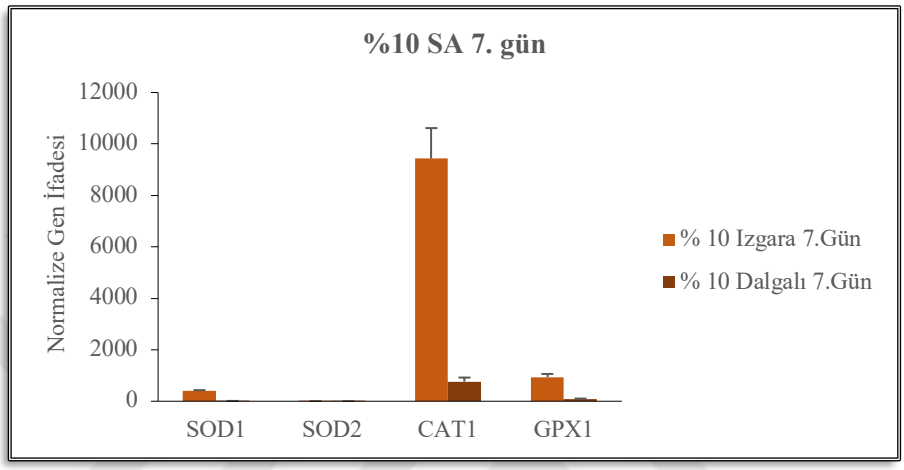
%8 SA biyomürekkep ile basılmış iskelelerin 7. gün gen ifadesi sonuçlarına göre desen farkına bağlı olarak ızgara ve dalgalı desenlerde basılan iskelelerdeki gen ifadeleri karşılaştırıldığında (Şekil 3.7), dalgalı desenli iskeledeki SOD1 ve CAT1 genlerin ifadesinde ızgara desenli iskeleye göre artış görülmüştür. GPX1 geninin ızgara desenli iskelede dalgalı desenliye göre bir miktar daha fazla ifade edildiği gözlenmiştir. SOD2 geninin ifadesinin her iki desen için de düşük olduğu gözlenmiş olup ayrı bir grafikte incelenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.8. %10 SA konsantrasyonlu biyomürekkep ile 3B basılmış iskelelerin 1. günde ızgara ve dalgalı desen farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi.

%10 SA biyomürekkep ile basılmış iskelelerin 1. gün gen ifadesi sonuçlarına göre desen farkına bağlı olarak ızgara ve dalgalı desenlerde basılan iskelelerdeki gen

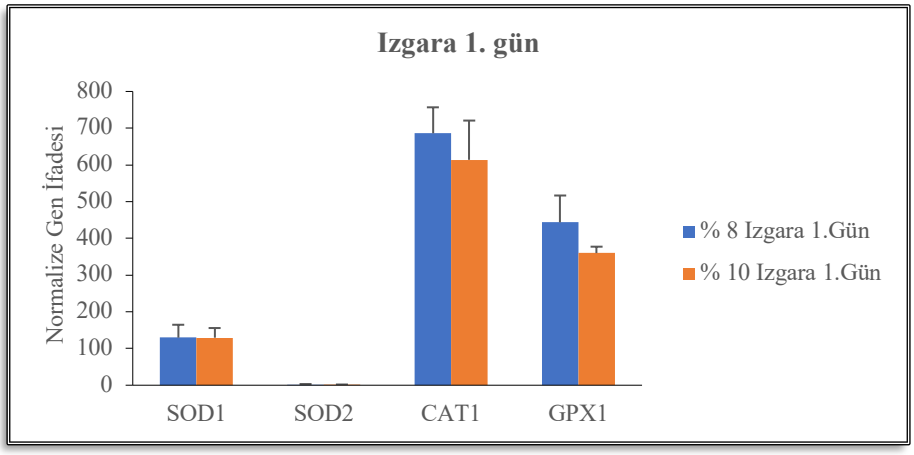
ifadeleri karşılaştırıldığında (Şekil 3.8), %8SA biyomürekkep ile basılmış sonuçlardakine benzer bir doğrultuda dalgalı desenli iskeledeki antioksidan genlerin ifadesinin ızgara desenli iskeledeki gen ifadelerine göre daha fazla olduğu görülmüştür. SOD2 geninin ifadesinin her iki desen için de düşük olduğu gözlenmiş olup ayrı bir grafikte incelenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.9. %10 SA konsantrasyonlu biyomürekkep ile 3B basılmış iskelelerin 7. günde ızgara ve dalgalı desen farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi.

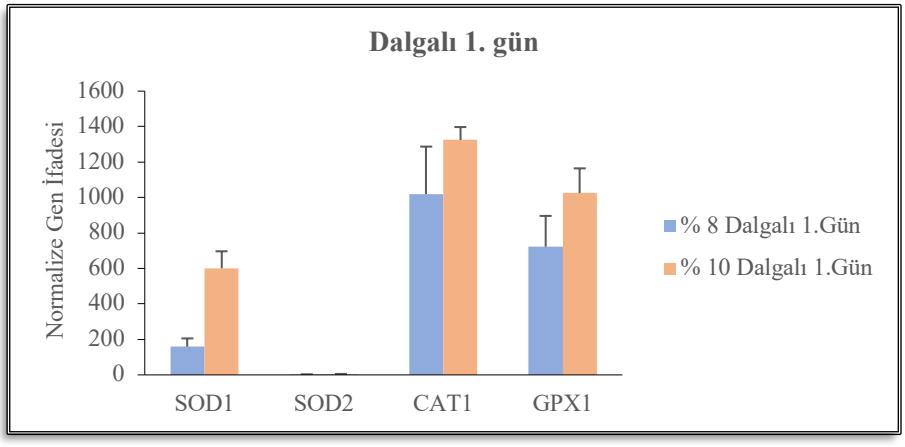
%10 SA biyomürekkep ile basılmış iskelelerin 7. gün gen ifadesi sonuçlarına göre desen farkına bağlı olarak ızgara ve dalgalı desenlerde basılan iskelelerdeki gen ifadeleri karşılaştırıldığında (Şekil 3.9), ızgara desenli iskeledeki SOD1, CAT1 ve GPX1 genlerin ifadesinde dalgalı desenli iskeleye göre artış görülmüştür. SOD2 geninin ifadesinin her iki desen için de düşük olduğu gözlenmiş olup ayrı bir grafikte incelenmiştir (Şekil 3.13).

Üç boyutlu biyoyazıcı ile ızgara ve dalgalı desenlerde basılmış beş katmanlı iskelelerin hazırlandığı biyomürekkep konsantrasyonuna göre %8 ve %10 SA konsantrasyonlu basılmış olan iskelelerden 1. gün izole edilen iAKH'lerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası yapılan eş zamanlı PCR analizinde gen ifadelerinin SA konsantrasyon farkına göre sonuçları şu şekildedir:



Şekil 3.10. Üç boyutlu biyoyazıcıda basılmış ızgara desenli iskelelerin 1. gün %8 ve %10 SA konsantrasyon farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi.

Biyomürekkep SA konsantrasyon farkına göre ızgara desende basılmış iskelelerin 1. gün gen ifadesi sonuçlarına göre %8 ve %10 SA konsantrasyonlu biyomürekkepler kullanılarak basılan iskelelerdeki gen ifadeleri karşılaştırıldığında (Şekil 3.10), SOD1 geninin ifadesi %8'lik ve %10'luk SA için neredeyse eşit seviyede ifade edilirken, CAT1 ve GPX1 genlerinin ifadesi %8 SA konsantrasyonlu iskelelerde %10 SA iskelelerden daha fazla olduğu görülmektedir. SOD2 geninin ifadesinin her iki desen için de düşük olduğu gözlenmiş olup ayrı bir grafikte incelenmiştir (Şekil 3.13).

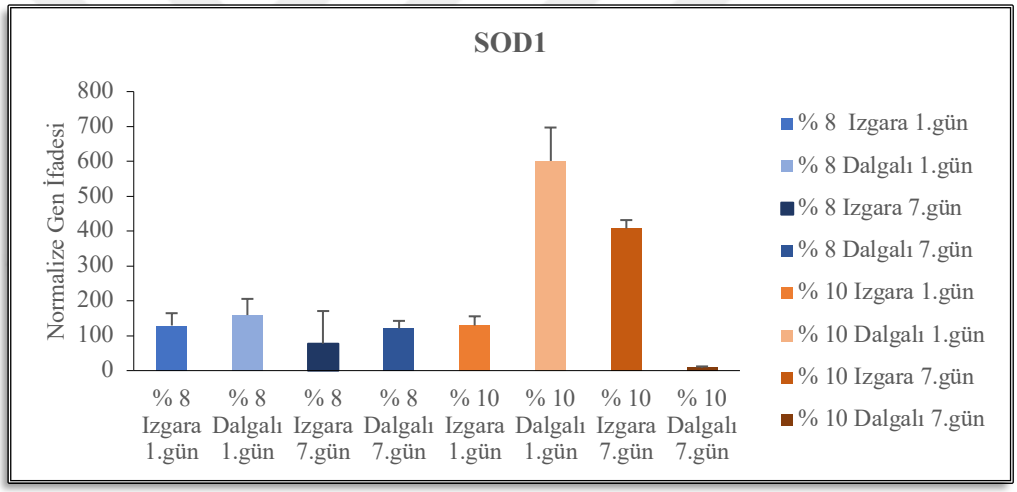


Şekil 3.11. Üç boyutlu biyoyazıcıda basılmış dalgalı desenli iskelelerin 1. gün %8 ve %10 SA konsantrasyon farkının antioksidan genler için eş zamanlı PCR analizi.

Biyomürekkep SA konsantrasyon farkına göre dalgalı desende basılmış iskelelerin 1. gün gen ifadesi sonuçlarına göre %8 ve %10 SA konsantrasyonlu

biyomürekkepler kullanılarak basılan iskelelerdeki gen ifadeleri karşılaştırıldığında (Şekil 3.11), SOD1, CAT1 ve GPX1 genlerinin ifadesi %10 SA iskelelerde %8 SA iskeleye göre daha fazla olduğu görülmüştür. SOD2 geninin ifadesinin her iki desen için de düşük olduğu gözlenmiş olup ayrı bir grafikte incelenmiştir (Şekil 3.13).

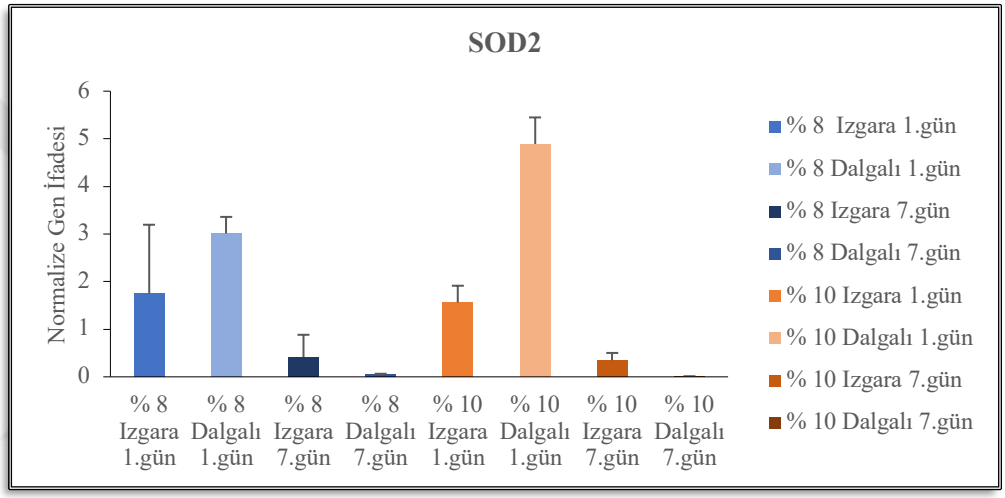
Üç boyutlu biyoyazıcı ile %8 ve %10 SA biyomürekkep ile hazırlanarak ızgara ve dalgalı desenli olarak beş katmanlı basılan iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası yapılan eş zamanlı PCR analizinde örneklerin antioksidan genler ve transkripsiyon faktörü gen ifadelerinin 3B biyobaskıda kullanılan biyomürekkep konsantrasyonu, iskele baskı deseni ve kültür sürelerine göre karşılaştırılmış sonuçları şu şekildedir:



Şekil 3.12. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin SOD1 gen ifadesinin analizi.

%8 ve %10 SA konsantrasyonundaki biyomürekkepler ile ızgara ve dalgalı desenlerde basılmış iskelelerin 1. ve 7. günlerde SOD1 gen ifadesi sonuçlarına göre (Şekil 3.12), %8 SA iskelelerde desen farketmeksizin 1. güne göre 7. gündeki SOD1 gen ifadelerinin azaldığı görülmüştür. %8 SA konsantrasyonlu biyomürekkeple basılan dalgalı desenli iskelelerde 1. ve 7. günlerde ızgara desenli iskelelere göre daha fazla SOD1 gen ifadesi olduğu görülmüştür. %10 SA ızgara desenli iskelelerde 7. günde SOD1 gen ifadesinin 1. güne göre arttığı görülmüştür. %10 SA dalgalı desenli iskelelerde 7. günde SOD1 gen ifadesinin büyük oranda azaldığı görülmüştür. Biyobaskının 1. gününde SOD1 gen ifadesinin en yüksek %10 SA dalgalı desenli, en

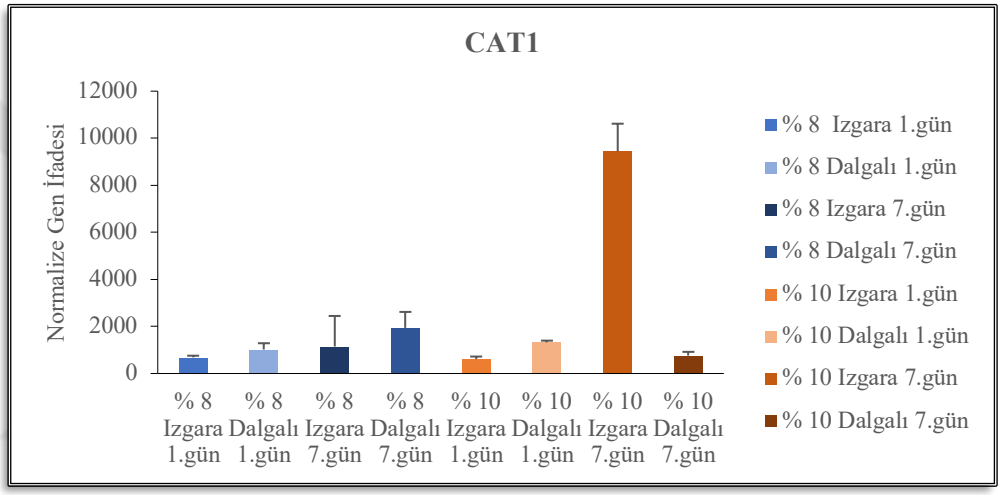
düşük %10 SA ızgara desenli iskelelerde olduğu gözlenmiştir. Biyobaskının 7. gününde SOD1 gen ifadesinin en yüksek %10 SA ızgara desenli, en düşük %10 SA dalgalı desenli iskelelerde olduğu gözlenmiştir. Izgara desenli basım için, %8 SA 1. gün gen ifadesinin %10 SA 1. gün gen ifadesine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. 7. gün gen ifadelerinde ise, %10 SA gen ifadesinin %8 SA gen ifadesine göre daha fazla olduğu görülmüştür. Dalgalı desenli basım için, 1. günde %10 SA gen ifadesinin %8 SA gen ifadesine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. 7. gün gen ifadelerinde ise, %8 SA gen ifadenin %10 SA gen ifadesine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.13. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin SOD2 gen ifadesinin analizi.

