TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HÜCRE KÜLTÜRÜ KAYNAKLI HÜCRELER ARASI MATRİS TABANLI BİYOMÜREKKEP İLE 3 BOYUTLU BİYOBASKI

Doğantan ÇELİK

DİSİPLİNLER ARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA

ANKARA
2023

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Hücre Kültürü Kaynaklı Hücreler Arası Matris Tabanlı Biyomürekkep İle 3 Boyutlu Biyobaskı" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Doğantan ÇELİK

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda
Doğantan ÇELİK tarafından hazırlanan
"Hücre Kültürü Kaynaklı Hücreler Arası Matris Tabanlı Biyomürekkep ile 3 Boyutlu Biyobaskı" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/01/2023

İmza
Dr.Öğr.Üyesi Nihal TERZİ ÇİZMECİOĞLU
Ortadoğu Teknik Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Dr.Öğr.Üyesi Mehmet ALTAY ÜNAL
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Doç.Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA
Ankara Üniversitesi
Üye

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

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Doku Mühendisliği	1
1.2. Hücre Kültürü	3
1.2.1. Hücre Kültürü ve Pasajı	3
1.2.2. Fibroblast Hücresi	5
1.3. Biyomürekkepler	6
1.3.1. Biyobaskı için Hidrojel Tasarım Kriterleri	8
1.3.2. Biyomürekkep Seçimi	10
1.3.3. Hidrojel Çapraz Bağlama Mekanizmaları	10
1.3.4. Tek Bileşenli Hidrojel Biyomürekkeplerin Dezavantajları	11
1.3.5. Çok Bileşenli Hidrojel Biyomürekkep Türleri	12
1.3.6. Doğal Polimer Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler	13
1.3.7. Aljinat Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler	13
1.3.8. Agaroz	16
1.3.9. Kollajen Bazlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler	16
1.3.10. Desellülerize (Hücresizleştirilmiş) HAM (dHAM) Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler	17
1.3.11. Jelatin Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler	21
1.3.12. Matrijel	23
1.3.13. İpek Fibril Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler	23
1.3.14. Sentetik Polimer Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler	24
1.4. Hücreler arası matris (HAM)	24
1.5. Desellülarizasyon (Hücresizleştirme)	25
1.6. DHAM' ın Doku Mühendisliğinde Kullanımı	28
1.7. Hücre Kültüründen dHAM	28
1.8. 3 Boyutlu Biyoyazıcı	30
1.9. Hipotez	32

2. GEREÇ ve YÖNTEM 34
2.1. Hücre Kültürü 34
2.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi 34
2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması 35
2.2. Hücre Kültürünün Hücresizleştirilmesi ve HAM Eldesi 36
2.3. Hücresizleştirmenin Gösterilmesi 38
2.4. HAM Varlığının Kontrolü 38
2.5. Büyük Ölçekte Hücre Kültürü Tabanlı dHAM Üretilmesi 39
2.6. 3B Biyoyazıcı İçin Biyomürekkep Hazırlanması 41
2.7. 3 Boyutlu Biyobaskı 41
2.8. Temas Açısı Ölçümü 43
2.9. Çekme Testi 43
2.10. Alamar Blue Canlılık ve Çoğalma Testi 44
2.11. İstatistiksel Analiz 45

3. BULGULAR 46
3.1. Hücresizleştirme Solüsyonunun Seçilmesi 46
3.2. DAPI Boyaması 47
3.3. Bikinkoninik Asit (BCA) Testi 49
3.4. Çekme Testi 49
3.5. Temas Açısı Ölçümü 50
3.6. Hücre Çoğalmasının Tespiti 51
3.7. 3B Baskıdaki hücrelerin Canlılığının Floresan Boya ile Belirlenmesi 52

4. TARTIŞMA 56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 60
ÖZET 62
SUMMARY 63
KAYNAKLAR 64
ÖZGEÇMİŞ 75

ÖNSÖZ

3 boyutlu biyoyazıcı teknolojisi, doku mühendisliği, ilaç çalışmaları ve kanser araştırmaları için umut vadeden bir teknoloji olarak görülmektedir. Geliştirilen her biyouyumlu ve biyobenzer biyomürekkep ise teknolojiyi her geçen gün bir adım ileriye taşımaktadır. Bu tez çalışmasında canlı hücrelerin yaşamasını destekleyecek yeni bir biyomürekkep tasarlanması hedeflenmiştir. Çalışmada hücre kültüründen elde edilen hücreler arası matris kullanılarak hazırlanan biyomürekkebin, 3 boyutlu biyoyazıcı ile basılan, canlı hücre yüklü yapılara olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, tezimi yazarken cesaretimi kaybetmememi sağlayan danışmanım Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Değerli hocalarım Prof. Dr. K. Can AKÇALI ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Altay ÜNAL'a zorlandığım durumlarda destekleri için teşekkür ederim. Tezimin yazım süreci boyunca her türlü yardımda bulunan Cemile GÖKÇE, Berfin ÖZTÜRK'e ve Gökçe SUMMAK'a teşekkür ederim. Eğitimim boyunca yanımda bulunan ve Tezin ortaya çıkmasını sağlayan bütün arkadaşlarıma ve aileme ayrıca teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

dH_2O	Distile su
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
FBS	Fatal bovine serum
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
kPa	Kilopascal
DPBS	Dulbecco's Fosfat salin tamponu
NH_4OH	Amonyum hidroksit
P/S	Penstrep
dHAM	Deselülerize hücrelerarası matris
RPM	Dakika dönüş sayısı
BCA	Bicinchoninic acid
3B	3 Boyutlu
HAM	Hücrelerarası Ekstraselüler matris
MEM	Minimum Essential Medium
Tc	Tissue Culture