%8 ve %10 SA konsantrasyonundaki biyomürekkepler ile ızgara ve dalgalı desenlerde basılmış iskelelerin 1. ve 7. günlerde SOD2 gen ifadesi sonuçlarına göre (Şekil 3.13), %8 SA basımın 1. gününde dalgalı desenli iskelelerdeki SOD2 gen ifadesinin ızgara desenli iskelelerden daha fazla olduğu görülmüştür. Basımın 7. gününde ise, desen farketmeksizin SOD2 gen ifadesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte 7. günde %8 SA ızgara desendeki SOD2 gen ifadesinin dalgalı desene göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. %10 SA basımın 1. gününde dalgalı desenli iskelelerdeki SOD2 gen ifadesinin ızgara desenli iskelelerden daha fazla olduğu görülmüştür. Basımın 7. gününde ise, yine desen farketmeksizin SOD2 gen ifadesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte 7. günde %10 SA ızgara desendeki SOD2 gen ifadesinin dalgalı desene göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Basımın 1. gününde SOD2 gen ifadesinin en yüksek %10 SA dalgalı desenli, en düşük %10 SA

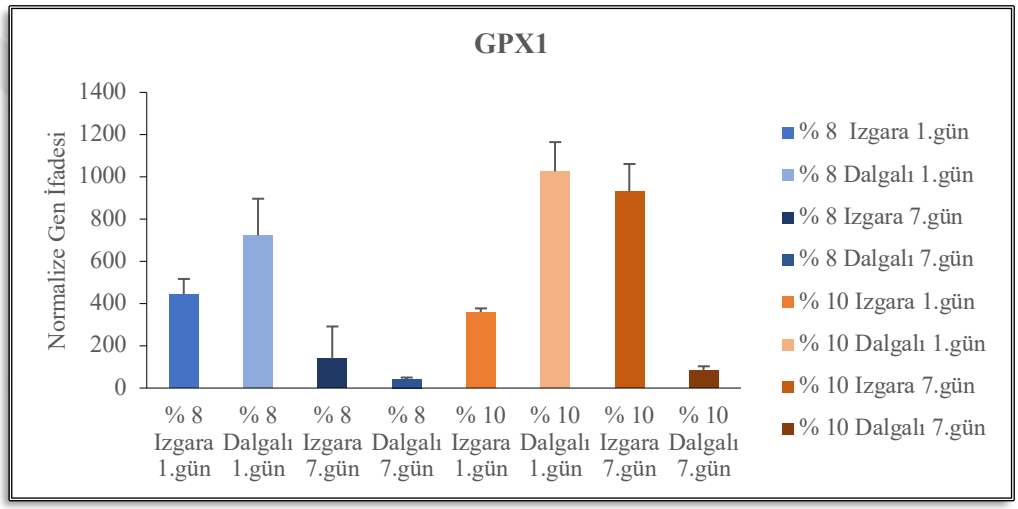
ızgara desenli iskelelerde olduğu gözlenmiştir. Basımın 7. gününde ise, en yüksek gen ifadesinin %8 SA ızgara desenli, en düşük gen ifadesinin ise %10 SA dalgalı desenli iskelelerde olduğu gözlenmiştir. Izgara desenli basım için, 1. ve 7. günlerin her ikisinde de %8 SA konsantrasyonunda gen ifadesinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Dalgalı desenli basım için, 1. gün gen ifadesinin %10 SA konsantrasyonunda %8 SA'dan daha fazla olduğu gözlenmiştir. 7. günde ise, her iki konsantrasyon için de oldukça az ifade edilmiş olmasıyla birlikte %8 SA konsantrasyonunda %10 SA konsantrasyonuna göre nispeteden daha fazla ifade edildiği görülmüştür.



Şekil 3.14. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin CAT1 gen ifadesinin analizi.

%8 ve %10 SA konsantrasyonundaki biyomürekkepler ile ızgara ve dalgalı desenlerde basılmış iskelelerin 1. ve 7. günlerde CAT1 gen ifadesi sonuçlarına göre (Şekil 3.14), %8 SA basımın 1. gününde de 7. gününde de dalgalı desenli iskelelerde ızgara desenlilere göre daha fazla CAT1 gen ifadesi olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, 7. günde 1. güne göre %8 SA konsantrasyonlu basılmış iskelelerde CAT1 gen ifadesinin arttığı gözlenmiştir. %10 SA basımın 1. gününde ızgara desenli iskelelere göre dalgalı desenlilerde daha fazla CAT1 gen ifadesinin olduğu görülmüştür. 7. günlerde ise, %10 SA ızgara desenli iskelelerde dalgalı desenlilere göre çok daha fazla CAT1 gen ifadesinin olduğu gözlenmiştir. %10 SA ızgara desende 7. günde 1. güne göre gen ifadesi artarken, dalgalı desende 7. günde 1. güne göre gen ifadesinde azalış olduğu görülmüştür. Basımın 1. gününde, en yüksek gen ifadesi %10 SA dalgalı desenli iskelelerde olurken, en az gen ifadesinin %10 SA ızgara desende olduğu

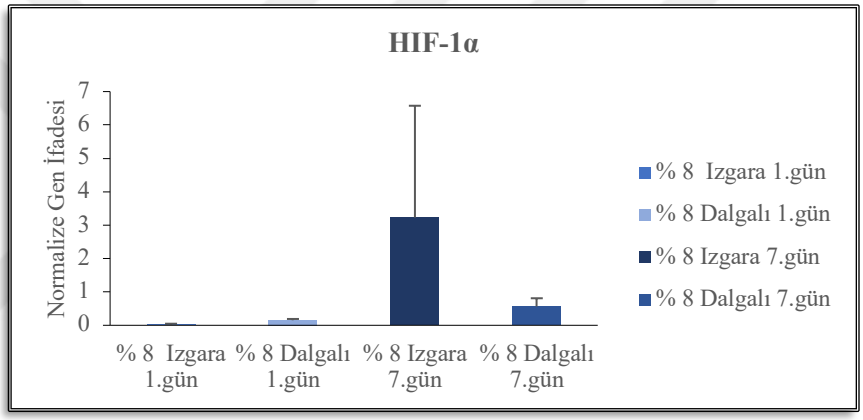
görülmüştür. Basımın 7. gününde ise, en yüksek gen ifadesi %10 SA ızgara desenli iskelelerde olurken, en düşük gen ifadesi ise %10 SA dalgalı desenli iskelelerde gözlenmiştir. Izgara desenli basım için, 1. günde %8 SA konsantrasyonundaki gen ifadesinin %10 SA konsantrasyonlu basıma göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. 7. günde ise, %10 SA konsantrasyonundaki gen ifadesinin %8 SA konsantrasyonlu basılmış iskelelere göre oldukça fazla olduğu görülmüştür. Dalgalı desenli basım için, 1. gündeki gen ifadesinin %10 SA'da %8 SA'a göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. 7. günde ise, %8 SA'da %10 SA konsantrasyonundaki iskelelere göre daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 3.15. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin GPX1 gen ifadesinin analizi.

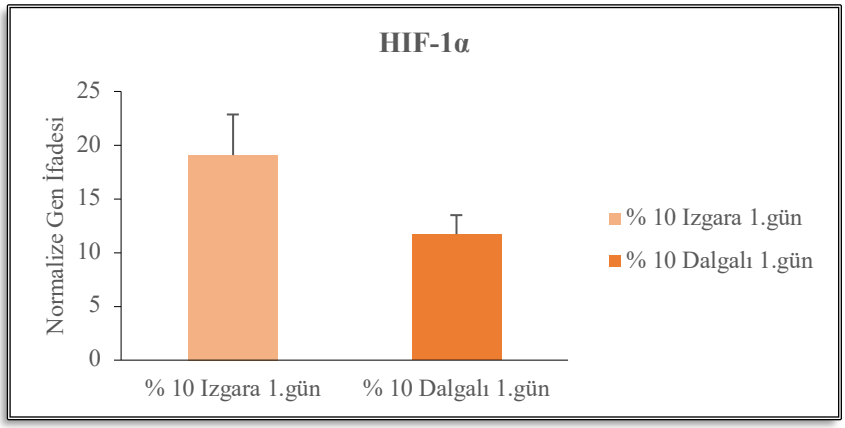
%8 ve %10 SA konsantrasyonundaki biyomürekkepler ile ızgara ve dalgalı desenlerde basılmış iskelelerin 1. ve 7. günlerde GPX1 gen ifadesi sonuçlarına göre (Şekil 3.15), %8 SA 7. günde 1. güne göre her iki desenli iskelede de GPX1 gen ifadesinde azalma görülmüştür. %8 SA 1. günde dalgalı desenli iskelelerin GPX1 gen ifadesinin %8 SA ızgara desene göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. 7. günde ise, %8 SA ızgara desenli iskelelerde dalgalıya göre gen ifadesinin daha fazla olduğu görülmüştür. %10 SA 1. günde dalgalı desenli iskelelerin GPX1 gen ifadesinin ızgara desene göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. 7. günde ise, %10 SA ızgara desenli iskelelerde dalgalıya göre gen ifadesinin oldukça fazla olduğu görülmüştür. Basımın 1. gününde, en yüksek gen ifadesi %10 SA dalgalı desenli iskelelerde olurken, en

düşük gen ifadesinin %10 SA ızgara desende olduğu görülmüştür. Basımın 7. gününde ise, en yüksek gen ifadesi %10 SA ızgara desenli iskelelerde olurken, en düşük gen ifadesi ise %8 SA dalgalı desenli iskelelerde gözlenmiştir. Izgara desenli basım için, 1. günde %8 SA konsantrasyonundaki gen ifadesinin %10 SA konsantrasyonlu basıma göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. 7. günde ise, %10 SA konsantrasyonundaki gen ifadesinin %8 SA konsantrasyonlu basılmış ızgara iskelelere göre daha fazla olduğu görülmüştür. Dalgalı desenli basım için, 1. gündeki gen ifadesinin %10 SA konsantrasyonunda %8 SA konsantrasyondaki dalgalı iskelelere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. 7. günde ise, %10 SA'da %8 SA konsantrasyonundaki dalgalı iskelelere göre daha fazla olduğu görülmektedir.



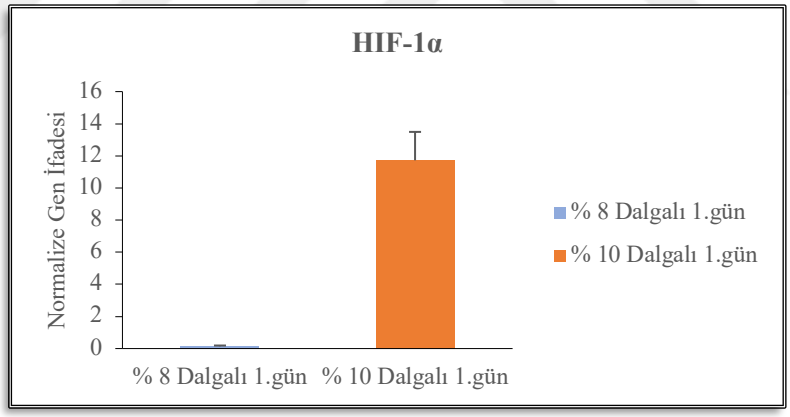
Şekil 3.16. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin HIF-1α gen ifadesinin analizi.

%8 SA konsantrasyonundaki biyomürekkep ile desen farkına bağlı olarak ızgara ve dalgalı desenlerde basılmış iskelelerin 1. ve 7. günlerde HIF-1α gen ifadesi sonuçları karşılaştırıldığında (Şekil 3.16), gen ifadesinin az miktarda olduğu görülmekle birlikte %8 SA ızgara desenli iskelelerdeki kadar belirgin olmamakla birlikte yine dalgalı desenli basılan iskelelerde de güne bağlı olarak 1. güne oranla 7. günde HIF-1α gen ifadesinde artış olduğu görülmüştür. Bununla birlikte HIF-1α gen ifadesindeki artışın %8 SA dalgalıya göre %8 SA ızgara desenli iskelelerde daha çok olduğu gözlenmiştir.



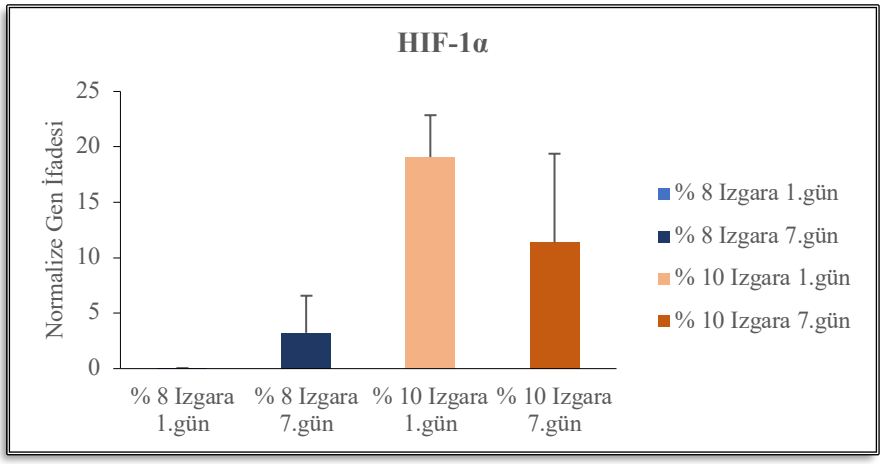
Şekil 3.17. Üç boyutlu biyoyazıcıda %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desenlerde basılmış iskelelerden 1. günde izole edilen iAKH'lerin HIF-1α gen ifadesinin analizi.

%10 SA konsantrasyonundaki biyomürekkep ile ızgara ve dalgalı desenlerde basılmış iskelelerin 1. gün HIF-1α gen ifadesi sonuçları karşılaştırıldığında (Şekil 3.17), gen ifadesinin az miktarda olduğu görülmekle birlikte %10 SA ızgara desende dalgalıya göre daha fazla gen ifadesi olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.18. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu dalgalı desende basılmış iskelelerden 1. günde izole edilen iAKH'lerin HIF-1α gen ifadesinin analizi.

%8 ve %10 SA konsantrasyonlarındaki biyomürekkeplerle dalgalı desende basılmış iskelelerin 1. gün HIF-1α gen ifadesi sonuçları karşılaştırıldığında (Şekil 3.18), %8 SA dalgalı desenli iskelelerde neredeyse yok denecek kadar HIF-1α gen ifadesi görülmüştür. %10 SA dalgalı iskelelerde ise gen ifadesi görülmekle birlikte %8 SA konsantrasyonundan oldukça fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.19. Üç boyutlu biyoyazıcıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara desende basılmış iskelelerden 1. ve 7. günlerde izole edilen iAKH'lerin HIF-1α gen ifadesinin analizi.

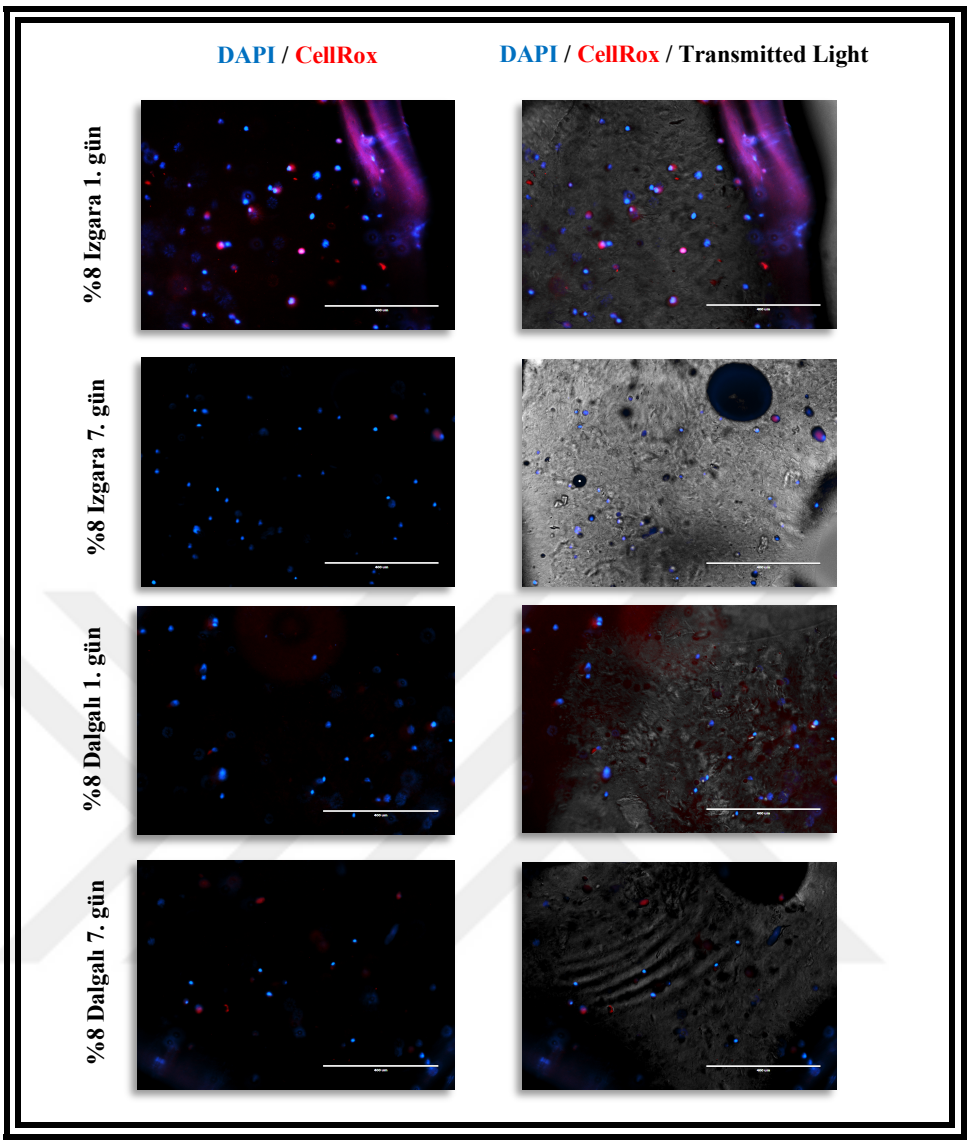
%8 ve %10 SA konsantrasyonlardaki biyomürekkeplerle ızgara desende basılmış iskelelerin 1. ve 7. günlerde HIF-1α gen ifadesi sonuçlarına göre (Şekil 3.19), %8 SA ızgara desenli iskelelerdeki HIF-1α gen ifadesi yok denecek adar az olmakla birlikte 1. güne göre 7. günde artış görülmüştür. %10 SA ızgara desenli iskelelerdeki HIF-1α gen ifadesinin %8 SA konsantrasyonundakinden fazla olduğu gözlenmiştir. %10 ızgara desenli iskelelerde 1. güne göre 7. gündeki HIF-1α gen ifadesinde azalma olduğu görülmüştür. Gün artışına göre %8 SA'da HIF-1α gen ifade artışı görülürken %10 SA'da gün artışında HIF-1α gen ifadesinde azalma olduğu gözlenmiştir.

3.4. Üç Boyutlu Biyobaskı Sonrası İskelelerdeki İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerdeki Stresin Oksidatif Stres Boyama Tekniği ile Belirlenmesi

Üç boyutlu biyobaskı sonrası basılan iskeleler içinde gömülü olan MKH'ler üzerinde oluşan oksidatif stresin belirlenmesi amacıyla basım sonrası iskelelere oksidatif stres boyama yapılmıştır. Üç boyutlu biyobaskı ile basılan hücre gömülü iskeleler ticari olaran tedarik edilen Thermo Fisher Scientific CellROX™ Deep Red Reagent kit protokolü uygulanarak her bir deney grubuna 1. gün ve 7. günlerinde oksidatif stres boyama yapılmıştır. Hücre çekirdeklerini boyamak için Sigma Aldrich, Fluoroshield Mounting Medium With DAPI kullanılmıştır. CellROX™ Deep Red

Reagent kiti, ROS ile reaksiyona girer ve parlak floresan hale gelerek hücrelerdeki oksidatif stresi tespit etmektedir. Hücre geçirgen olan bu reaktif boya, indirgenmiş bir durumda iken floresan değildir ancak reaktif oksijen türleri (ROS) ile okside olduğunda parlak koyu kırmızı floresan sergilemektedir. Kit protokolüne göre; CellROX™ Deep Red Reagent son konsantrasyonu 5µM olacak şekilde 3 ml besiyeri/DPBS, 6 µl CellROX™ Deep Red Reagent 15 ml falkon tüp içine alınarak vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Kültürde bekleyen iskelelerin üzerindeki, besiyeri aspire edildikten sonra DPBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra iskele üzerini tamamen kapatacak kadar hazırlanan kit karışımı eklenmiştir. Karanlık, inkübatöre alınarak 37°C 30 dk inkübe edildikten sonra içeriği aspire edilen iskeleler üç kez DPS ile yıkanmıştır. Daha sonra iskelelerin üzerini kaplayacak kadar %3,7 formaldehit ya da soğuk metanol eklenerek -20°C 15 dk fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası tekrar DPBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Son olarak iskele üzerine DAPI damlatılarak EVOS marka floresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir. IF (immünofloresan) mikroskopta CellROX™ Deep Red Reagent ile boyanmış hücre kısımları koyu kırmızı renkte ve DAPI ile boyanmış hücre çekirdeği ise mavi renkte gözlenmektedir.

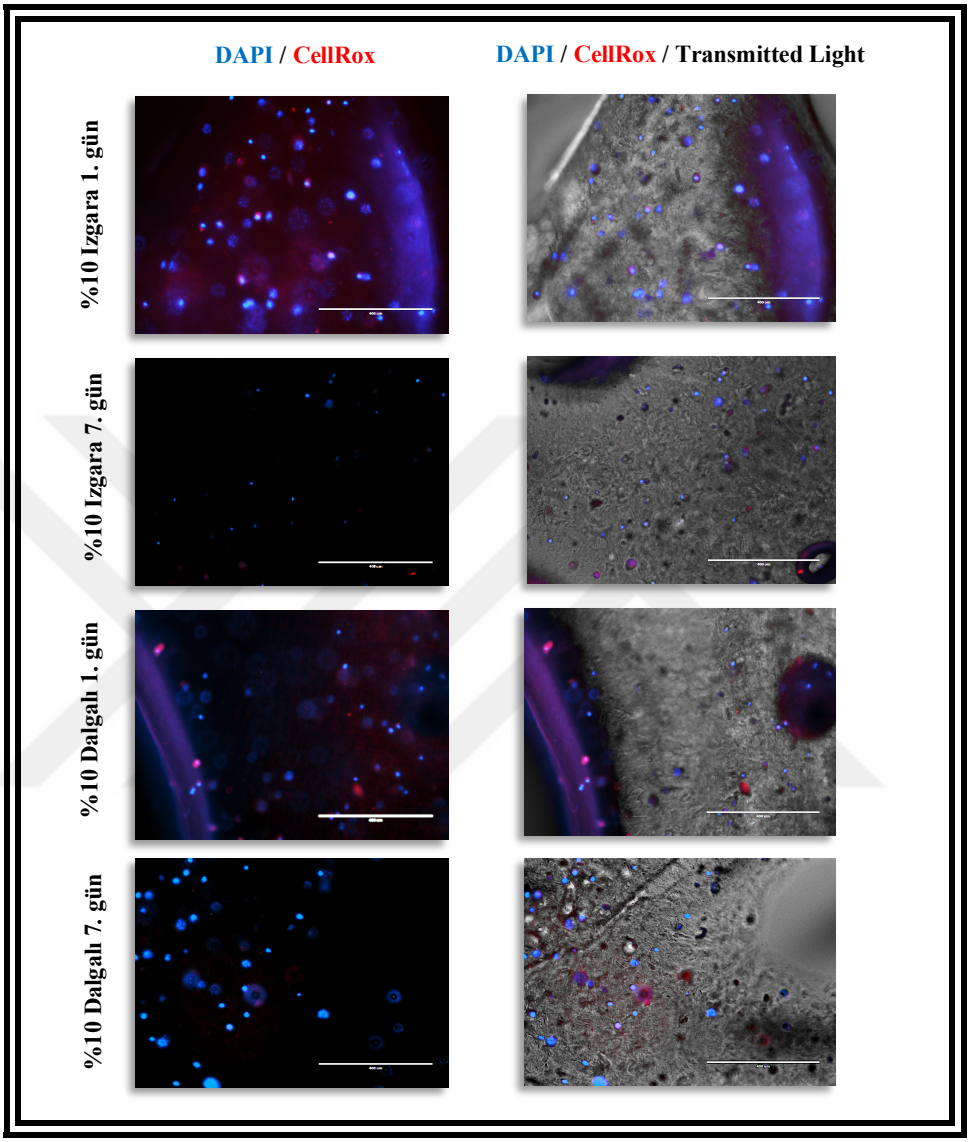
Mikroskop sahasına düşen ve mikroskopta netleme yapılan iskele katmanına düşen hücre sayısı farkı dikkate alınmıştır. Beş katmanlı basılmış iskelelerde oksidatif stres boyamada mikroskop netliği ayarlanmış katmandaki hücrelere göre analiz edilmiştir. Analizlerde alt katmanlardaki floresanların da olduğu göz önüne alınarak bir katmana göre karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.20. %8 SA biyomürekkepli kartuş ile ızgara ve dalgalı desenlerde 3B biyobasılmış 5 katmanlı iskelelerdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki oksidatif stres boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü (10X).

Üç boyutlu biyobaskı sonrası %8 ve %10'luk SA konsantrasyonlarında beş katmanlı basılmış ızgara ve dalgalı desenli 3B iskeleler, oksidatif stres boyama sonrası IF mikroskopta katmanların derinliği göz önüne alınarak analiz edilmiştir. Üç boyutlu biyobaskı sonrası %8 SA biyomürekkep konsantrasyonundaki (Şekil 3.20) ve %10 SA biyomürekkep konsantrasyonundaki (Şekil 3.21) ızgara ve dalgalı baskı desenleri ile basılmış iskelelerdeki iAKH'lerin oksidatif stres boyama sonuçlarına göre, %8'lik ızgara ve dalgalı desenli iskelelerdeki iAKH'lerin 1. günündeki DAPI/CellRox oranının 7. günlere göre daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte dalgalı desenli basımda 1. günde DAPI/CellRox oranının ızgara desene göre oldukça az

olduğu gözlenmiştir. Mikroskop sahasına düşen ve mikroskopta netleme yapılan iskele katmanına düşen hücre sayısı farkı dikkate alınmıştır.



Şekil 3.21. %10 SA biyomürekkepli kartuş ile ızgara ve dalgalı desenlerde 3B biyobasılmış 5 katmanlı iskelelerdeki iAKH'lerin 1. ve 7. günlerdeki oksidatif stres boyama IF (immünofloresan) mikroskop görüntüsü (10X).

%10'luk ızgara ve dalgalı desenli iskelelerdeki iAKH'lerin baskı deseni farketmeksizin genel olarak %8'lik konsantrasyona göre DAPI/CellRox oranının yoğun olduğu gözlenmiştir. %10 SA ızgara ve dalgalı desenli basımlardaki DAPI/CellRox 1. güne göre 7. günde daha az olduğu gözlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Üç boyutlu biyobaskı gelişiminin erken aşamalarında olmasına rağmen, potansiyel faydaları oldukça fazladır. MKH'lerin 3B biyobaskıda kullanılıyor olmalarına karşın baskı potansiyelinin iyileştirilmesi gereken durumlar bulunmaktadır. MKH'lerin 3B biyobaskıda kullanımında ROS oluşumu ve antioksidan savunma sistemleri ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Buna karşın 3B biyobaskıda MKH'lerin etkin olarak kullanılabilmesi için hücre canlılığına etkisi ve MKH'lerde yarattığı oksidatif stresin daha kapsamlı anlaşılması gerekmektedir.

Üç boyutlu biyobaskı teknolojisinde çeşitli MKH'lerin kullanıldığı bilinmektedir (Moore ve ark., 2018). Bununla birlikte 3B biyobaskı aşamalarındaki biyomürekkep hazırlanması, çapraz bağlayıcılara maruz kalma, mekanik stres gibi etkenler hücre canlılığı ve fonksiyonlarında istenmeyen sonuçlara yol açabilmektedir (Jia ve ark., 2014). Düşük ROS seviyelerinin bir çok fizyolojik süreçte sinyal molekül olduğu bilinirken, yüksek ROS seviyelerinin de hücresel hasar ve fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu düşünülmektedir (Atashi ve ark., 2015). MKH'lerin düşük ROS seviyelerine ve başlıca hücresel antioksidan olan yüksek glutatyon seviyelerine sahip olduğu bilinmektedir (Valle-Prieto ve Conget, 2010). Bununla birlikte aşırı ROS yenilenmeyi, proliferasyonu ve farklılaşma kapasitesini bozabilmektedir (Alves ve ark., 2010). Antioksidanların ise MKH proliferasyonunu uyardığı bilinmektedir (Zou ve ark., 2004). Bununla birlikte 3B biyobaskıda MKH kullanımı için hücre proliferasyonunu teşfik etmek amacıyla dışardan antioksidan ilavesi yapmak 3B biyobaskıda MKH'lerin etkili kullanımına bir başka bakış açısı sunabilir. Oksidatif stresin MKH'ler üzerindeki etkisini gösteren birkaç makale bildirilmiştir. Fakat 3B biyobaskı teknolojisinin MKH'ler üzerinde yarattığı oksidatif strese etkisi hala bilinmemektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışması için 3B biyobaskı teknolojisi kullanılarak hücreli iskele basımında %8 ve %10 SA konsantrasyonlarında iki farklı biyomürekkep kullanılarak biyoyazıcıdan dalgalı ve ızgara olmak üzere iki farklı desende beş katmanlı iskeleler basılmıştır. SA konsantrasyonundaki farkın ve

3B biyobaskıdaki iskele desenlerinin MKH'ler üzerindeki canlılığa ve oksidatif strese etkisi olduğu düşünülmektedir.

Birçok çalışmada ROS ile antioksidan arasında ters korelasyon olduğu vurgulanmıştır. Dolayısıyla iAKH'lerdeki antioksidan enzimlerdeki gen ifadelerinin az olması OS çok olduğu, antioksidan gen ifadelerinin çok olması da OS daha az olduğunu düşündürmektedir. Gen ifadeleri ve yapılan çıkarımlar ters korelasyona göre analiz edilmiştir. 2B kültürdeki gen ifadeleri gen ifadelerinin normalizasyonu için kullanılmıştır. Antioksidan ve oksidan seviyelerindeki dengesizliğin sonucu olarak oksidatif stresin oluştuğu bilinmektedir. Antioksidan savunma sistemlerinin farklı seviyelerde hareket ettiği bilinmektedir. Bunlardan birinci savunma antioksidanları SOD, CAT ve GPX olmak üzere üç anahtar enzimden oluşmaktadır. *İn vitro* bir çalışmada, MKH'lerin oksidatif strese direnç gösterdiği ve bu direnç sonucu üretmiş olduğu SOD, GPX ve CAT gibi antioksidan enzimlerinin etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (Valle-Prieto ve Conget, 2010).

Mitokondri, oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünü olarak sürekli olarak düşük seviyelerde süperoksit anyon üretir ve bu daha sonra hızla H_2O_2'ye dönüştürülür. SOD1, hücre içi sitoplazmik boşluklarda bulunurken, SOD2 hücrelerin mitokondrisinde bulunan zararlı süperoksit radikallerini moleküler O_2 ve H_2O_2'e dönüştüren antioksidan enzimlerdir. CAT1, mitokondriden sitozole geçen H_2O_2'nin detoksifikasyonundan sorumludur. GPX1, mitokondri ve sitozoldeki daha düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2'nin parçalanmasında rol oynamaktadır. Bunların ROS oluşumunu baskılayan veya önleyen enzimler olduğu bilinmektedir. O halde bu enzimlerin üretimi ne kadar fazla ise ROS miktarının o kadar az olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte hipoksiye artan ROS üretiminin eşlik ettiği ve oksidatif stresi tetiklediği de bildirilmiştir (Smith ve ark., 2017). HIF-1α hipoksiye hücresel yanıt olarak ifade edilen bir transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi şartlarında aktive olduğu ve oksijen dengesinin geri kazanılmasına yardımcı olduğu bilinmektedir.

Üç boyutlu biyobaskıda %8 ve %10 SA konsantrasyonlarında hazırlanmış olan biyomürekkeplerle ızgara ve dalgalı desenlerdeki basım sonrası 1. ve 7. günlerde iskelelerden iAKH izolasyonu sonrası yapılan gen ifadesi analizi sonuçlarına göre; %8 SA baskı sonrası 1. günde SOD2 seviyesinin yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.6). Bunula birlikte %8 ve %10 SA konsantrasyonlu ızgara ve dalgalı desenli basımların 1. ve 7. günlerin de de SOD2 gen ifadesinin oldukça az olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.13). Oksidatif stres nedeniyle artan hücre içi ROS'un MKH'ler için SOD2 gen ifadesini azalttığı ve ardından apoptozu indüklediği bilinmektedir (Jung ve ark., 2015). Bu durum 3B biyobaskı sonrası SOD2 gen ifadesinin az miktarlarda olması sebebiyle 3B biyobaskı işlemlerinin oksidatif strese sebep olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte ROS üretimi ile antioksidan genler arasındaki ters korelasyon olduğu bilgisine dayanarak SOD1, CAT1 ve GPX1 gen ifadelerinin baskı sonrası 1. günde %8 SA dalgalı desenli iskelelerde ızgara desenlilere göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.6). Aynı zamanda eş zamanlı PCR sonuçları floresan boyama ile desteklenerek %8 SA baskı sonrası 1. günde ızgara desenli iskelelerde ölü hücre oranın dalgalı desenli iskelelerdekine göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.4). Sonuçları destekler nitelikte olan oksidatif stres boyama sonuçlarına bakıldığında ızgara desenli basımda DAPI/Cellrox oranının dalgalıya göre daha çok olduğu görülmüştür (Şekil 3.20). Beş katmanlı basılmış iskelelerde floresan ve oksidatif stres boyamada mikroskop netliği ayarlanmış katmandaki hücre sayısına göre analiz edilmiştir. Sonuç olarak, antioksidan genlerin ifadesinin %8 SA konsantrasyonlu basımın 1. günde dalgalı desende ızgaraya göre daha fazla olması dalgalı desenli basımın %8 SA konsantrasyonu için baskı sonrası 1. günde oksidatif stresi daha iyi tolere ettiğini düşündürmektedir.

%8 SA baskı sonrası 7. günde SOD2 seviyesinin yine yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.7). Bununla birlikte 7. gündeki SOD1 ve CAT1 gen ifadelerinin 1. gündeki gibi %8 SA dalgalı desenli iskelelerde ızgara desenlilere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. GPX1 gen ifadesinin ise ızgara desenli iskelelerde dalgalı desenlilere göre bir miktar daha fazla olduğu ve dalgalı desenli iskelelerde minimal seviyede GPX1 gen ifadesi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.7). CAT1'in daha kararlı H_2O_2 konsantrasyonlarını, GPX1'in ise düşük konsantrasyonlarda

mitokondri ve bazen de sitozoldeki H_2O_2'yi parçaladığı bilinmektedir. Bu sebeple GPX1 ifadesini bu durum için minimum düzeyde olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda %8 SA ızgara desenli basımdaki HIF-1α gen ifadesinin %8 SA dalgalı desenlidekinden daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 3.16). HIF-1α aktivasyonunun, mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin oluşumuna bağlı olduğu bilinmekle birlikte GPX1 gen ifadesindeki ızgara desenli basımda dalgalı desenden daha fazla ifade edilmiş olmasında %8 SA ızgara desenli basımdaki hipoksik koşullardan kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. %8 SA baskı sonrası 7. günün eş zamanlı PCR sonuçları floresan boyama ile desteklenerek 7. gündeki ızgara desenli iskelelerde ölü hücre oranın yine dalgalı desenli iskelelerdekine göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.4). Sonuç olarak, %8 SA iskele basımı sonrası 7. günde antioksidan genlerin ifadesinin dalgalı desende ızgaraya göre daha fazla olması dalgalı desenli basımın %8 SA konsantrasyonu için 7. günde de ızgara desenli basıma göre oksidatif stresi daha iyi tolere ettiğini düşündürmektedir. GPX1 gen ifadesinin ise ızgara desenli basımda dalgalı desenli basıma göre bir miktar fazla olması HIF-1α gen ifadesine bağlı olarak hipoksinin yaratmış olduğu ROS üretiminin artmış olabileceğinden artış olabileceğini düşündürmektedir.