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. Tezin adımları ve deney planı 33
Şekil 2. 1. Hücresizleştirme öncesi l929 hücreleri 40
Şekil 2. 2. Kültür kaplarının hücresizleştirilmesi 40
Şekil 2. 3. 3B biyobaskı 42
Şekil 2. 4. Izgara görünümüne sahip biyobaskı 42
Şekil 2. 5. Mühendislik gerinimi denklemi 44
Şekil 2. 6. Mühendislik gerilimi denklemi 44
Şekil 2. 7. Çekme testi 45
Şekil 3. 1. Solüsyon 1 ile muamele edilmiş DAPI boyalı hücreler 47
Şekil 3. 2. Solüsyon 2 ile muamele edilmiş hücreler 48
Şekil 3. 3. Solüsyon 2 ile muamele edilmiş hücrelerin DAPI filtreli görüntüsü 48
Şekil 3. 4. Protein standart eğrisi 49
Şekil 3. 5. Kontrol-ham gerilim gerinim grafiği 50
Şekil 3. 6. Ham temas açısı 51
Şekil 3. 7. Kontrol temas açısı 51
Şekil 3. 8. Kontrol ve ham canlılık ve proliferasyon grafiği 52
Şekil 3. 9. Kontrol grubu 1. gün canlı ve ölü floresan boyama 53
Şekil 3. 10. Kontrol grubu 7. gün canlı ve ölü floresan boyama 54
Şekil 3. 11. Ham grubu 1. gün canlı ve ölü floresan boyama 4x objektif 54
Şekil 3. 12. Ham grubu 7. gün canlı ve ölü floresan boyama 4x objektif 55

1. GİRİŞ

1.1. Doku Mühendisliği

Yaralanmalar veya doğuştan gelen organ ve doku eksikliğinin giderilmesi sonucunda hastanın normal yaşamına kavuşabileceği fikrinden doku mühendisliği alanı doğmuştur (Makuku ve ark., 2022). İşlevini kaybetmiş doku ve organların yerine yenisi nakletme işlemine transplantasyon adı verilmektedir. Klinikte güncel olarak kullanımda olan transplantasyon tekniğindeki, donör organ yetersizliği, doku uyumsuzluğu, dokuların yenilenme kapasitelerinin yetersizliği ve etik sorunlar transplantasyon tekniğinin yaygın olarak kullanımını ve sürdürülebilirliğini kısıtlamaktadır. Bahsi geçen sınırlayıcı unsurlar nedeniyle doku mühendisliği ve yenileyici tıp multidisipliner bir alan olarak gün geçtikçe önem kazanmıştır (ErgİN ve ark., 2018). 1993 yılında Langer ve Vacanti bir raporda doku mühendisliğini ilk kez multidisipliner bir alan olarak tanımlamıştır ve 3 temel parçadan oluştuğunu belirtmişlerdir. Bu temel parçalar: izole edilmiş hücreler, matris ve doku oluşumunu tetikleyecek biyolojik ajanlardır. Doku mühendisliğinde hücre kaynağı olarak kök hücre ve somatik hücreler kullanılabilmektedir. Matris hücrelerin üzerinde tutunabileceği ve çoğalabileceği bir ortam sağlamak amacıyla oluşturulan hücrelerin doku ve organ içindeki mikro çevresine benzerlik gösteren biyobenzer doğal veya sentetik iskelelerdir. Doku oluşumunu tetikleyecek biyolojik ajanlar ise hücre davranışını kontrol etmek amacıyla kullanılan biyomoleküllerdir (Glotzbach ve ark., 2011).

Kullanılan hücrelerin doku mühendisliğinin başarısı üzerinde önemli bir etkisi vardır. Canlı türleri arasındaki farka bağlı olarak farklı kökene sahip hücreler kullanılabilir. Bunlar otolog (hastanın kendi), allojenik (hasta dışında insan) ve ksenojenik (hayvan kökenli) olarak sınıflandırılabilir. Otolog hücreler, aktiviteleri

yüksek kaldığı sürece doku mühendisliği için en uygun hücre kaynağıdır, oysa allojenik ve ksenojenik hücreler immünojeniktir ve bu kaynaklardan alınan hücrelerden yeni bir doku tasarlandığında immün baskılayıcı bir tedaviye ihtiyaç duyacaktır (Ikada, 2006).