%10 SA baskı sonrası 1. günde iskelelerden izole edilmiş iAKH'lerden yapılan gen ifadesi analizinde, SOD2 seviyesinin %8 SA iskelelerdeki gibi yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.8). Bununla birlikte %10 SA 1. günde SOD1, CAT1 ve GPX1 gen ifadelerinin dalgalı desenli iskelelerde ızgara desenlilere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.8). Eş zamanlı PCR sonuçları floresan boyama ile desteklenerek %10 SA baskı sonrası 1. günde ızgara desenli iskelelerdeki ölü hücre oranın dalgalı desenli iskelelerdekine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.5). Sonuçları destekler nitelikte %10 SA 1. günde oksidatif stres boyama sonuçlarına bakıldığında ızgara desenli basımda DAPI/Cellrox oranının dalgalıya göre daha çok olduğu görülmüştür (Şekil 3.21). Beş katmanlı basılmış iskelelerde floresan ve oksidatif stres boyamada mikroskop netliği ayarlanmış katmandaki hücrelere göre analiz edilmiştir. Analizlerde alt katmanlardaki floresanların da olduğu göz önüne alınarak bir katmana göre karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, %10 SA konsantrasyonlu

basımın 1. günde dalgalı desenli basımın, ızgara desenli basıma göre oksidatif stresi daha iyi tolere ettiğini düşündürmektedir.

%10 SA baskı sonrası 7. günde de SOD2 geninin neredeyse ifade edilmediği gözlenmiştir (Şekil 3.9). Bununla birlikte 7. gündeki SOD1, CAT1 ve GPX1 gen ifadelerinin %10 SA ızgara desenli iskelelerde dalgalı desenlilere göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.9). %10 SA baskı sonrası 7. günün eş zamanlı PCR sonuçları floresan boyama ile desteklenerek dalgalı desenli iskelelerde ölü hücre oranın ızgara desenli iskelelerdekine göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.5). Sonuç olarak, %10 SA 7. gün ızgara desenli iskelelerde antioksidan genlerin ifadelerinin dalgalı desenlilere göre daha fazla olması %10 SA konsantrasyonunda ızgara desenli iskele basımının oksidatif stresi daha iyi tolere ettiğini düşündürmektedir. Özellikle %10 SA ızgara desenli basımda CAT1 gen ifadesinin oldukça fazla olması ızgara desenli basımın yüksek konsantrasyonlarda oluşan H_2O_2'nin parçalanması bakımından dalgalıya oranla daha iyi olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte %10 SA 7. gündeki GPX1 ifadesinin de yine ızgara desende dalgalıya göre daha fazla olması mitokondri ve sitozoldeki daha düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2'nin parçalanması bakımından da ızgara desenli basımı ön plana çıkarmaktadır. Bu sonuçlara göre, 7. günde %10 SA baskıya ızgara desenli basımın daha adaptif olduğunu düşündürmektedir.

Izgara desenli %8 ve %10 SA konsantrasyonlu iki ayrı biyomürekkep ile baskı sonrası 1. günde yapılan analizlerde, her iki SA konsantrasyonu için de SOD1 gen ifadesinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Izgara desenli basımda %8 ve %10 SA her iki SA konsantrasyonunda da SOD2 gen ifadesinin benzer şekilde oldukça az ifade edildiği görülmüştür. Bununla birlikte CAT1 ve GPX1 gen ifadelerinin %8 SA konsantrasyonunda %10'a göre daha çok ifade edildiği görülmüştür (Şekil 3.10). %8 ve %10 SA ızgara desenli iskele basım sonrası 1. gün %10 SA'da %8 SA konsantrasyonlu ızgara desenli basıma göre daha fazla HIF-1α gen ifadesi olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.19). Sonuç olarak, ızgara desenli basım sonrası 1. günde HIF-1α gen ifadesinin daha az olması %8 SA konsantrasyonunun daha az hipoksi ortamı ve antioksidan genlerin ifadelerinin %10 SA'a göre daha fazla ifade edilmesi ızgara

desenli basım için 1. günde %8 SA konsantrasyonunun daha uygun olduğunu düşündürmektedir.

Dalgalı desenli %8 ve %10 SA konsantrasyonlu iki ayrı biyomürekkep ile baskı sonrası 1. günde yapılan analizlerde, SOD2 gen ifadesinin %8 ve %10 SA konsantrasyonlarının her ikisinde de oldukça az ifade edildiği görülmüştür. SOD1, CAT1 ve GPX1 genlerine bakıldığında basım sonrası 1. günde dalgalı desen için %10 SA'daki ifadelerinin %8 SA'a göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.11). %8 ve %10 SA dalgalı desenli iskele basımı sonrası 1. gün HIF-1α gen ifadesine bakıldığında %8 SA'da oldukça az olmasına rağmen %10 SA konsantrasyonunda daha fazla ifade edildiği görülmüştür (Şekil 3.20). Floresan boyama sonuçları eş zamanlı PCR sonuçlarındaki HIF-1α gen ifadesini desteklemektedir (Şekil 3.4, Şekil 3.5). %10 SA konsantrasyonunun hücrelere daha az gözenek sunması dolayısıyla da daha az oksijene erişimi açısından hipoksi şartlara bağlı olarak apoptoz kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Antioksidan genlerin ifadesi dalgalı desen 1. gün için %10SA'da %8 SA'dan daha fazla olsa da hipoksi şartlarıyla birlikte %10 SA konsantrasyonunda hücre ölümlerine sebep olduğu düşündürmektedir. Sonuç olarak, dalgalı desenli basım sonrası 1. gün için %10 SA konsantrasyonu oksidatif stresi %8SA konsantrasyonuna göre daha iyi tolere ettiği fakat hipoksi şartlarına bağlı hücre ölümüne sebep olduğu düşünülmektedir.

Üç boyutlu biyobaskı sonrası 7 günlük kültürde bekletilen 3B iskelelerin SOD1 gen ifadesi analizinde (Şekil 3.12), baskı sonrası 1. günde SOD1 gen ifadesinin en fazla %10 SA dalgalı desenli iskelerden izole edilen iAKH'lerde olduğu görülmüştür. 7. güne gelindiğinde SOD1 gen ifadesinin %10 SA dalgalı desende oldukça fazla azalmış olduğu görülmektedir. Bu da %10 SA dalgalı desen için gün geçtikçe hücrelerin koşullara adapte olamadığını, antioksidan üretiminin azalmasına bağlı ROS miktarındaki artışın dengelenemediğini ve bununla birlikte hücre içi sitoplazmik boşluklardaki süperoksit radikallerinin moleküler O_2 ve H_2O_2'e dönüştürülmesinde yetersiz kalmasıyla birlikte oksidatif stresin daha fazla olduğunu düşündürmektedir. %10 SA ızgara desenli basımda ise 1. gündeki gen ifadesine göre 7. günde daha fazla ifade edildiği görülmüştür. Gen ifadesinde güne bağlı olarak artış olması %10 SA

ızgara desenli basımın iAKH'ler için daha adaptif olabildiğini ve ROS üretiminin azaldığını düşündürmektedir. %10 SA konsantrasyonlu biyomürekkep ile dalgalı ve ızgara desenli 3B basım sonrası 1. ve 7. günlerdeki floresan boyama sonuçları eş zamanlı PCR sonuçlarındaki SOD1 gen ifadelerini desteklemektedir. %10 SA ızgara desenli basımda 1. güne göre 7. günde ölü hücre miktarında azalma görülürken, %10 SA dalgalı desenli basımda ise 1. güne göre 7. günde daha fazla ölü hücre görülmektedir (Şekil 3.5). %8 SA ızgara desenli basıma göre dalgalı desende 1. ve 7. günlerdeki SOD1 gen ifadesinin nispeten daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca %8 SA ızgara ve dalgalı desenlerin her ikisinde de gün geçtikçe 7. güne gelindiğinde SOD1 gen ifadesinde bir miktar azalış olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, %10 SA ile yapılan biyobaskıda ızgara desenli basımdaki hücrelerin gün geçtikçe ortama adapte olarak SOD1 gen ifadesinde artış olduğu dalgalı desenli basımdaki hücrelerin ise gün geçtikçe %10 SA ortamına adapte olamadığı için SOD1 gen ifadesinin azaldığı düşünülmektedir. Benzer şekilde HIF-1α gen ifadesi %10 SA ızgara desenli basımda 1. güne göre 7. günde HIF-1α ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 3.20). Bu durum %10 SA konsantrasyonundaki hipoksik koşullara bağlı oksidatif stresin meydana geldiğini düşündürmektedir. %8 SA ile yapılan biyobaskıda ise basım sonrası 1. günde ve 7. günde SOD1 ifadesinin en fazla dalgalı desenli iskelelerde olmasına dayanarak oksidatif stresi %8 SA dalgalı desenin daha iyi tolere ettiğini düşündürmektedir. Gün ilerledikçe her iki desende de gen ifadesinde azalma olmasını HIF-1α'nın ifadesinin artmasıyla birlikte ortam koşullarının artık hücreleri oksijensiz bıraktığını düşündürmektedir. SOD1 gen ifadesi bakımından güne bağlı olarak en iyi basım %10 SA ızgara desen olmakla birlikte %8 SA konsantrasyonu için dalgalı desenli basımın uygun olacağı düşünülmektedir.

Üç boyutlu biyobaskı sonrası 7 günlük kültürde bekletilen 3B iskelelerin SOD2 gen ifadesi analizinde (Şekil 3.13), baskı sonrası iAKH'lerde SOD2 gen ifadesinin oldukça az olduğu gözlenmiştir. SOD seviyesinin düşmesi serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). SOD2 oksidatif strese karşı korumada birincil rol oynamaktadır (Johnson ve Giulivi, 2005). Bu sebeple SOD2 gen ifadesinin genel olarak tüm gruplarda az olması 3B biyobaskının oksidatif stres oluşumuna büyük oranda sebep olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte %10 SA dalgalıdaki

SOD2 gen ifadesinin diğer gruplara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Fakat 7. güne gelindiğinde neredeyse yok denecek kadar azalmıştır. Buna bağlı olarak %10 SA dalgalı desende gün geçtikçe ROS üretiminin arttığını düşündürmektedir. %10 SA ızgara desenli basım için de yine 1. gündeki gen ifadesi 7. güne göre daha fazla olmakla birlikte günler ilerledikçe SOD2 ifadesinin azaldığı görülmüştür. %10 SA SOD2 gen ifadesi 1. günde dalgalı desende daha fazlayken 7. güne gelindiğinde dalgalı desende neredeyse ifade edilmezken ızgara desenle bir miktar ifade edildiği görülmüştür. %10 SA dalgalı desenli basımın 1. günde, ızgara desenli basımın ise 7. günde SOD2 gen ifadesi için daha etkin olduğu düşünülmektedir. %8 SA konsantrasyonlu baskı sonrası her iki baskı deseni için de 1. gün SOD2 ifadeleri daha fazla olmakla birlikte 7. güne gelindiğinde gen ifadesinin azaldığı görülmüştür. Baskı sonrası 1. günde %8 SA dalgalı desende gen ifadesi ızgaraya göre daha fazla iken 7. güne gelindiğinde tam tersi bir tabloyla karşılaşılmış dalgalı desen 7. günde gen ifadesinin ızgara desene göre çok daha az olduğu görülmüştür. Izgara desenli basımda %8 ve %10 SA HIF-1α'nın ifadesine baktığımızda %10 SA konsantrasyonunda hipoksiye bağlı olarak %8 SA'dan daha fazla olduğu bununla birlikte SOD2 gen ifadesinin ise ızgara desenli basım %10 SA konsantrasyonunda %8 SA'dan daha az ifade edildiği gözlenmiştir (Şekil 3.19). Bu durum SOD2 gen ifadesindeki azalmanın hipoksi kaynaklı olabileceğini ve %10 SA konsantrasyonunun hipoksi yarattığını düşündürmektedir. Sonuç olarak, hipoksi koşulları iAKH'lerde SOD2 gen ifadesinde azalmaya sebep olabileceği düşünülmektedir. SOD2 gen ifadesi 7. güne doğru azalış göstermiştir. Bu da gün geçtikçe %8 ve %10 SA her ikisinde de güne bağlı olarak ROS üretiminin arttığını düşündürmektedir. Bununla birlikte %8 ve %10 SA baskı sonrası 1. günde dalgalı desen ROS üretimini daha iyi tolere ederken, 7. günde ızgara desen daha iyi tolere ettiği düşünülmüştür. SOD2 gen ifadesi için gün ilerledikçe %8 ve %10 SA basımların her ikisinde de gen ifadesinde azalma olmasının yanında güne bağlı olarak %8 SA ızgara desenli basımın en ideal baskı koşulu olduğu düşünülmektedir.

Üç boyutlu biyobaskı sonrası 7 günlük kültürde bekletilen 3B iskelelerin CAT1 gen ifadesi analizinde (Şekil 3.14), %10 SA ızgara desenli basım 1. gündeki gen ifadesinin 7. güne gelindiğinde oldukça arttığı görülmektedir. Böylece %10 SA konsantrasyonlu ızgara basım için gün geçtikçe iAKH'lerin daha adaptif olduğu ve

buna bağlı olarak CAT1 gen ifadesindeki artış ile oksidatif stresin azaldığı düşünülmektedir. Eş zamanlı PCR sonuçları floresan boyama ile desteklenerek %10 SA ızgara desenli basımdaki ölü hücre yoğunluğunun 1. günde daha fazla olduğu görülmektedir. %10 SA dalgalı desenli basımda ise 1. güne göre 7. günde CAT1 gen ifadesinde azalma görülmektedir. Eş zamanlı PCR sonuçları floresan boyama ile desteklenerek %10 SA dalgalı desenli basım 7. gün ölü hücrelerin yoğunluğunun 1. günden daha yoğun olduğu görülmektedir (Şekil 3.5). Hipoksiye bağlı olarak HIF-1α ifadesine baktığımızda %10 SA ızgara desenli basımdaki 1. gün ifadesinin 7. günde azaldığı görülmüştür (Şekil 3.19). Bu azalmanın CAT1 gen ifadesinin 7. gündeki artışının etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. %8 SA dalgalı desenli basımda CAT1 gen ifadesnin ızgaradan fazla olduğu görülmektedir. Bununla birlikte %8 SA her iki desenli basımda da 7. güne gelindiğinde 1. güne göre gen ifadesinde artış görülmüştür. Sonuç olarak, CAT1 gen ifadesinin %8 SA konsantrasyonunda ızgara ve dalgalı desenli basımların ikisinde de 1. güne göre 7. günde artış olmuştur. %8 SA dalgalı desenli basımdaki CAT1 gen ifadesi 1. günde de 7. günde de ızgara desenli basımdan daha fazla olduğu görülmüştür. %8 SA konsantrasyonunda dalgalı desenli basım 1. ve 7. günde H_2O_2'nin yarattığı oksidatif stresi daha iyi detoksifiye ettiği düşünülmektedir. %10 SA basımda gün geçtikçe ızgara desenli baskıdaki hücrelerin ortama adapte olmasına bağlı olarak CAT1 gen ifadesinde artış olduğu düşünülmektedir. %10 SA dalgalı desenli basımda ise gün geçtikçe ROS miktarında artış olmasına bağlı olarak CAT1 gen ifadesinde azalma görülmektedir. %10 SA konsantrasyonlu ızgara desenli basımın H_2O_2'nin yarattığı oksidatif stresi daha iyi tolere ettiği düşünülmektedir. CAT1 gen ifadesi bakımından güne bağlı olarak %10 SA ızgara desenli basımın uygun olması ile birlikte yine güne bağlı olarak %8 SA konsantrasyonu için dalgalı desenli basımın iAKH'lerle 3B biyobaskı için en uygun olacağı düşünülmektedir.

Üç boyutlu biyobaskı sonrası 7 günlük kültürde bekletilen 3B iskelelerin GPX1 gen ifadesi analizinde (Şekil 3.15), %10 SA basım sonrası 1. günde dalgalı desenli iskelelerde ızgara desenliye göre daha fazla GPX1 geni ifade edildiği görülmüştür. 7. güne gelindiğinde ise %10 SA dalgalı desenlideki gen ifadesi azalırken, ızgara desenlideki gen ifadesinde artış olduğu görülmüştür. Bu da %10 SA biyobaskı için

ızgara desenli basımda hücrelerin gün ilerledikçe ortamdaki oksidatif strese daha adaptif olduğunu düşündürmektedir. Eş zamanlı PCR sonuçları floresan boyama ile desteklenmiştir. %8 SA biyobaskıda ise ızgara ve dalgalı desenli basımların her ikisinde de 7. güne gelindiğinde 1. güne göre GPX1 gen ifadesinin azaldığı görülmüştür. 1. gündeki gen ifadesinin dalgalı desenli basımın ızgaradan fazla olmasıyla birlikte 7. gündeki gen ifadesinin ikisinde de azalmış ancak ızagara desenli de dalgalıya göre daha fazla olduğu görülmüştür. Ölü hücre yoğunluğuna bakılarak eş zamanlı PCR sonuçları floresan boyama ile desteklenmiştir (Şekil 3.5). Sonuç olarak, güne bağlı olarak 7. güne gelindiğinde GPX1 gen ifadesi için %8 ve %10 SA her iki konsantrasyonlu biyomürekkepte 1. günde dalgalı desen daha iyiyken, 7. günde ızgara desenli basımın daha iyi olduğu düşünülmektedir. GPX1 gen ifadesi bakımından hem güne bağlı olarak hem de konsantrasyon açısından %10 SA ızgara desenli basımın en uygun olduğu düşünülmektedir.

HIF-1α'nın hipoksiye hücresel yanıt olarak hipoksik şartlarda aktive olduğu ve oksijen homeostazının geri kazanılmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Carmeliet ve ark., 1998; Laderoute ve ark., 2006). Buna dayanarak eş zamanlı PCR sonuçlarına bakıldığında 7 gün boyunca kültürde inkübe edilen %8 SA ızgara desenli basımın gün geçtikçe 7. güne gelindiğinde aktive olduğu görülmüştür (Şekil 3.16). Aynı şekilde %8 SA dalgalı desenli iskelelerde de HIF-1α gen ifadesinin 1. günde neredeyse yok denecek kadar az olmasıyla birlikte 7. güne gelindiğinde artış olduğu görülmüştür (Şekil 3.16). Bu durum %8 SA konsantrasyonlu basımlarda gün geçtikçe iskelelerde hipoksik durumla karşılaşıldığını ve beraberinde ROS üretimini tetiklediğini düşündürmektedir. %8 SA dalgalı desenli basımın hipoksi açısından değerlendirildiğinde daha az HIF-1α gen ifade edilmiş olmasına bağlı olarak daha iyi olduğunu düşündürmektedir. Basım sonrası 1. günde %10 SA konsantrasyonundaki desen farkına bakıldığında HIF-1α gen ifadesinin dalgalı desenliye göre ızgara desenlide daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.17). Bu da %10 SA ızgara desenli basımda hipoksi ortamının dalgalıdan daha fazla olduğunu düşündürmektedir. %10 SA konsantrasyonu için dalgalı desenli basımdaki HIF-1α gen ifadesinin ızgara desene göre daha az olmasını dalgalı desenli konsantrasyon farkıyla karşılaştırdığımızda ise %8 SA dalgalı desenli basımın 1. gün HIF-1α gen ifadesinin %10 SA

konsantrasyonundan daha az hatta neredeyse ifade edilmediği görülmektedir (Şekil 3.18). Sonuç olarak, 1. gün dalgalı baskı deseni kullanıldığında biyomürekkep SA konsantrasyonunun yoğunluğu %10 SA'a çıkarıldığında iskelelerdeki gözenekliliğin azalmasına bağlı olarak hipoksi şiddetinin arttığını düşündürmektedir. Izgara desenli biyobaskı için HIF-1α gen ifadesi, %8 SA 1. günde neredeyse yok denecek kadar az olmakla birlikte gün geçtikçe 7. günde artış gösterirken, %10 SA ızgara desen kullanımında konsantrasyona bağlı HIF-1α gen ifadesinin %8 SA'a göre fazla olmasına ile birlikte 7. güne gelindiğinde gen ifadesinde azalma olduğu görülmektedir (Şekil 3.19). Bu durumda SA konsantrasyonu arttığı ölçüde iskele gözenekliliğinin azalmış olmasına bağlı olarak oksijen yetersizliğine dayanan hipoksik koşulların oluştuğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak, Izgara desen basımında %10 SA kullanımında gün geçtikçe hücrelerin çevresel hipoksinin şiddetine uyum sağlayarak HIF-1α gen ifadesinin azaldığı, %8 SA kullanıldığında ise hipoksi şiddetine uyum sağlayamadığı için arttığı düşünülmektedir. Eş zamanlı PCR sonuçlarını destekler nitelikte floresan boyama sonuçlarında da %10 SA ızgara desen basımında 7. gündeki ölü hücrelerin 1. güne göre daha az olduğu %8 SA ızgara desen basımında ise 7. günde 1. güne göre ölü hücrelerin daha yoğun olduğu görülmektedir (Şekil 3.4, Şekil 3.5). Literatürde hipoksiye yanıt olarak apoptozun indüklenebildiği bildirilmiştir (Greijer ve Van Der Wall, 2004). Eş zamanlı PCR sonçlarını destekler nitelikteki floresan boyama sonuçları hipoksi kaynaklı apoptozun olduğunu düşündürmektedir. Hücrelerin %10 SA ızgara desen basımındaki çevresel strese adapte olarak 7. günde apoptoza direnç gösterdiği için ölü hücre yoğunluğunda azalma olduğu düşünülmektedir.

Literatürde 3B biyobaskı teknolojisinin yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki oksidatif strese etkisi üzerine araştırma bulunmamaktadır. Yapılan tüm analizler sonucunda ise 3B biyobaskı teknolojisinde kullanılan biyomürekkep konsantrasyonu ve baskı deseninin hücre canlılığına, antioksidan genlerin ifadesinde, hipoksi ve bunlara bağlı olarak iAKH'ler üzerinde oksidatif strese etkisi olduğu ortaya çıkmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri, 3B biyobaskı teknolojisinde farklı biyomürekkep ve farklı desende iskele basımı sonrası iskelelerde 7 gün boyunca kültüre edildikten sonra iskelelerden izole edilerek 3B biyobaskı teknolojisinin iAKH'ler üzerindeki oksidatif strese etkisi araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında, biyomürekkep olarak %8 ve %10 SA konsantrasyonları ile yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Üç boyutlu biyoyazıcıdan iskele basımı için ızgara ve dalgalı desenli baskı projeleri hazırlanmış ve 3B biyobaskı için kullanılmıştır. Üç boyutlu basılan her iskele beş katmandan oluşmaktadır. Yapılan analizlere bakıldığında, antioksidan savunma ağını oluşturan antioksidan genlerin ifadelerinin farklı seviyelerde hareket ettiği görülmüştür. Bununla birlikte temelde MKH'lerde yüksek antioksidan seviyeleri olduğu bilinmekte ve SOD2 gen ifadesinin oldukça az olması 3B biyobaskı teknolojisinin genel olarak iAKH'ler üzerinde oksidatif strese neden olduğunu düşündürmektedir. SOD seviyesinin düşmesi serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). SA Konsantrasyon değişiminin hipoksi koşullarını etkilediği görülmüştür. Bununla birlikte 3B biyobaskı teknolojisinin iAKH'ler ile etkili kullanımı için baskı koşullarının iyileştirilmesi ve düzenlenmesi gerekmektedir.

Tez çalışmasında 3B biyobaskı için SA konsantrasyonları %8 ve %10 olmak üzere iki farklı biyomürekkep kullanılmıştır. SA konsantrasyonu, basılabilirlik, kök hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasını yönlendirme, besin ve gazlar için geçirgenlik açısından oldukça önemlidir. Bu yüzden 3B biyobaskı teknolojisi kullanılarak %8 ve %10 SA ile ızgara ve dalgalı desenlerde basılan katmanlı iskelelerde gömülü olan iAKH'ler üzerindeki oksidatif strese etkisi bakımından gen ifadesi sonuçlarına göre değerlendirildiğinde, %8 SA konsantrasyonlu iskele basımı için 1. günde dalgalı desenli basım sonrası antioksidan genlerin ifadesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda biyomürekkep olarak %8 SA konsantrasyonu tercih edildiğinde HIF-1α gen ifadesinin 1. günde neredeyse ifade edilmediği

görülmüştür. Bu da %8 SA konsantrasyonunun 3B biyobaskı için hücrelein O_2'ne erişim açısından elverişli olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres boyama sonuçlarına göre %8 SA 1. günde ızgara desenli basım sonrası iAKH'lerde dalgalı desendeki hücrelere göre daha fazla oksidatif stres oluştuğu görülmüştür. Floresan boyama sonuçlarına göre de 1. günde ızgara desendeki ölü hücre yoğunluğu dalgalı desenden daha fazla olduğu görülmüş olup ızgara desenli basımın iAKH'ler üzerinde oksidatif stres kaynaklı hücre ölümleri olabileceği düşünülmüştür. 7. güne gelindiğinde %8SA dalgalı desenli basımdaki SOD1 ve CAT1 gen ifadelerinin ızgaraya göre daha fazla olduğu görülmüştür. GPX1 gen ifadesinde ızgara desenli basımda dalgalıya göre bir miktar fazla olmasını CAT1 genine göre daha düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 detoksifikasyonundan sorumlu olması dolayısıyla minimum düzeyde olduğu düşünülmektedir. SOD2 gen ifadesi ise %8 SA ızgara ve dalgalı desenli basımların her ikisinde de neredeyse yok denecek kadar az ifade edilmesinin yanında dalgalı desenli basımda ızgaraya göre çok daha az olduğu görülmüştür. %8 SA HIF-1α gen ifadesi dalgalıya göre ızgara desende daha fazla olması dolayısıyla hipoksinin ızgara desende daha fazla olduğu düşünülmüştür. Bu durum floresan boyama ile desteklenmiş ve %8 SA 7. günde ızgara desenli basımdaki ölü hücre yoğunluğunun dalgalıdan fazla olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, 3B biyobaskı teknolojisinde %8 SA konsantrasyonlu biyomürekkep kullanıldığında en iyi birinci savunma antioksidanlarının ifadesi ve minimum oksidatif stres ve hipoksi koşulları için en uygun basımın %8 SA dalgalı baskı deseni olduğu düşünülmektedir.

%10 SA konsantrasyonlu iskele basımı için 1. günde %8 SA konsantrasyonunda da olduğu gibi dalgalı desenli basım sonrası antioksidan genlerin ifadesinin ızgara desenliden daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda %10 SA 1. günde HIF-1α gen ifadesinin dalgalı desenli basımda ızgaraya göre daha az olmadı hipoksinin de yine dalgalı desenli basımda daha az olduğunu düşündürmüştür. 1. gün %10 SA floresan boyama sonuçlarında da ızgara desenli basım sonrası ölü hücre yoğunluğunun dalgalıdan daha fazla olduğunu görülmüştür. Oksidatif stres boyama sonuçlarına göre de %10 SA 1. günde ızgara desenli basım sonrası iAKH'lerde dalgalı desendeki hücrelere göre daha fazla oksidatif stres oluştuğu görülmüştür. 7. güne gelindiğinde ise antioksidan gen ifadelerinin ızgara desenli basımda daha yüksek olduğu

görülmüştür. Bununla birlikte %10 SA ızgara desenli basımın 1. güne göre 7. gündeki HIF-1α gen ifadesinin azalmış olması gün geçtikçe ızgara desenli baskıdaki iAKH'lerin ortama daha iyi adapte olduğunu göstermektedir. Floresan boyama sonuçlarına göre 7. günde %10 SA dalgalı desenli basımdaki ölü hücre yoğunluğunun daha fazla olması ızgara desenli basımın iAKH'ler için daha iyi baskı ortamı sunduğunu göstermektedir. Oksidatif stres boyama sonuçlarına göre ise %10 SA konsantrasyonlu basımın ızgara ve dalgalı desenlerin her ikisi içinde MKH'ler üzerinde bir miktar oksidatif stres oluşturduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, 3B biyobaskı teknolojisinde %10 SA konsantrasyonlu biyomürekkep kullanıldığında en iyi birinci savunma antioksidanlarının ifadesi ve minimum oksidatif stres ve hipoksi koşulları için en uygun basımın 1. gün için %10 SA dalgalı baskı deseni olduğu düşünülmektedir. 7. günde ise %10 SA ızgara desenli baskıdaki iAKH'lerin gün geçtikçe %10 SA ızgara desenli iskele ortamına uyum sağladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte 3B biyobaskı için hücrelerin besin ve oksijen ulaşımı açısından, %8 SA konsantrasyonunun daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. 3B biyobaskısı yapılmış iAKH'lerin 7. gündeki ortama uyumu ya da antioksidan gen ifadelerindeki değişimlerin SA konsantrasyon farkından ya da baskı deseni kaynaklı olabileceği de düşünülerek iAKH'lerde meydana gelmiş başka bir soydan hücreye farklılaşma sonucu da olabileceği göz ününe alınarak farklılaşma deneyleri yapılarak gelecekte 3B biyobaskının iAKH'ler üzerindeki etkisi için analizler genişletilebilir. Gelecekte MKH'lerin 2B kültürde dokuya özgü farklılaştırılmış hücrelerin 3B biyobaskıda kullanımı ile ya da MKH'lerin 3B biyobaskısı yapılmış iskelelerde kapsüllenmiş haldeyken 3B iskelelere gerekli uyaranların eklenmesi ile farklılaştırıldıktan sonra doku yenilenmesi hazır farklılaştırılmış greftler kullanımı şeklinde de çeşitli yaklaşımlar geliştirilebilir. Dahası bu aşamada 3B biyobaskı teknolojisi MKH farklılaşması için bir uyaran olarak da kullanılabilir.

Üç boyutlu biyobaskı teknolojisi, doku mühendisliği ve yenileyici tıp açısından gelişimini devam ettirmekle birlikte oldukça önem taşımaktadır. Üç boyutlu biyobaskı, kök hücre kullanımının eşsiz özellikleri ile kullanıldığında hücreler için optimum koşullar sağlanarak ilerde *in vitro, in vivo* ve *ex vivo* çalışmalar için de yol gösterici nitelikte olacaktır. *İn vitro* bir çalışmada, MKH'nin oksidatif strese karşı

dirençli olduğu ve gösterdiği bu dirençte üretmiş olduğu SOD, GPX ve CAT gibi antioksidan enzimlerin etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (Valle-Prieto ve Conget, 2010). İlerde doku ve organ yenilenmesi için yapılacak 3B biyobaskı uygulamarında dışardan iskele veya baskı ortamlarına antioksidan ilavesi ile MKH'lerin 3B biyobaskı koşullarının yaratmış olduğu strese daha iyi adapte olması ile birlikte stres direnci arttırılarak etkinliği yükseltilebilen yaklaşımlar sunma imkanı sağlanabilir.

Bazı çalışmalarda iAKH'lerin oksijen konsantrasyonlarına çok duyarlı olduğunu (Eto ve ark., 2012), bununla birlikte hipoksnin, HIF-1α aktivasyonu ile iAKH'lerin çoğalmasını (Kakudo ve ark., 2015) ve iAKH'lerin tenosit farklılaşmasını artırdığı gösterilmiştir (Yang Yu ve ark., 2016). İnsan MKH'lerinde osteogenezin *in vitro* indüksiyonu, mtDNA kopya sayısı, solunum enzimlerinin protein alt birimleri, SOD2, katalaz oksijen tüketim oranı, ROS'da bir azalma ve antioksidan enzimlerin yukarı regülasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2008). SOD, CAT ve GPX gibi antioksidan enzimlerin iAKH'lerinde adipogenez sırasında yukarı regüle edildiği de bilinmektedir (Higuchi ve ark., 2012). SOD2 ve CAT, iAKH'lerini modifiye ederek intervertebral disk dejenerasyonunun patolojik koşullarını iyileştirdiği bildirilmiştir (Xiao ve ark., 2021). Tüm bunlardan yola çıkarak oksidatif stresi azaltma ya da greft transplantasyonu gibi uygulamalar için patalojik koşulları iyileştirmede daha etkili çözümler sunan yaklaşımlar değerlendirilebilir. İlerde 3B biyobaskı sonrası veya baskı sırasında ilgili doku yenilenmesini uyaracak antioksidan ilaveleri ile 3B biyobaskı ile üretilen iskelelerin doku ve organ yenilenmesini uyarıcı çeşitli bakış açıları sunma imkanı sağlayabilir. Nanokristalin hidroksiapatit, kemik hücre dışı matrisindeki birincil mineral bileşendir ve mükemmel biyouyumluluğu ve biyomimikrisi nedeniyle kemik ve diş gibi sert doku rejenerasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. nHA'nın, diğer birçok implant materyal ile karşılaştırıldığında, MSC'nin osteogenez farklılaşmasını indüklediği ve biyomineralizasyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2016). Gelecekte ilgili dokuya özgü hücrelerin üretimi ve kullanımında 3B biyobaskı ve polimer kullanımı MKH farklılaşmasını indüklemek için de iyi bir strateji olarak kullanılabilir.

Antioksidanların, uzun süreli *in vitro* genişleme sırasında iAKH çoğalmasını teşvik etiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Liao ve ark., 2019). Bununla birlikte iAKH'ler tarafından indüklenen aşırı ROS üretiminin, *in vitro* genişleme sırasında antioksidanlar tarafından etkili bir şekilde inhibe edilebileceği bildirilmiştir. Birlikte ele alındığında, antioksidanların uzun vadeli genişlemede primer kültürden iAKH'lerin hücre işlevlerini koruma üzerindeki umut verici etkisini vurgulanmıştır. Gelecekte hücre hattı yerine primer kültürden elde edilmiş iAKH'lerin 3B biyobaskı sonrası ROS üretimi ve antioksidan etkisi için antioksidanların üretimi lehine daha etkili baskı için bir başka bakış açısı olabilir.