Doku mühendisliği çalışmalarında kök hücreler ve farklılaşmasını tamamlamış olan somatik hücreler hücre kaynağı olarak kullanılabilmektedir. Yetişkin kök hücreler somatik hücrelere göre yüksek yenilenebilme ve farklılaşabilme kapasitesine sahiptir. Halihazırda programlı olduğu doku tipini sürdürebilir olmaları, yetişkin kök hücrelerini doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilebilir bir hücre kaynağı yapmaktadır (Körbling ve Estrov, 2003). Farklılaşmasını tamamlamış yetişkin vücut hücreleri doku mühendisliği için diğer bir hücre kaynağıdır. Belirli bir dokuya özgü oldukça özelleşmiş işlevleri yerine getirir. Halihazırda belirli bir kökene farklılaşmışlardır ve dokuya özgü bir görevi yerine getirmek için özel manipülasyon gerektirmezler. İstenmeyen farklılaşmalar gösterme ihtimali yoktur. Rejeneratif potansiyelden yoksun olmaları onları doku mühendisliği çalışmalarında sınırlamaktadır. Doku mühendisliğinde kök hücreler ve farklılaşmış hücreler arasındaki parakrin iletişim, her bir alt popülasyonun uygun işlevini sürdürmek için önemlidir (Bianco ve Robey, 2001).

Organ kıtlığı sağlık alanındaki en önemli sorunlardan biri olmaya devam ediyor. Organ nakillerine olan talep önemli ölçüde artarken, bağışlanan organ sayısı yaklaşık on yıldır aynıdır. 3B Biyobaskı, giderek artan bu organ kıtlığı krizini çözmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Günümüz itibariyle tamamen işlevsel organların 3B biyobaskı teknolojisi ile üretilmesi için teknolojinin hala kat etmesi gereken uzun bir mesafe olsa da halihazırda 3B biyobaskı adına önemli adımlar atılmıştır (Vijayavenkataraman ve ark., 2018).

1.2. Hücre Kültürü

1.2.1. Hücre Kültürü ve Pasajı

Hücre hattı, ilk geçişini izleyen bir hücre kültürü olarak tanımlanır (Schaeffer, 1984). Hücre hatları sürekli (ölümsüz) veya sonlu (sınırlı ömür) olabilir, ancak kültür yöntemleri aynıdır. Hücre hatları kültür kabına yapışık olarak ya da besiyeri içinde süspansiyon halinde çoğaltılabilirler. Fakat farklı bakım yöntemlerine ihtiyaç duyarlar (Masters ve Stacey, 2007).

Hücre hattı kültürlenirken dikkat edilmesi gereken faktörler;

- Sürekli hattı ve genom stabilitesi: Kültürde bir hücre hattı ne kadar uzun süre korunursa, genotipte değişikliğe uğrama ihtimali o kadar artar. Bu tür değişiklikler hücre hattının özelliklerini değiştirebilir, ancak hücre kültürü protokollerine bağlı kalınırsa genetik değişimi ve hücreleri etkileyen diğer faktörler en aza indirebilir. Bu tür değişiklikleri en aza indirmenin en önemli yolu, hücre hatlarının sürekli kültürde çoğaltılma süresini kısıtlamaktır. Hücreler uzun süre kültürde bulunursa, fenotipik ve genotipik değişikliklerin meydana gelmesi olasıdır ve mikrobiyal kontaminasyon ve hücre hatlarının çapraz kontaminasyon olma olasılığı artacaktır (Masters ve Stacey, 2007).

- Hücre kültürü besiyeri: Hücre kültürü besiyerinin kompleks bir yapısı vardır. MEM (minimal esansiyel ortam) gibi basit besiyerleri amino asitler, vitaminler, tuzlar ve glikoz içerir. Bileşenler her üretici tarafından farklı şekilde üretilip, farklı saflık seviyelerinde olabilir. Her farklı formülasyon kullanıldığında, hücrelerin uyum sağlaması gerekecektir. Yalnızca bir üreticiye ait besiyeri kullanmak hücrelerin sağlıklı kalmasına katkıda bulunur (Masters ve Stacey, 2007).

- Serum: Serum, biyolojik materyallerin kompleks bir karışımıdır ve oldukça değişken olabilir. Serum sığır, insan veya at kökenli olabilir, en çok tercih edilen serum, fetal sığır serumudur. Serum, hücrelerin büyümesini ve yapışmasını destekleyen faktörler de dahil olmak üzere hücre besiyerinde eksik olan faktörleri sağlar. Birçok hücre hattı, serumsuz besiyeri ortamına uyarlanabilir veya bu ortamda tutulabilir. İnsan kullanımına yönelik ürünler üretmek için hücrelerin kullanıldığı durumlarda, serum kullanılmaması, immünolojik reaksiyonları ve mikrobiyal veya viral kontaminasyon olasılığını azaltmak için önemlidir.(Masters ve Stacey, 2007).

- Tripsin: Hücreleri kültür kabı yüzeyinden ayırmak için proteolitik enzimler kullanılır. en sık tripsin enzimi kullanılır. Taze kullanılması önerilir. Tripsin, proteinleri hücre yüzeyinden ayırdıktan sonra serum gibi bir inhibitör tarafından nötralize edilene kadar bir proteinaz görevi görmeye devam edecektir. Bu nedenle, hücreler tripsin içinde gerekenden daha uzun süre bırakılmamalıdır (Masters ve Stacey, 2007).

- Sıcaklık: Çoğu hücre hattı, vücut sıcaklığı 37 °C'de olan hayvan dokularından izole edilerek çoğaltılır ve sıcaklıkta büyütülürler. Hücreler, 37 °C inkübatör sıcaklığında tutulmalı ve genellikle 20-25 °C arasında oda sıcaklığında hücrelerin pasajlanması gerekir. Ani sıcaklık değişiklikleri, hücrelerde strese neden olarak hücrelerin protein profilinde değişikliklere yol açabilir. pasajlamada, taze alınmış bileşenlerin kullanılması gerekir. Tripsin ve serum Dondurucuda, besiyeri ise buzdolabında saklanır. Hücre stresini en aza indirmek için, bu bileşenlerin sıcaklığını en azından oda sıcaklığına yükseltmek önemlidir (Masters ve Stacey, 2007).

- L-Glutamin: L-Glutamin rutin olarak doku kültürü ortamına ayrı bir takviye olarak eklenir veya bazal ortama dahil edilir. L-Glutamin, sitrik asit döngüsü yoluyla enerji sağlayabilir. Bununla birlikte, çoğu doku kültürü ortamı büyük miktarlarda glikoz içerir ve sonuç olarak birçok hücre çizgisi için L-glutamin ilavesi gerekli olmayabilir (Masters ve Stacey, 2007).

- Antibiyotikler: Antibiyotiklerin varlığında kontaminasyon baskılanabilir, ancak hücrelerin fenotipini veya genotipini değiştirebilir. Antibiyotikler toksiktir ve hücrelerin biyokimyasını değiştirebilir (Masters ve Stacey, 2007).

- Kültür kaplarının etiketlenmesi: Her kapta, hücrelerin adı, geçiş numarası, kabın ekildiği tarih ve ortam değiştirme tarihleri ile açıkça etiketlenmelidir. Şişelerin veya diğer doku kültürü kaplarının yetersiz veya yanlış etiketlenmesi, çapraz kontaminasyona ve yanıltıcı verilere neden olabilir. (Masters ve Stacey, 2007).

- Besiyeri değişimi: Hücre kültüründe besinler tükenir ve metabolik ürünlerin konsantrasyonu artar. Bu nedenle, hücreler için toksik olabilir. Besiyerinin ne sıklıkta değiştirilmesi gerektiği hücre hattına ve besiyerinin türüne bağlıdır. Hücreler besinleri hızla kullanır ve metabolitleri ortama salar, bu da pH'ın düşmesine neden olur. Hücre özellikleri zamana ve besin koşullarına göre değişecektir. Bu nedenle, optimal büyüme koşulları ve deneysel tekrarlanabilirlik için, hücreler pasajlandıktan birkaç gün sonra standart bir sayıda çoğaltılmalıdır (Masters ve Stacey, 2007).

1.2.2. Fibroblast Hücresi

Bir fibroblast, hücre dışı matris ve kolajen sentezleyen bir tür biyolojik hücredir (Chudzik, 2016). Yapısal çerçeve (stroma), hayvan dokuları ve yaranın iyileşmesinde kritik rol oynar. Fibroblastlar, hayvanlarda en yaygın bağ dokusu hücreleridir. Fibroblastlar, çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli olan mezenkimal kaynaklı hücre tipleridir. Hücreler arası matrisin (HAM) sentezi olarak epitelyal enflamasyon ve yaranın farklılaşması, iyileşme sürecinde görev alır (Tarin ve Croft, 1969). Fibroblastlar ayrıca büyüme faktörlerinin salgılanmasından sorumludur ve doku fibrözü ve yara dokusu oluşumu için ana arabulucu hücre görevi gören diğer bazı hücre tipleri için iskele görevi görür (Parsonage ve ark., 2005). Fibroblastların tıbbi

araştırmalarda kullanılması, çeşitli hastalıkların patogenezini aydınlatmaya yardımcı olan çalışmalara izin vermiştir. uPK'lerin gelişmesinden bu yana, fibroblastlar hastalıkların modellenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Freitas ve ark., 2014). Fibroblastlar, iyileşme sürecinde lezyon çevresinde yoğunlaşır, diğer hücreler için bir iskele görevi görecek HAM'ı üretir (Tomasek ve ark., 2002).

1.3. Biyomürekkepler

Hastalık veya yaralanmaya bağlı doku hasarı, sağlık uzmanları için önemli bir endişe kaynağı olmuştur. Bazı organ ve dokuların kendi kendini yenileme veya rejeneratif kapasiteleri çok sınırlı olduğundan, fonksiyonel canlı dokuyu veya hatta tüm organları rejenere edebilen tedavilerin geliştirilmesi uzun vadeli arzu edilen bir hedef olmuştur (Woodfield ve ark., 2009).