Bazı çalışmalarda, aljinat-jelatin hidrojellerinin mekanik özellikleri ayarlanabilirliği ve basılabilirliği ve geometrik doğruluğu artırmak için uyarlanabilirliği gösterilmiş ve istenilen mekanik özellikleri, ekstrüzyona dayanan biyobaskı özelliklerini ve yeterli hücre canlılığını sağlayan optimum bir karışım belirlenmiştir (Giuseppe ve ark., 2018). Tezde araştırılan %8 ve %10 SA konsantrasyonuları daha farklı oranlarda ayarlanarak ya da farklı polimerlerin kullanımı ile ayarlanabilirliği, basılabilirliği ve hücre canlılığı ve oksidatif stres üzerine farklı etkileri gelecekte incelenerek farklı yaklaşımlar geliştirilebilir. Bununla birlikte gelecekte üretilecek dokuya özgü başka polimerler de kullanılarak ya da birden fazla polimerin karışımı ile bir biyomürekkep hazırlanarak da baskı iskeleleri üretilebilir.

3B biyobaskı teknolojisi ile basılan iskelelerin doku mühendisliğinin hangi alanı ya da hangi doku için kullanılacağına bağlı olarak biyomürekkep konsantrasyonunun ayarlaması minimum ROS, optimum antioksidan üretimi açısından ve besin, gaz alışverişine uygun nişler oluşturmak için oldukça önem arz etmektedir. İskele baskı deseni seçimi ise kullanılacak hücre seçiminde, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve ROS üretimi açısından değerlendirerek ve buna uygun baskı deseni seçmekte oldukça önemlidir.

ÖZET

Üç Boyutlu Biyobaskı Teknolojisinin Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki Oksidatif Strese Etkisi

Doku mühendisliği ve yenileyici tıp, hasarlı veya yaralı dokuların iyileştirilebilmesi için umut vadetmektedir. Üç boyutlu biyobaskı, biyouyumlu malzemelere, hücrelere ve destekleyici bileşenlere uygulanmasına izin vererek doğal organları ve dokuları taklit etmek için karmaşık doku yapıları geliştirmek için oldukça kullanılan en yeni teknolojilerden biridir. Kök hücreler, kendi kendine çoğalma ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma gibi yeteneklere sahip olduklarından, biyobaskı sırasında kullanılan diğer hücre türlerine kıyasla daha önemli faydalar sunarlar. Biyouyumlu malzemeler olarak hidrojeller, 3B biyobaskı teknolojisinde hücreyi yüklemede biyomürekkep olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Aljinat, biyouyumlu olması, doğal yapısının yumuşak olması, yüksek su içeriği, kütle taşıma özelliği, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını teşfik edebilmesi nedeniyle kök hücre kültürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, doku mühendisliği yapılacak olan yapı iskeleleri hazırlamak için aljinat hidrojellerin yapısı, mekanik özellikleri ve şekil uygunluğunun kontrol edilmesi oldukça zordur. Oksidatif stres, reaktif oksijen ve azot türlerinin düzenli olmayan üretimi veya düzensiz atılması ile karakterize edilmektedir. Üç boyutlu biyobaskıda, serbest radikallerin üretimi ve birikmesi, DNA, protein ve lipidler başta olmak üzere tüm biyomoleküllere zarar verebilmektedir. Bu yüzden, 3B biyobaskıda kullanılacak olan MKH'lerin oksidatif stresinin incelenmesi, MKH'lerin genişlemesi, engraftmanı, işlevi ve uzun ömürlü olabilmeleri için gelişimi zorunlu kılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, 3B biyobaskı ile aljinat biyomürekkep konsantrasyon farkı ve biyobaskı desen farkının mezenkimal kök hücreler üzerindeki oksidatif strese etkisi incelenmiştir. Ticari olarak satın alınan ve *in vitro* koşullarda iki boyutlu kültür ortamında yetiştirilen insan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile birlikte %8 ve %10 SA olmak üzere iki farklı konsantrasyonda sodyum aljinat ile biyomürekkepler hazırlanarak 3B biyobaskı için kullanılmıştır. Üç boyutlu biyoyazıcılardan ızgara ve dalgalı desen projeleri kullanılarak beş katmanlı iskeleler basılmıştır. İskele üzerindeki hücrelerin 1. ve 7. günlerde oksidatif stres ve floresan boyama yöntemleri kullanılarak oksidatif stres ve canlılık analizi yapılmıştır. Basım sonrası hücreli iskeleler 7 gün kültürde bekletildikten sonra iskelelerden sodyum sitrat ile hücre izolasyonu yapılmış ve izole edilen hücrelerden eş zamanlı PCR kullanılarak HIF-1α ve antioksidan genlerin (SOD1, SOD2, CAT1, GPX1) ifadelerinin analizi yapılmıştır. Sonuç olarak, 3B biyobaskı teknolojisinin iAKH'ler üzerindeki oksidatif strese ve hücre canlılığı üzerine etkisi olmuştur. Izgara ve dalgalı desen basımının yanı sıra biyomürekkepteki SA konsantrasyonu iAKH'lerdeki antioksidan genlerin ifadesinde farklılığa sebep olmuştur. Aynı zamanda SA konsantrasyon farkı hipoksiye sebep olmuştur. Yapılan bu tez çalışması, doku mühendisliği ve yenileyici tıp alanında kullanılmak üzere hücreli 3B doku iskelelerinin etkili basımı ve uygulanabilmesi için daha fazla bilgi edinmemizi ve yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Anahtar Sözcükler: 3B Biyobaskı, Doku Mühendisliği, Mezenkimal Kök Hüre, Oksidatif Stres, Sodyum Aljinat.

SUMMARY

The Effect of Three Dimensional Bioprinting Technology on Oxidative Stress of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells

Tissue engineering and regenerative medicine show promise for healing damaged or injured tissues. Three-dimensional bioprinting is one of the newest technologies highly used to develop complex tissue structures to mimic natural organs and tissues, allowing it to be applied to biocompatible materials, cells and supporting components. Because stem cells have the ability to self-replicate and differentiate into specialized cells, they offer more significant benefits compared to other cell types used during bioprinting. As biocompatible materials, hydrogels are widely used as bioinks to load the cell in 3D bioprinting technology. Alginate is widely used in stem cell cultures due to its biocompatibility, soft nature, high water content, mass transport feature, and ability to promote cell proliferation and differentiationHowever, it is very difficult to control the structure, mechanical properties and shape conformity of alginate hydrogels to prepare scaffolds to be tissue engineered. Oxidative stress is characterized by the irregular production or irregular removal of reactive oxygen and nitrogen species. In three-dimensional bioprinting, the production and accumulation of free radicals can damage all biomolecules, especially DNA, protein and lipids. Therefore, examining the oxidative stress of MSCs to be used in 3D bioprinting necessitates the development of MSCs for their expansion, engraftment, function and longevity.

In this thesis, the effect of 3D bioprinting and alginate bioink concentration difference and bioprinting pattern difference on oxidative stress on mesenchymal stem cells was investigated. For 3D bioprinting, bioinks are prepared with two different concentrations of sodium alginate, 8% and 10% SA, together with commercially purchased human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells grown in two-dimensional culture medium in vitro. used. 5-layer scaffolds were printed using grid and wavy pattern projects from 3D bioprinters. Oxidative stress and viability analyzes of the cells on the scaffold were performed on the 1st and 7th days using oxidative stress and fluorescent staining methods. After the cell scaffolds were kept in culture for 7 days after printing, cell isolation was made from the scaffolds with sodium citrate and the expressions of HIF-1α and antioxidant genes (SOD1, SOD2, CAT1, GPX1) were analyzed using simultaneous PCR from the isolated cells. In conclusion, 3D bioprinting technology had an effect on oxidative stress and cell viability on iAKHs. Besides the printing of grid and wavy patterns, the SA concentration in the bioink caused differences in the expression of antioxidant genes in iAKHs. At the same time, SA concentration difference caused hypoxia. This thesis study is important in terms of obtaining more information and developing new treatment approaches for the effective printing and application of cellular 3D tissue scaffolds for use in tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: 3D Bioprinting, Mesenchymal Stem Cell, Oxidative Stress, Sodium Alginate, Tissue Engineering.

KAYNAKLAR

ABOUNA G M (2008). Organ Shortage Crisis: Problems and Possible Solutions. *Transplantation Proceedings*, **40(1):** 34–38.

AHN S, LEE H, BONASSAR L J, KIM G (2012). Cells (MC3T3-E1)-Laden Alginate Scaffolds Fabricated by a Modified Solid-Freeform Fabrication Process Supplemented with an Aerosol Spraying. *Biomacromolecules*, **13(9):** 2997–3003.

ALJOHANI W, ULLAH M W, ZHANG X, YANG G (2018). Bioprinting and its applications in tissue engineering and regenerative medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*, **107:** 261–275.

ALVES H, MUNOZ-NAJAR U, DE WIT J, RENARD A J S, HOEIJMAKERS J H J, SEDIVY J M, VAN BLITTERSWIJK C, DE BOER J (2010). A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **14(12):** 2729–2738.

ANANTHANARAYANAN A, NARMADA B C, MO X, MCMILLIAN M, YU H (2011). Purpose-driven biomaterials research in liver-tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, **29(3):** 110–118.

ARAUJO J V, DAVIDENKO N, DANNER M, CAMERON R E, BEST S M (2014). Novel porous scaffolds of pH responsive chitosan/carrageenan-based polyelectrolyte complexes for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, **102(12):** 4415–4426.

ARTHUR A, RYCHKOV G, SHI S, KOBLAR S A, GRONTHOS S (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, **26(7):** 1787–1795.

ATASHI F, MODARRESSI A, PEPPER M S (2015). The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. *Stem Cells and Development*, **24(10):** 1150–1163.

AUGST A D, KONG H J, MOONEY D J (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, **6(8):** 623–633.

BAJAJ P, SCHWELLER R M, KHADEMHOSSEINI A, WEST J L, BASHIR R (2014). 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **16(1):** 247–276.

BAPTISTA P M, ORLANDO G, MIRMALEK-SANI S-H, SIDDIQUI M, ATALA A, SOKER S (2009). Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference*, **2009:** 6526–6529.

BARANSKI J D, CHATURVEDI R R, STEVENS K R, EYCKMANS J, CARVALHO B, SOLORZANO R D, YANG M T, MILLER J S, BHATIA S N, CHEN C S (2013). Geometric control of vascular networks to enhance engineered tissue integration and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110(19):** 7586–7591.

BARRON J A, RINGEISEN B R, KIM H, SPARGO B J, CHRISEY D B (2004). Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films*, **453–454:** 383–387.

BEHONICK D J, WERB Z (2003). A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte. *Mechanisms of Development*, **120(11):** 1327–1336.

BERTASSONI L E, CECCONI M, MANOHARAN V, NIKKHAH M, HJORTNAES J, CRISTINO A L, BARABASCHI G, DEMARCHI D, DOKMECI M R, YANG Y, KHADEMHOSSEINI A (2014). Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab on a Chip*, **14(13):** 2202–2211.

BERTHIAUME F, MAGUIRE T J, YARMUSH M L (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, **2:** 403–430.

BINDER K W, ZHAO W, ABOUSHWAREB T, DICE D, ATALA A, YOO J J (2010). In situ bioprinting of the skin for burns. *Journal of the American College of Surgeons*, **211(3):** S76.

CALVERT P (2007). Printing Cells. *Science,* **318(5848):** 208-209.

CAPLAN A I (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*, **213(2):** 341–347.

CARMELIET P, DOR Y, HERBERT J M, FUKUMURA D, BRUSSELMANS K, DEWERCHIN M, NEEMAN M, BONO F, ABRAMOVITCH R, MAXWELL P, KOCH C J, RATCLIFFE P, MOONS L, JAIN R K, COLLEN D, KESHERT E (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, **394(6692):** 485–490.

CARROW J K, KERATIVITAYANAN P, JAISWAL M K, LOKHANDE G, GAHARWAR A K (2015). Polymers for bioprinting. A. Atala & J. J. B. T.-E. of 3D B. and T. Yoo (eds.). *IN ESSENTİALS OF 3D BİOFABRİCATİON AND TRANSLATİON.* Chapter 13, p. 229–248. Elsevier Inc.

CASTRO N J, O'BRIEN J, ZHANG L G (2015). Integrating biologically inspired nanomaterials and table-top stereolithography for 3D printed biomimetic osteochondral scaffolds. *Nanoscale*, **7(33):** 14010–14022.

CHANG R, NAM J, SUN W (2008). Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. *Tissue Engineering. Part A*, **14(1):** 41–48.

CHEN C-T, SHIH Y-R V, KUO T K, LEE O K, WEI Y-H (2008). Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*, **26(4):** 960–968.

CHEN Z, CHANG M, PENG Y, ZHAO L, ZHAN Y (2007). *Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP (10 – 14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes*. **142:** 16–23.

CHOO K B, TAI L, HYMAVATHEE K S, WONG C Y, NGUYEN P N N, HUANG C-J, CHEONG S K, KAMARUL T (2014). Oxidative Stress-Induced Premature Senescence in Wharton. *International Journal of Medical Sciences.* **11(11):** 1201-1207.

CHRISTENSEN K, XU C, CHAI W, ZHANG Z, FU J, HUANG Y (2015). Freeform inkjet printing of cellular structures with bifurcations. *Biotechnology and Bioengineering*, **112(5):** 1047–1055.

COLOSI C, SHIN S R, MANOHARAN V, MASSA S, COSTANTINI M, BARBETTA A, DOKMECI M R, DENTINI M, KHADEMHOSSEINI A (2016). Microfluidic Bioprinting of Heterogeneous 3D Tissue Constructs Using Low-Viscosity Bioink. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, **28(4):** 677–684.

COSSU G, BIRCHALL M, BROWN T, COPPI P DE, CULME-SEYMOUR E, GIBBON S, HITCHCOCK J, MASON C, MONTGOMERY J, MORRIS S, MUNTONI F, NAPIER D, OWJI N, PRASAD A, ROUND J, SAPRAI P, STILGOE J, THRASHER A, WILSON J (2017). The Lancet Commissions Lancet Commission : Stem cells and regenerative medicine. *The Lancet*, **6736(17):** 2–4.

D'AUTRÉAUX B, TOLEDANO M B (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8(10):** 813–824.

DABABNEH A B, OZBOLAT I T (2014). Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, **136(6):**148-163.

DATTA S (2020). Importance of Alginate Bioink for 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. R. Barua (ed.). *IN ALGINATES - RECENT USES OF THIS NATURAL POLYMER.* Chapter 7. IntechOpen.

DE CAMARGO BITTENCOURT R A, PEREIRA H R, FELISBINO S L, FERREIRA R R, GUILHERME G R B, MOROZ A, DEFFUNE E (2009). Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. *Acta Ortopedica Brasileira*, **17(4):** 242–246.

DE COPPI P, BARTSCH G, SIDDIQUI M M, XU T, SANTOS C C, PERIN L, MOSTOSLAVSKY G, SERRE A C, SNYDER E Y, YOO J J, FURTH M E, SOKER S, ATALA A (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, **25(1):** 100–106.

DECKARD C R, ROCK R, JOSEPH J (1992). *Method for Selective Laser Sintering With Layerwise Cross-Scanning*. **1992:** 10-13.

DENU R A, HEMATTI P (2016). *Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology*. **2016:** 2989076.

DERBY B (2012). Printing and Prototyping of Tissues and Scaffolds. *Science*, **338(6109):** 921–926.

DERGISI T, ATE U (2016). *Kök hücreyi tanıyalım Let ' s familiarize ourselves with the stem cell*. **1(1):** 19–28.

DEVILLARD R, PAGÈS E, CORREA M M, KÉRIQUEL V, RÉMY M, KALISKY J, ALI M, GUILLOTIN B, GUILLEMOT F (2014). Cell patterning by laser-assisted bioprinting. *Methods in Cell Biology*, **119**: 159–174.

DISCHER D E, JANMEY P, WANG Y L (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, **310(5751):** 1139–1143.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP D, HORWITZ E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **8(4):** 315–317.

DRINGEN R, PAWLOWSKI P G, HIRRLINGER J (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research*, **79(1-2):** 157–165.

DUAN B, HOCKADAY L A, KANG K H, BUTCHER J T (2013). 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, **101(5):** 1255–1264.

DUOCASTELLA M, COLINA M, FERNÁNDEZ-PRADAS J M, SERRA P, MORENZA J L (2007). Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting. *Applied Surface Science*, **253(19):** 7855–7859.

ETO H, KATO H, SUGA H, AOI N, DOI K, KUNO S, YOSHIMURA K (2012). The Fate of Adipocytes after Nonvascularized Fat Grafting: Evidence of Early Death and Replacement of Adipocytes. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **129(5).**

FATTMAN C L, SCHAEFER L M, OURY T D (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine*, **35(3):** 236–256.

FEDOROVICH N E, DE WIJN J R, VERBOUT A J, ALBLAS J, DHERT W J A (2008). Three-dimensional fiber deposition of cell-laden, viable, patterned constructs for bone tissue printing. *Tissue Engineering. Part A*, **14(1):** 127–133.

FEDOROVICH N E, SCHUURMAN W, WIJNBERG H M, PRINS H-J, VAN WEEREN P R, MALDA J, ALBLAS J, DHERT W J A (2011). Biofabrication of Osteochondral Tissue Equivalents by Printing Topologically Defined, Cell-Laden Hydrogel Scaffolds. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **18(1):** 33–44.