Gelişmekte olan doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, yaralı dokuları onarmak için çözümler sağlama potansiyeli sunar. Genellikle hücreler, biyomateryaller, büyüme faktörleri veya hücrelerin bir kombinasyonu, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, hasar görmüş dokuları yenilemek veya onarmak için gereken yapısal ve biyolojik yapı taşları ve işaretler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Biyobaskı, moleküller, hücreler, dokular ve biyobozunur biyomalzemeler dahil olmak üzere biyolojik olarak ilgili malzemeleri iki boyutlu (2B) veya üç boyutlu (3B) kökenlere dayalı olarak modellemek ve bir araya getirmek için bilgisayar destekli transfer süreçlerini kullanma sürecidir ve mühendislik ürünü bir biyofonksiyonel yapının oluşumuyla sonuçlanır (Tang ve ark., 2017). Hem in vitro hem de in vivo hücre yüklü yapıları dikey yapılar oluşturacak şekilde katmanlı olarak imalatına olanak sağlayabilir (Skardal ve ark., 2012). Ayrıca, tıbbi görüntüleme sistemleriyle birlikte kişiselleştirilmiş 3B yapılar, hasta anatomisine uyan farklı ölçeklerde üretilebilir (Hockaday ve ark., 2012).

Temel olarak, biyobaskı, biyomürekkep içeren önceden programlanmış yapılar ve geometrilerle 3B doku yapılarının üretilmesine olanak tanır. Bununla birlikte, biyobaskıda, biyomürekkepler önemli bir bileşendir. Amaçlanan doku yapılarının son şekillerini oluşturmak amacıyla biyomürekkep doku yapılarına, hemen sonrasında çapraz olarak bağlanır veya stabilize edilir. Biyomürekkepler son zamanlarda, hücreleri içermesi gereken otomatik bir biyofabrikasyon teknolojisi ile işlemeye uygun malzemelerin bir formülasyonu olarak tanımlanmıştır (Groll ve ark., 2018).

Biyomürekkep seçimi, belirlenen uygulamaya ve kullanılacak biyoyazıcının yanı sıra hücre tipine de bağlıdır. Biyomürekkep seçimi, optimum biyobaskı koşullarını elde etmek için çok önemlidir. İdeal bir biyomürekkep, uygun mekanik, reolojik (akışbilimsel) özellikler, kimyasal ve biyolojik özellikler gibi istenen fizikokimyasal özelliklere sahip olmalıdır (Kim ve ark., 2016). Biyomürekkep şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Doku eşleştirme mekaniğini tercihen ayarlanabilir bir şekilde korurken, yeterli mekanik mukavemet ve sağlamlığa sahip doku yapıları üretimi;
- Yüksek şekil doğruluğuna sahip yapıların biyobaskısına yardımcı olmak için ayarlanabilir jelleşme ve stabilizasyon;
- Biyouyumluluk ve gerekirse, dokuların doğal mikro ortamını taklit eden biyobozunurluk;
- Dokuya özgü ihtiyaçları karşılamak için kimyasal modifikasyonlara uygunluk;
- Gruptan gruba minimum varyasyonlarla büyük ölçekli üretim potansiyeli (Loo ve ark., 2015).

Optimal hücre yüklü biyomürekkep formülasyonunun belirlenmesi, başarılı biyobaskı için önemli olduğundan bugüne kadar, belirli özelliklere sahip çeşitli doğal

ve sentetik biyomalzemeler biyomürekkep olarak kullanılmıştır. Alanın öncü çalışmalarında, hücreler veya çok hücreli kümeler oldukça sık olarak biyomürekkep olarak tasvir edilmiştir (Mironov, 2003). Fakat tek tek hücreler ve/veya hücre kümeleri, kesme gerilimine dayanma ve yüksek canlılığı sürdürme kabiliyetinden yoksundur, bu da basılı yapıların nihai işlevselliğini olumsuz etkiler (Ozbolat ve Hospodiuk, 2016). Bu sebeple hidrojel tabanlı biyomürekkepler, hücre yüklü biyomürekkepler olarak en popüler seçeneklerden biri olarak ortaya çıkmıştır.

1.3.1. Biyobaskı için Hidrojel Tasarım Kriterleri

Viskozite, kesme incelmesi, viskoelastisite, sito-uyumluluk, biyouyumluluk, jelleşme kinetiği, biyobozunma ve polimer konsantrasyonu, baskı doğruluğunu ve mekanik özelliklerin yanı sıra hücresel büyümeyi desteklemek için hücre yok etme kapasitelerini korumak amacıyla başarılı ekstrüzyon biyobaskı işlemi için dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir.