FITZSIMMONS R E B, MAZUREK M S, SOOS A, SIMMONS C A (2018). Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells International*, **2018:** 8031718.

FOYT D A, NORMAN M D A, YU T T L, GENTLEMAN E (2018). Exploiting Advanced Hydrogel Technologies to Address Key Challenges in Regenerative Medicine. *Advanced Healthcare Materials*, **7(8)**.

FRASER J K, WULUR I, ALFONSO Z, HEDRICK M H (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **24(4):** 150–154.

FREEMAN F E, KELLY D J (2017). Tuning Alginate Bioink Stiffness and Composition for Controlled Growth Factor Delivery and to Spatially Direct MSC Fate within Bioprinted Tissues. *Scientific Reports*, **September:** 1–12.

FRIDOVİCH I (1995). Superoxıde radıcal and superoxıde dısmutases. *Annual Review of Biochemistry*, **64(1):** 97–112.

FUHRMANN D C, BRUNE B (2017). Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biology*, **12:** 208–215.

GAO F, CHIU S M, MOTAN D A L, ZHANG Z, CHEN L, JI H-L, TSE H-F, FU Q-L, LIAN Q (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death & Disease*, **7(1):** e2062–e2062.

GARIBOLDI M I, BEST S M (2015). Effect of Ceramic Scaffold Architectural Parameters on Biological Response. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **3:** 151.

GIMBLE J M (2003). Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **3(5):** 705–713.

GIMBLE J M, KATZ A J, BUNNELL B A (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, **100(9):** 1249–1260.

GIUSEPPE M DI, LAW N, WEBB B, A. MACRAE R, LIEW L J, SERCOMBE T B, DILLEY R J, DOYLE B J. (2018). Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *In Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **79:** 150–157.

GLICKLIS R, SHAPIRO L, AGBARIA R, MERCHUK J C, COHEN S (2000). Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, **67(3):** 344–353.

GOPFERICH A (1996). Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, **17(2):** 103–114.

GOPINATHAN J, NOH I (2018). *Recent trends in bioinks for 3D printing*. **22(11):** 1–15.

GOU M, QU X, ZHU W, XIANG M, YANG J, ZHANG K, WEI Y, CHEN S (2014). Bio-inspired detoxification using 3D-printed hydrogel nanocomposites. *Nature Communications*, **5:** 3774.

GREIJER A E, VAN DER WALL E (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of Clinical Pathology*, **57(10):** 1009–1014.

GU Q, HAO J, LU Y, WANG L, WALLACE G G, ZHOU Q (2015). Three-dimensional bio-printing. *Science China Life Sciences*, **58(5):** 411–419.

HIGUCHI M, DUSTING G J, PESHAVARIYA H, JIANG F, HSIAO S T-F, CHAN E C, LIU G-S (2012). Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into Fat Involves Reactive Oxygen Species and Forkhead Box O1 Mediated Upregulation of Antioxidant Enzymes. *Stem Cells and Development*, **22(6):** 878–888.

HOPP B, SMAUSZ T, KRESZ N, BARNA N, BOR Z, KOLOZSVÁRI L, CHRISEY D B, SZABÓ A, NÓGRÁDI A (2005). Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. *Tissue Engineering*, **11(11–12):** 1817–1823.

HORN T J, HARRYSSON O L A (2012). Overview of current additive manufacturing technologies and selected applications. *Science Progress*, **95(3):** 255–282.

HOU R, NIE L, DU G, XIONG X, FU J (2015). Natural polysaccharides promote chondrocyte adhesion and proliferation on magnetic nanoparticle/PVA composite hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **132:** 146–154.

HULL C W (1984). Apparatus for Production of Three-Dmensonal Objects By Stereo Thography. *Patent*, **19:** 16.

HUNT N C, GROVER L M (2010). Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. *Biotechnology Letters*, **32(6):** 733–742.

HUTMACHER D W (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, **21(24):** 2529–2543.

IGHODARO O M, AKINLOYE O A (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, **54(4):** 287–293.

IKADA Y (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, **3(10):** 589–601.

INGBER D E, MOW V C, BUTLER D, NIKLASON L, HUARD J, MAO J, YANNAS I, KAPLAN D, VUNJAK-NOVAKOVIC G (2006). Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic. *Tissue Engineering*, **12(12):** 3265–3283.

ITO K, HIRAO A, ARAI F, MATSUOKA S, TAKUBO K, HAMAGUCHI I, NOMIYAMA K, HOSOKAWA K, SAKURADA K, NAKAGATA N, IKEDA Y, MAK T W, SUDA T (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, **431(7011):** 997–1002.

IZADPANAH R, TRYGG C, PATEL B, KRIEDT C, DUFOUR J, GIMBLE J M, BUNNELL B A (2006). Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, **99(5):** 1285–1297.

JAKAB K, NEAGU A, MIRONOV V, MARKWALD R R, FORGACS G (2004). Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101(9):** 2864–2869.

JAKAB K, NOROTTE C, MARGA F, MURPHY K, VUNJAK-NOVAKOVIC G, FORGACS G (2010). Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication*, **2(2):** 22001.

JANG J, YI H-G, CHO D-W (2016). 3D Printed Tissue Models: Present and Future. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2(10):** 1722–1731.

JIA J, RICHARDS D J, POLLARD S, TAN Y, RODRIGUEZ J, VISCONTI R P, TRUSK T C, YOST M J, YAO H, MARKWALD R R, MEI Y (2014). Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomaterialia*, **10(10):** 4323–4331.

JIA W, GUNGOR-OZKERIM P S, ZHANG Y S, YUE K, ZHU K, LIU W, PI Q, BYAMBAA B, DOKMECI M R, SHIN S R, KHADEMHOSSEINI A (2016). Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials*, **106:** 58–68.

JOHNSON F, GIULIVI C (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, **26(4–5):** 340–352.

JUNG K H, HAN D M R, JEONG S-G, CHOI M R, CHAI Y G, CHO G-W (2015). Proteomic analysis reveals KRIT1 as a modulator for the antioxidant effects of valproic acid in human bone-marrow mesenchymal stromal cells. *Drug and Chemical Toxicology*, **38(3):** 286–292.

KAKUDO N, MORIMOTO N, OGAWA T, TAKETANI S, KUSUMOTO K (2015). Hypoxia enhances proliferation of human adipose-derived stem cells via HIF-1α activation. *PLoS ONE*, **10(10):** 1–14.

KASZA K E, ROWAT A C, LIU J, ANGELINI T E, BRANGWYNNE C P, KOENDERINK G H, WEITZ D A (2007). The cell as a material. *Current Opinion in Cell Biology*, **19(1):** 101–107.

KELM J M, LORBER V, SNEDEKER J G, SCHMIDT D, BROGGIN-TENZER A, WEISSTANNER M, ODERMATT B, MOL A, ZUND G, HOERSTRUP S P (2010). A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: self-assembly of microtissue building blocks. *Journal of Biotechnology*, **148(1):** 46–55.

KERN S, EICHLER H, STOEVE J, KLUTER H, BIEBACK K (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, **24(5):** 1294–1301.

KITAGAWA Y, KOROBI M, TORIYAMA K, KAMEI Y T S (2006). History of discovery of human adipose-derived stem cells and their clinical application. *Jpn J Plast Reconstr Surg*, **49:** 1097–1104.

KITAGAWA Y, KOBORI M, TORIYAMA K, KAMEI Y, TORII S (2006). History of discovery of human adipose-derived stem cells and their clinical application. *Japanese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, **49:** 1097–1104.

KNOWLTON S, YENILMEZ B, TASOGLU S (2016). Towards Single-Step Biofabrication of Organs on a Chip via 3D Printing. *Trends in Biotechnology*, **34(9):** 685–688.

KO E, LEE K Y, HWANG D S (2011). Human Umbilical Cord Blood–Derived Mesenchymal Stem Cells Undergo Cellular Senescence in Response to Oxidative Stress. *Stem Cells and Development*, **21(11):** 1877–1886.

KOBAYASHI C I, SUDA T (2012). Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, **227(2):** 421–430.

KOLESKY D B, TRUBY R L, GLADMAN A S, BUSBEE T A, HOMAN K A, LEWIS J A (2014). 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, **26(19):** 3124–3130.

KONG H J, KAIGLER D, KIM K, MOONEY D J (2004). Controlling rigidity and degradation of alginate hydrogels via molecular weight distribution. *Biomacromolecules*, **5(5):** 1720–1727.

LADEROUTE K R, AMIN K, CALAOAGAN J M, KNAPP M, LE T, ORDUNA J, FORETZ M, VIOLLET B (2006). 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Molecular and Cellular Biology*, **26(14):** 5336–5347.

LANGER R, VACANTI J P (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, **260(5110):** 920–926.

LEE H, CHO D W (2016). One-step fabrication of an organ-on-a-chip with spatial heterogeneity using a 3D bioprinting technology. *Lab on a Chip*, **16(14):** 2618–2625.

LEE S B, KIM Y H, CHONG M S, HONG S H, LEE Y M (2005). Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials*, **26(14):** 1961–1968.

LI Y, YANG S T (2001). Effects of three-dimensional scaffolds on cell organization and tissue development. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **6(5):** 311–325.

LI Z, KAWASHITA M (2011). Current progress in inorganic artificial biomaterials. *Journal of Artificial Organs : The Official Journal of the Japanese Society for Artificial Organs*, **14(3):** 163–170.

LIAO N, SHI Y, ZHANG C, ZHENG Y, WANG Y, ZHAO B, ZENG Y, LIU X, LIU J. (2019). Antioxidants inhibit cell senescence and preserve stemness of adipose tissue-derived stem cells by reducing ROS generation during long-term in vitro expansion. *Stem Cell Research and Therapy*, **10(1):** 1–11.

LIEN S-M, KO L-Y, HUANG T-J (2009). Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, **5(2):** 670–679.

LIN R-Z, CHANG H-Y (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, **3(9–10):** 1172–1184.

LINDROOS B, SUURONEN R, MIETTINEN S (2011). The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, **7(2):** 269–291.

LIU TSANG V, CHEN A A, CHO L M, JADIN K D, SAH R L, DELONG S, WEST J L, BHATIA S N (2007). Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **21(3):** 790–801.

LOWERY J L, DATTA N, RUTLEDGE G C (2010). Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibrous mats. *Biomaterials*, **31(3):** 491–504.

MA X, QU X, ZHU W, LI Y-S, YUAN S, ZHANG H, LIU J, WANG P, LAI C S E, ZANELLA F, FENG G-S, SHEIKH F, CHIEN S, CHEN S (2016). Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113(8):** 2206–2211.

MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, KONISHI F, KODAMA H, PAN J, SANO M, TAKAHASHI T, HORI S, ABE H, HATA J, UMEZAWA A, OGAWA S (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, **103(5):** 697–705.

MALDA J, VISSER J, MELCHELS F P, JUNGST T, HENNINK W E, DHERT W J A, GROLL J, HUTMACHER D W (2013). 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, **25(36):** 5011–5028.

MANDRYCKY C, WANG Z, KIM K, KIM D (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, **34(4):** 422–434.

MANNOOR M S, JIANG Z, JAMES T, KONG Y L, MALATESTA K A, SOBOYEJO W O, VERMA N, GRACIAS D H, MCALPINE M C (2013). 3D printed bionic ears. *Nano Letters*, **13(6):** 2634–2639.

MARGA F, NEAGU A, KOSZTIN I, FORGACS G (2007). Developmental biology and tissue engineering. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today : Reviews*, **81(4):** 320–328.

MATAI I, KAUR G, SEYEDSALEHI A, MCCLINTON A, LAURENCIN C T (2020). Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*, **226(September 2019):** 119536.

MEAGHER R C, SALVADO A J, WRIGHT D G (1988). An analysis of the multilineage production of human hematopoietic progenitors in long-term bone marrow culture: evidence that reactive oxygen intermediates derived from mature phagocytic cells have a role in limiting progenitor cell self-renewal. *Blood*, **72(1):** 273–281.

MEHRBAN N, TEOH G Z, BIRCHALL M A (2016). 3D bioprinting for tissue engineering: Stem cells in hydrogels. *International Journal of Bioprinting*, **2(1):** 6–19.

MELCHELS F P W, FEIJEN J, GRIJPMA D W (2010). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, **31(24):** 6121–6130.

MÉZEL C, SOUQUET A, HALLO L, GUILLEMOT F (2010). Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications: jet formation modeling. *Biofabrication*, **2(1):** 14103.

MILLER J S (2014). The billion cell construct: will three-dimensional printing get us there? *PLoS Biology*, **12(6):** 1-9.

MILLER J S, STEVENS K R, YANG M T, BAKER B M, NGUYEN D-H T, COHEN D M, TORO E, CHEN A A, GALIE P A, YU X, CHATURVEDI R, BHATIA S N, CHEN C S (2012). Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nature Materials*, **11(9):** 768–774.

MIRONOV V, BOLAND T, TRUSK T, FORGACS G, MARKWALD R R (2003). *Organ printing : computer-aided jet-based 3D tissue engineering*. **21(4):** 157–161.

MIRONOV V, VISCONTI R P, KASYANOV V, FORGACS G, DRAKE C J, MARKWALD R R (2009). Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, **30(12):** 2164–2174.

MOORE C A, SHAH N N, SMITH C P, RAMESHWAR P (2018). 3D Bioprinting and Stem Cells BT. S. R. Singh & P. Rameshwar (eds.). *SOMATİC STEM CELLS: METHODS AND PROTOCOLS*. 2nd Ed. p: 93–103. Springer New York.

MURAOKA M, SHIMIZU T, ITOGA K, TAKAHASHI H, OKANO T (2013). Control of the formation of vascular networks in 3D tissue engineered constructs. *Biomaterials*, **34(3):** 696–703.

MURPHY K, ANGELES L, DORFMAN S, DIEGO S, SMITH N, BAUWENS L, SOHN I, IRIS G, MCDONALD T, LAW R J, DIEGO S (2012). *Patent Application Publication Pub. No.: US 2012/0116568 A1*. **1:** 61.

MURPHY S V, ATALA A (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, **32(8):** 773–785.

MURPHY S V, SKARDAL A, ATALA A (2013). Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, **101(1):** 272–284.

NG W L, WANG S, YEONG W Y, NAING M W (2016). Skin Bioprinting: Impending Reality or Fantasy? *Trends in Biotechnology*, **34(9):** 689–699.

NICHOL J W, KOSHY S T, BAE H, HWANG C M, YAMANLAR S, KHADEMHOSSEINI A (2010). Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*, **31(21):** 5536–5544.

NIRMALANANDHAN V S, SITTAMPALAM G S (2009). Stem Cells in Drug Discovery, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine: Emerging Opportunities and Challenges. *Journal of Biomolecular Screening*, **14(7):** 755–768.

NOMBELA-ARRIETA C, RITZ J, SILBERSTEIN L E (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **12(2):** 126–131.

OBERPENNING F, MENG J, YOO J J, ATALA A (1999). De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology*, **17(2):** 149–155.

ORCIANI M, GORBI S, BENEDETTI M, DI BENEDETTO G, MATTIOLI-BELMONTE M, REGOLI F, DI PRIMIO R (2010). Oxidative stress defense in human-skin-derived mesenchymal stem cells versus human keratinocytes: Different mechanisms of protection and cell selection. *Free Radical Biology and Medicine*, **49(5):** 830–838.

OSWALD J, BOXBERGER S, JØRGENSEN B, FELDMANN S, EHNINGER G, BORNHÄUSER M, WERNER C (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, **22(3):** 377–384.

OZBOLAT I T, HOSPODIUK M (2016). Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, **76:** 321–343.

OZBOLAT I T, YU Y (2013). Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **60(3):** 691–699.

PANSKY, A., ROITZHEİM, B., & TOBIASCH, E. (2007). Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical laboratory*, **53(1-2)**: 81–84.

PENG W, DATTA P, AYAN B, OZBOLAT V, SOSNOSKI D, OZBOLAT I T (2017). 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceutics. *Acta Biomaterialia*, **57:** 26–46.

PHINNEY D G, PROCKOP D J (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, **25(11):** 2896–2902.

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*. **284(April):** 143–148.

PRISK V, HUARD J (2005). Stem cells in tissue engineering. *Scaffolding in Tissue Engineering*, **414(November):** 531–544.

RADI R, TURRENS J F, CHANG L Y, BUSH K M, CRAPO J D, FREEMAN B A (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, **266(32):** 22028–22034.

RANUCCI C S, KUMAR A, BATRA S P, MOGHE P V (2000). Control of hepatocyte function on collagen foams: sizing matrix pores toward selective induction of 2-D and 3-D cellular morphogenesis. *Biomaterials*, **21(8):** 783–793.

RAPHAEL B, KHALIL T, WORKMAN V L, SMİTH A, BROWN C P, STREULI C, SAIANI A, DOMINGOS M (2017). 3D cell bioprinting of self-assembling peptide-based hydrogels. *Materials Letters*, **190:** 103–106.

RINGEISEN B R, KIM H, BARRON J A, KRIZMAN D B, CHRISEY D B, JACKMAN S, AUYEUNG R Y C, SPARGO B J (2004). Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells. *Tissue Engineering*, **10(3–4):** 483–491.

SALACINSKI H J, TAI N R, CARSON R J, EDWARDS A, HAMILTON G, SEIFALIAN A M (2002). In vitro stability of a novel compliant poly(carbonate-urea)urethane to oxidative and hydrolytic stress. *Journal of Biomedical Materials Research*, **59(2):** 207–218.

SAUNDERS R E, DERBY B (2014). Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: Bioprinting. *International Materials Reviews*, **59(8):** 430–448.

SEMENZA G L (2011). Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1813(7):** 1263–1268.

SEMENZA G L (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, **148(3):** 399–408.

SHAH A A, HASAN F, HAMEED A, AHMED S (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, **26(3):** 246–265.

SHAMBLOTT M J, AXELMAN J, WANG S, BUGG E M, LITTLEFIELD J W, DONOVAN P J, BLUMENTHAL P D, HUGGINS G R, GEARHART J D (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95(23):** 13726–13731.

SHEPHERD I B R, DIEGO S, G U S V A, GORGEN V A, DIEGO S, PRESNELL S C, DIEGO S, ESSEE E (2015). *(12) United States Patent THEREOF , AND METHODS OF MAKING THE (45) Date of Patent : G0IN E EE*. **2:** 12.

SKARDAL A, MACK D, KAPETANOVIC E, ATALA A, JACKSON J D, YOO J, SOKER S (2012). Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds. *STEM CELLS Translational Medicine*, **1(11):** 792–802.

SMITH K A, WAYPA G B, SCHUMACKER P T (2017). Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. *Redox Biology*, **13:** 228–234.

SNYKERS S, DE KOCK J, ROGIERS V, VANHAECKE T (2009). In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, **27(3):** 577–605.

SPILLER K L, MAHER S A, LOWMAN A M (2011). Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, **17(4):** 281–299.

STEER D L, NIGAM S K (2004). Developmental approaches to kidney tissue engineering. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, **286(1):** F1-7.

STEVENS M M, GEORGE J H (2005). Exploring and engineering the cell surface interface. *Science (New York, N.Y.)*, **310(5751):** 1135–1138.

SUN J, WANG J, CHENG W, ZHANG J, LI X, ZHANG S, SHE Y (2012). Chitosan functionalized ionic liquid as a recyclable biopolymer-supported catalyst for cycloaddition of CO2. *Green Chemistry*, **14(3):** 654–660.

TAKADA Y, HACHIYA M, PARK S H, OSAWA Y, OZAWA T, AKASHI M (2002). Role of reactive oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: Mechanism for induction of radioresistance. *Molecular Cancer Research*, **1(2):** 137–146.

THOMSON J A (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282(5391):** 1145–1147.

UGUREL V, CICEK A C, CEMEK M, DEMIRTAS S, KOCAMAN A T, KARACA T (2017). Antioxidant and antiapoptotic effects of erdosteine in a rat model of ovarian ischemia-reperfusion injury. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **20(1):** 53–58.

UNDERHILL G H, CHEN A A, ALBRECHT D R, BHATIA S N (2007). Assessment of hepatocellular function within PEG hydrogels. *Biomaterials*, **28(2):** 256–270.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN M T D, MAZUR M, TELSER J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39(1):** 44–84.

VALLE-PRIETO A, CONGET P A (2010). Human Mesenchymal Stem Cells Efficiently Manage Oxidative Stress. *Stem Cells and Development*, **19(12):** 1885–1893.

VIJAYAVENKATARAMAN S, LU W F, FUH J Y H (2016). 3D bioprinting – An Ethical, Legal and Social Aspects (ELSA) framework. *Bioprinting*, **1(2):** 11–21.

WANG X (2019). Advanced polymers for three-dimensional (3D) organ bioprinting. *Micromachines*, **10(12):** 1–25.

WEST J L, HUBBELL J A (1999). Polymeric Biomaterials with Degradation Sites for Proteases Involved in Cell Migration. *Macromolecules*, **32(1):** 241–244.

WILLIAMS D F (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, **29(20):** 2941–2953.

WILSON W C J, BOLAND T (2003). Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, **272(2):** 491–496.

WONG T Y, PRESTON L A, SCHILLER N L (2000). ALGINATE LYASE: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annual Review of Microbiology*, **54:** 289–340.

WU Z, SU X, XU Y, KONG B, SUN W, MI S (2016). Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Scientific Reports*, **6(1):** 24474.

XIAO L, XU S-J, LIU C, WANG J, HU B, XU H-G (2021). Sod2 and catalase improve pathological conditions of intervertebral disc degeneration by modifying human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Life Sciences*, **267:** 118929.

XU T, GREGORY C A, MOLNAR P, CUI X, JALOTA S, BHADURI S B, BOLAND T (2006). Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method. *Biomaterials*, **27(19):** 3580–3588.

XU T, JIN J, GREGORY C, HICKMAN J J J J, BOLAND T (2005). Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials*, **26(1):** 93–99.

YAN L-J (2014). Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biology*, **2:** 165–169.

YAN L J, SOHAL R S (1998). Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95(22):** 12896–12901.

YU Y, ZHANG Y, MARTIN J A, OZBOLAT I T (2013). Evaluation of cell viability and functionality in vessel-like bioprintable cell-laden tubular channels. *Journal of Biomechanical Engineering*, **135(9):** 91011.

YU Y, ZHANG Y, OZBOLAT I T (2014). A Hybrid Bioprinting Approach for Scale-Up Tissue Fabrication. *Journal of Manufacturing Science and Engineering, Transactions of the ASME*, **136(6):** 1–10.

YU Y, ZHOU Y, CHENG T, LU X, YU K, ZHOU Y, HONG J, CHEN Y (2016). Hypoxia enhances tenocyte differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells by inducing hypoxia-inducible factor-1α in a co-culture system. *Cell Proliferation*, **49(2):** 173–184.

YUE K, TRUJILLO-DE SANTIAGO G, ALVAREZ M M, TAMAYOL A, ANNABI N, KHADEMHOSSEINI A (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, **73:** 254–271.

ZELKO I N, MARIANI T J, FOLZ R J (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, **33(3):** 337–349.

ZHANG B, GAO L, MA L, LUO Y, YANG H, CUI Z (2019). 3D Bioprinting: A Novel Avenue for Manufacturing Tissues and Organs. *Engineering*, **5(4):** 777–794.

ZHANG H, WANG T, MA X, ZHU W (2016). Composition, structural evolution and the related property variations in preparation of mixed cesium/ammonium acidic salts of heteropolyacids. *Catalysts*, **6(12):** 187.

ZHANG Y S, YUE K, ALEMAN J, MOLLAZADEH-MOGHADDAM K, BAKHT S M, YANG J, JIA W, DELL'ERBA V, ASSAWES P, SHIN S R, DOKMECI M R, OKLU R, KHADEMHOSSEINI A (2017). 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Annals of Biomedical Engineering*, **45(1):** 148–163.

ZHOU X, CASTRO N J, ZHU W, CUI H, ALIABOUZAR M, SARKAR K, ZHANG L G (2016). Improved Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis in 3D Bioprinted Tissue Scaffolds with Low Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation. *Scientific Reports*, **6(September):** 1–12.

ZOU X, LI H, CHEN L, BAATRUP A, BUNGER C, LIND M (2004). Stimulation of porcine bone marrow stromal cells by hyaluronan, dexamethasone and rhBMP-2. *Biomaterials*, **25(23):** 5375–5385.

EKLER

Ek 1. Eş zamanlı PCR için kullanılan primer dizileri.

GEN ADI	PRİMER DİZİSİ
GAPDH-66bp-F **GAPDH-66bp-R**	5' -AGC CAC ATC GCT CAG ACA C -3' (19mer) 5' -GCC CAA TAC GAC CAA ATC C -3' (19mer)
SOD1-97bp-F **SOD1-97bp-R**	5'-GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA T-3' (22mer) 5'-CAT CTT TGT CAG CAG TCA CAT T-3' (22mer)
SOD2-149bp-F **SOD2-149bp-R**	5'-TGA CAA GTT TAA GGA GAA GC-3' (20mer) 5'-GAA TAA GGC CTG TTG TTC C-3' (19mer)
CAT1-105bp-F **CAT1-105bp-R**	5'-TGT GCT ATG GCG AGT TTG GT-3' (20mer) 5'-AGT TCC AGC CGG TGA TGA AG-3' (20mer)
GPX1-107bp-F **GPX1-107bp-R**	5'-CCG GGA CTA CAC CCA GAT GA-3' (20mer) 5'-TCT TGG CGT TCT CCT GAT GC-3' (20mer)
HIF-1α-F **HIF-1α -R**	5' -CAT AAA GTC TGC AAC ATG GAA GGT- 3' (24mer) 5' -ATT TGA TGG GTG AGG AAT GGG TT- 3' (23mer)

NANO · MICRO small
www.small-journal.com

Graphene Oxide Nanosheets Interact and Interfere with SARS-CoV-2 Surface Proteins and Cell Receptors to Inhibit Infectivity

Mehmet Altay Unal, Fatma Bayrakdar, Hasan Nazir, Omur Besbinar, Cansu Gurcan, Neus Lozano, Luis M. Arellano, Süleyman Yalcin, Oguzhan Panatli, Dogantan Celik, Damla Alkaya, Aydan Agan, Laura Fusco, Serap Suzuk Yildiz, Lucia Gemma Delogu, Kamil Can Akcali, Kostas Kostarelos, and Açelya Yilmazer**

Nanotechnology can offer a number of options against coronavirus disease 2019 (COVID-19) acting both extracellularly and intracellularly to the host cells. Here, the aim is to explore graphene oxide (GO), the most studied 2D nanomaterial in biomedical applications, as a nanoscale platform for interaction with SARS-CoV-2. Molecular docking analyses of GO sheets on interaction with three different structures: SARS-CoV-2 viral spike (open state – 6VYB or closed state – 6VXX), ACE2 (1R42), and the ACE2-bound spike complex (6M0J) are performed. GO shows high affinity for the surface of all three structures (6M0J, 6VYB and 6VXX). When binding affinities and involved bonding types are compared, GO interacts more strongly with the spike or ACE2, compared to 6M0J. Infection experiments using infectious viral particles from four different clades as classified by Global Initiative on Sharing all Influenza Data (GISAID), are performed for validation purposes. Thin, biological-grade GO nanoscale (few hundred nanometers in lateral dimension) sheets are able to significantly reduce copies for three different viral clades. This data has demonstrated that GO sheets have the capacity to interact with SARS-CoV-2 surface components and disrupt infectivity even in the presence of any mutations on the viral spike. GO nanosheets are proposed to be further explored as a nanoscale platform for development of antiviral strategies against COVID-19.

1. Introduction

SARS-CoV-2 has spread all over the world, over 192 countries with more than 146 million confirmed cases and 3.1 million deaths.[1] Even though there are numerous preclinical and clinical studies ongoing, unfortunately, there is currently no specific preventive or curative treatment for coronavirus disease 2019 (COVID-19).[2,3] As discussed in various reports, nanotechnology and nanomaterials could provide solutions for the fight against COVID-19 in different ways, including: i) detection of viral particles; ii) protection of human exposure from viral particles via personal protection equipment; iii) inactivation of viral particles by capture onto surfaces or different environments; and iv) inactivation of viral particles through molecular surface interactions with novel therapeutic drug molecules (e.g., small molecules or antibodies) and vaccines.[4]

DOI: 10.1002/smll.202101483

© 2021 The Authors. Small published by Wiley-VCH GmbH

3 Biotech (2020) 10:161
https://doi.org/10.1007/s13205-020-2134-5

REVIEW ARTICLE

Where is human-based cellular pharmaceutical R&D taking us in cartilage regeneration?

Damla Alkaya[1] · Cansu Gurcan[1] · Pelin Kilic[1] · Acelya Yilmazer[1,2] · Gunhan Gurman[1,3]

Received: 10 January 2020 / Accepted: 14 February 2020
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2020

Abstract
Lately, cellular-based cartilage joint therapies have gradually gained more attention, which leads to next generation bioengineering approaches in the development of cell-based medicinal products for human use in cartilage repair. The greatest hurdles of chondrocyte-based cartilage bioengineering are: (i) preferring the cell source; (ii) differentiation and expansion processes; (iii) the time necessary for chondrocyte expansion pre-implantation; and (iv) fixing the chondrocyte count in accordance with the lesion surface area of the patient in question. The chondrocyte presents itself to be the focal starting material for research and development of bioengineered cartilage-based medicinal products which promise the regeneration and restoration of non-orthopedic cartilage joint defects. Even though chondrocytes seem to be the first choice, inevitable complications related to proliferation, dedifferentation and redifferentiation are probable. Detailed studies are a necessity to fully investigate detailed culturing conditions, the chondrogenic strains of well-defined phenotypes and evaluation of the methods to be used in biomaterial production. Despite a majority of the current methods which aid amelioration of joint functionality, they are insufficient in fully restoring the natural structure and composition of the joint cartilage. Hence current studies have trended towards gene therapy, mesenchymal stem cells and tissue engineering practices. There are many studies addressing the outcomes of chondrocytes in the clinical scene, and many vital biomaterials have been developed for structuring the bioengineered cartilage. This study aims to convey to the audience the practical significance of chondrocyte-based clinical applications.

Keywords Autologous chondrocyte implantation · Cartilage bioengineering · Cartilage isolation · Chondrocyte · Chondrocyte characterization · Chondrocyte isolation

Introduction

Chondrocytes—comprising only a 10%-volume of the cartilage—are cells which assist tissue articulation. These cells also mechanically support the cartilage by protecting the extracellular matrix (ECM). They provide synthesis of glycoproteins, collagen, proteoglycans and hyalurons (Archer and Francis-West 2003). Autologous chondrocytes are the main source of chondrocyte lines. Nevertheless, the differentiation potential of mesenchymal stem cells (MSCs) provide an alternative for cell line sources of chondrocytes. By the help of growth and transcription factors, MSCs first differentiate to chondrocyte progenitor cells, then to chondroprogenitor cells, chondroblasts, and finally chondrocytes. Chondrogenesis is regulated by the Sox9 transcription factor which is expressed during the condensation of mesenchymal progenitor cells. This causes the formation of immature chondrocytes (Kozhemyakina et al. 2015). Chondrocytes mature by the continuous Sox9 expression, yielding hypertrophic chondrocytes (Cooper et al. 2013). Mature chondrocytes end up with a long mitochondria, enlarged Golgi region, and basophilic cytoplasm in the healthy cartilage (Lin et al. 2006). Articular cartilage is located on the surface of the diarthrodial joints of the knee, and contains more than 98% of extracellular matrix (ECM). The ECM contains

✉ Pelin Kilic

Published online: 06 March 2020


BIOMED 2019
24th INTERNATIONAL BIOMEDICAL SCIENCE & TECHNOLOGY SYMPOSIUM
OCTOBER 17-20, 2019
Radisson Blu Hotel
Çeşme, İzmir
TURKEY
ABSTRACT BOOK

P-37
OPTIMIZING THE ISOLATION AND CULTURING CONDITIONS OF HUMAN AUTOLOGOUS CHONDROCYTES

PELİN KILIÇ[1], CANSU GÜRCAN[1], DAMLA ALKAYA[1], BATU MALATYALI[2], RAMAZAN AKMEŞE[2], KEREM BAŞARIR[2], GÜNHAN GÜRMAN[1], AÇELYA YILMAZER[1,3]

[1] ANKARA UNIVERSITY STEM CELL INSTITUTE
[2] DEPARTMENT OF ORTHOPEDICS AND TRAUMATOLOGY, SCHOOL OF MEDICINE, ANKARA UNIVERSITY, TURKEY
[3] DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING, FACULTY OF ENGINEERING, ANKARA UNIVERSITY, TURKEY.

INTRODUCTION

Articular cartilage lesions of the knee are a commonly observed clinical indication in the world and in our country. Due to the avascular nature of the cartilage tissue, the recovery capacity is low and therapeutic options are scarce. One of the surgical strategies developed for the treatment of defected cartilage is the autologous chondorcute implantation, an approach where cartilage is replaced with the healthy cells. Even though there are standardized autologous chondrocyte implantations, it is very important to get undifferentiated and pure chondrocyte population at the end of cell expansion which is directly affecting the clinical outcome (1,2). Therefore, we aimed to optimize the isolation and culturing conditions of human autologous chondrocytes in this study.

MATERIALS AND METHODS

Articular knee cartilage material was harvested from patients aged 18 to 60 years of age with cartilage lesions, during total knee arthroplasty. Different enzymatic digestion protocols and culturing conditions were used to culture human chondrocytes. Cultured cells were followed under an inverted light microscope for 14 days. Cells were further analyzed by qRT-PCR, immunohistochemistryt, immunofluorescence and flow cytometry for the expression of specific chondrogenic markers.

RESULTS AND DISCUSSION

Cartilage tissue was enzymatically disgested with collagenase type II or trypsin at different concentrations for different incubation times. Cells were morphologically and immunohistochemically shown to preserve chondrogenic character when overnight incubation with collagenase type II was used. Furthermore, the effect of enzyme concentration was shown to be important for culturing. When different culturing conditions were tested, chondrocytes were shown to proliferate without differentiation in growth factor free condition.

CONCLUSION

As discussed above, autologous chondrocyte implantation is an important treatment option in the clinic. Here, the isolation and culturing conditions of these cells were evaluated. Following this study, it would be important to validate these findings in GMP conditions.

REFERENCES

1. Atilla E, et al. Transfus Apher Sci 57 (2018) 187-196
2. Huang, B.J. et al., Biomaterials, 98 (2016) 1-22.