Viskozite, başarılı 3B ekstrüzyon biyobaskı için belirleyici faktörlerden biridir. Viskozite, uygulanan stres veya basınç altında bir sıvının akmaya karşı direncini yansıtır. Yüksek bir viskozite, yüzey gerilimi nedeniyle damlacık oluşumunu durdurma ve biriken yapının çökmesini önleme kapasitesi nedeniyle, özellikle ekstrüzyon tabanlı 3B baskı için uygun olabilir (Malda ve ark., 2013). Ancak aşırı viskoz malzemeler baskı kafasını tıkayarak baskı işleminin başarısız olmasına neden olur. Hidrojel bazlı biyomürekkebin viskozitesi, polimer konsantrasyonu ve ayrıca molekül ağırlıkları tarafından belirlenir. Yüksek viskozite genellikle, hücresel büyüme, göç ve farklılaşma üzerinde olumsuz etkisi olan yüksek polimer konsantrasyonuyla ilişkilendirilir (Bryant ve Anseth, 2002).

Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı için oldukça tercih edilen bir diğer akışbilimsel özellik, kesme incelmesi davranışıdır. Kesme incelme özellikleri, polimer zincirlerinin gerilim veya basınç altında yeniden düzenlenmesi nedeniyle belirlenen viskozite değişiklikleridir. Bu özellik, sadece filamentlerin serbest birikimine ve baskı sonrası yapısal bütünlüğe izin vermekle kalmaz, aynı zamanda hücreleri ekstrüzyon işlemi sırasında oluşan kesme geriliminden korur (Malda ve ark., 2013).

Akma gerilimi, biyomürekkebin akması için gereken minimum gerilim değeridir. Özellikle kesmeyle incelen biyomürekkepler için, fiziksel olarak çapraz bağlanmış polimer ağı, akma gerilimi değerinin (aynı zamanda akış noktası olarak da bilinir) üzerinde bir gerilim uygulanarak biyomürekkep akışına yardımcı olmak için bozulabilir. Ayrıca, uygulanan gerilimin kaldırılması, fiziksel olarak çapraz bağlı ağın yeniden oluşumuyla sonuçlanır. Bu özellik aynı zamanda basılı yapının çökmesini önlemeye de yardımcı olur (Pereira ve ark., 2018). Ayrıca akma gerilimi, hidrojel öncü çözeltisinde hücre yerleşmesini önleyebilir. Genel olarak, kendi kendine birleşen peptit bazlı hidrojeller, ve blok polimerler, akma geriliminin yanı sıra kesme inceltme özelliklerine sahiptir; ki bu da onları bir biyomürekkep olarak popüler seçenekler haline getirir (Malda ve ark., 2013).

Jelleşme veya çapraz bağlama mekanizması ekstrüzyon tabanlı biyobaskıda, basılı yapının uzun vadede şeklini koruması önemlidir. Başarılı bir biyobaskı için, çapraz bağlama işleminin hücre canlılığı ve işlevselliği üzerinde büyük bir etkisi olabileceği göz önüne alındığında, jelleşme kinetiğinin dikkatlice düşünülmesi gerekir. Örneğin, foto çapraz bağlama sırasında ultraviyole (UV) ışığının yoğun kullanımı, hücre canlılığını ve işlevini önemli ölçüde azaltabilir. Bu nedenle, ekstrüzyon tabanlı biyobaskıda hücre için biyouyumlu bir jelleşmemnin dikkate alınması gerekir.

Biyoişlevsellik dikkate alınması gereken bir başka önemli faktördür. Hidrojel biyomürekkeplerinin hücre işlevini, bağlanmayı, göçü, çoğalmayı ve hücre aracılı matris yeniden modellemesini etkilediği gösterilmiştir (Gao ve ark., 2019). Ayrıca biyomürekkep içindeki proteinler gibi ek biyoaktif bileşenler hücre yapışması, çoğalması, ve işlevi daha çok desteklenmiş olur (Chimene ve ark., 2016).

Biyokimyasal özelliklerin yanı sıra, hidrojel mikro ortamı tarafından sunulan fiziksel özellikler de hücre davranışını etkilemede önemli bir rol oynayabilir. Örneğin, matris sertliği kök hücre farklılaşmasını yönlendirebilir, bu sayede daha sert bir matris osteojenik soya doğru farklılaşmaya yol açarken, daha yumuşak bir matris miyojenik soya yol açar (Engler ve ark., 2006; Whitehead ve ark., 2018).

1.3.2. Biyomürekkep Seçimi

Seçilen biyomürekkebin hedef dokunun biyolojik gereksinimlerini karşılama kabiliyetine sahip olması gerekir. Örneğin, kalp dokusunun 3B biyobaskısı için ana hedeflerden biri vaskülarizasyon ve kardiyak fonksiyonun korunmasını sağlamaktır. Sonuç olarak, zenginleştirilmiş büyüme faktörlerine sahip hiyalüronik asit (HA) ve jelatin gibi yumuşak malzemeler, kardiyak öncü hücrelerin çoğalmasını desteklemek açısından uygun olabilir (Gaetani ve ark., 2015).

Hidrojeller, doku iskelesi olarak kullanım için çok sayıda çekici özelliğe sahiptir. Örneğin, bunlar biyolojik olarak uyumludurlar ve tipik olarak biyolojik olarak parçalanabilirler. Ayrıca, bu biyomalzemelerin çoğu, hücre bağlanması, yayılması, büyümesi ve farklılaşması için arzu edilen spesifik hücre bağlama bölgelerine sahiptir ve bazıları değiştirilmiş formlarında kolaylıkla foto çapraz bağlanabilir (Bregg, 2005).

1.3.3. Hidrojel Çapraz Bağlama Mekanizmaları

Hidrojeller normalde fiziksel çapraz bağlama veya kimyasal çapraz bağlama yoluyla çapraz bağlanan doğal veya sentetik polimerlerden üretilir (Ahn ve ark., 2008). Fiziksel çapraz bağlama, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağı, stereokompleksleme, ve konuk konakçı gibi polimer zincirleri arasındaki çeşitli kovalent olmayan etkileşim türlerine göre sınıflandırılır (Akhtar ve ark., 2016). Kimyasal çapraz bağlama ise çeşitli reaksiyon mekanizmaları aracılığıyla kimyasal olarak reaktif fonksiyonel grupların kovalent bağlanması yoluyla gerçekleşir (Ullah ve ark., 2015). Hidrojelin çapraz bağlanma mekanizması, hidrojel filamentinin eksik çapraz bağlanmasının yapının çökmesine ve dolayısıyla şekil kaybına yol açabileceği göz önüne alındığında, basılı yapının yapısal bütünlüğünü korumak için önemlidir. Ayrıca biyomürekkep içindeki hücrelerin varlığı, polimerizasyonu kolaylaştırmak için gerekli olan radikalleri inhibe etmek gibi çapraz bağlanma sürecini engelleyebilir, bu da çapraz bağlanma derecesini azaltabilir ve dolayısıyla şekil bozukluğuna neden olabilir (Lim ve ark., 2016).

1.3.4. Tek Bileşenli Hidrojel Biyomürekkeplerin Dezavantajları

Optimum biyomürekkeplerin yüksek baskı doğruluğunu ve şekil tutmayı destekleyen uygun basılabilirlik ve yüksek hücre canlılığını destekleyen biyoişlevsellik olmak üzere iki temel gereksinimi vardır. Fakat mevcut tek bileşenli hidrojel biyomürekkep bu iki temel gereksinimi aynı anda destekleyemez. Basılabilirlik, biyomürekkebin, genellikle yüzey gerilimi ve viskozite veya kayma incelmesi davranışı gibi hidrojel akışbilimsel özellikleriyle ilişkilendirilen mükemmel şekil doğruluğu ve bütünlüğüyle 3B yapı oluşturma yeteneğidir (Ouyang ve ark.,

2016). Yüzey gerilimi ise biyomürekkep ve substrat arasındaki dikey yönde, ve şekil doğruluğuna sahip baskılanılabilir bir 3B yapı iskelesi oluşturmak için önemlidir (Mandrycky ve ark., 2016). Biyomürekkep viskozitesi, biyomürekkebin başarılı bir şekilde serbest bırakılmasını ve basılan yapının nihai şekil doğruluğunu belirleyebilir. Düşük viskozite, ekstrüzyon işlemi sırasında istenilen bir özelliktir, çünkü canlılığı olumsuz yönde etkileyen hücrelere yönelik aşırı kesme gerilimini azaltabilir ve ayrıca düzgün filament birikimini destekleyebilir (Chimene ve ark., 2016). Ancak, ekstrüzyondan sonra yapının şeklini korumak ve hidrojel filament çökmesini önlemek için daha yüksek viskozite şarttır. Biyofonksiyonellik ise, biyobaskı işleminin hücre uyumluluğunu ve ayrıca biyomürekkebin hücresel aktiviteleri ve doku oluşumunu teşvik etme konusundaki kabiliyetini arttırabilir. Böylece istenen doğal doku mimarisini ve implantasyon sonrası mekanik özellikleri taklit etmek için basılı yapının işlevsel kapasitesini etkiler (Gao ve ark., 2019).

Tek bileşenli hidrojel biyomürekkepler için bazıları basılabilirlikten yoksundur ve artan hidrojel polimer konsantrasyonu veya çapraz bağ yoğunluğu gibi modifikasyon gerektiren yetersiz baskı sonrası mekanik özellikleriyle genellikle daha az geçirgen bir hidrojel mikro ortamına yol açar (Kyle ve ark., 2017). Ayrıca, yarı geçirgen matris aynı zamanda, şekli koruyamayan düşük mekanik özellikler sergileyen düşük düzeyde bir çapraz bağlanma anlamına gelir (Cidonio ve ark., 2019). Bu nedenle, tek bileşenli ve başarılı bir ekstrüzyon biyobaskı için biyomürekkebin normalde baskılanabilirliği ya da biyoişlevselliği yeterli olmamaktadır.

1.3.5. Çok Bileşenli Hidrojel Biyomürekkep Türleri

Çok bileşenli biyomürekkepler, daha geniş bir biyofabrikasyon penceresinde yazdırmak için tek bileşenli bir biyomürekkep kullanma sınırlamasını aşmanın en etkili yolu olabilir. İkincil veya daha fazla bir bileşenin eklenmesi, uzun vadeli şekil

doğruluğunu korumak için elde edilen hidrojellerin biyoişlevselliğini veya mekanik stabilitesini geliştirebilir. Genel olarak, aşağıda özetlenen dört tür çok bileşenli biyomürekkep vardır. Çok malzemeli hidrojel biyomürekkepler genellikle nihai basılı yapıda birbirleriyle kovalent olarak çapraz bağlanmış birden fazla türde polimerik zincir veya hidrojel ağları içerir. Bu yaklaşım, daha fazla tasarım esnekliğine sahip olduğundan tipik olarak sentetik polimerler için uygundur (Chimene ve ark., 2016). Ancak, bu yöntem modifikasyon yoluyla doğal polimerlere genişletilebilir. İç içe ağlar, bu alanda benimsenen en etkili yaklaşımlardan biridir. Bu yöntemde farklı polimerler birlikte karıştırılır, ardından bağımsız çapraz bağlama mekanizmaları ile elde edilen hidrojel ağları birbirine geçer, ancak birbiriyle kovalent olarak çapraz bağlanmaz. Basitçe iki polimeri karıştırarak, iç içe geçen ağ her polimerin ayrı ayrı avantajlarını koruyabilir, çünkü iki polimer genellikle daha fazla veya çok sınırlı etkileşim olmadan birbirine karışır. Tipik bir örnek, poli(etilen glikol) diakrilatın (PEGDA) aljinatla harmanlanmasıdır. PEGDA ağı, kimyasal çapraz bağlama yoluyla oluşturulurken, aljinat polimerleri, iki farklı jelleşme mekanizması olan iyonotropik jelleşme yoluyla çapraz bağlanır, ancak tek bir yapıda birleştirilir (Hong ve ark., 2015). Hidrojel sisteminin kovalent olmayan bağının sağladığı tersinirlik, 3B baskı işlemi için çok önemli olan kesme inceltme özelliklerine yol açar. Örneğin, Highly vd. HA'yı adamantan ve siklodekstrin gibi farklı gruplarla modifiye ederek, çeşitli hidrojel yapılarının yüksek çözünürlükle basılmasını sağlayan bir konuk konak sistemi geliştirmiştir (Michael ve ark., 2013).

1.3.6. Doğal Polimer Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler

Çok bileşenli biyomürekkep sistemlerinin ortak özelliklerinden biri, basılabilirliği ve biyoişlevselliği geliştirmek için ikincil polimerler veya nanopartiküller gibi diğer katkı maddelerini içeren bir baz polimer sisteminin bileşimidir. Çok bileşenli biyomürekkep sistemlerinde kullanılan baz polimerlerin çoğu doğal kökenlidir. Doğal polimerler, doku mühendisliği uygulamalarında yaygın

olarak kullanılan popüler biyomalzemelerdir. Çoğu doğal polimer, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve işlevini desteklemek için gereken hücre dışı sinyali güçlendirebilen protein ligandları, hücre bağlama motifleri gibi bol miktarda biyoaktif parçaya sahiptir (Cui ve ark., 2017b).

1.3.7.Aljinat Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler

Aljinat, hücre kapsülleme ve doku iskeleleri için kullanılan en eski biyomalzemelerden biridir. Bununla birlikte, aljinat hidrojelleri ayrıca hücre yapışkan motiflerinin olmaması ve yavaş biyolojik bozunma ile ilişkilidir. Aljinat Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkeplere örnek olarak Jia vd. iyi canlılığa sahip bir biyomürekkep olarak oksitlenmiş aljinat kullanarak insan yağından izole edilmiş kök hücrelerin 3B biyobaskısını yapmaya çalışmıştır (Jia ve ark., 2014). Sonuçları, aljinat tabanlı biyomürekkebin basılabilirlik ve yapısal bütünlükten ödün vermeden kullanılan hücrelerin işlevini değiştirebileceğini göstermiştir. Basılabilirliğini geliştirmek için çeşitli ikincil doğal polimerler aljinata dahil edilmiştir. Örneğin aljinat ve bir rekombinant tasarlanmış C7 olarak adlandırılan bir protein içeren çok bileşenli bir hidrojel sistemi, 3B yapıları yazdırmak için NIH/3T3 fibroblastlarını ve insan adipoz kök hücrelerini kapsüllemek için yeni bir biyomürekkep olarak kullanılmıştır (Dubbin ve ark., 2016). Ayrıca bir başka çalışmada, aljinat polisakkaritler, karboksimetil-kitosan ve agaroz içeren daha gelişmiş bir üç polimer sistemi, 3B biyobaskı insan nöral kök hücrelerine (iNKH'ler) biyomürekkep olarak kullanılmıştır (Gu ve ark., 2016). Çalışmada, basılı hücreler başarılı bir şekilde mini doku yapılarına farklılaştırılmıştır. Aynı zamanda bu biyomürekkep aktif olan nöronlar içermekte olup gamma-aminobutirik için bir reseptörün varlığını destekleyen bicuculline kaynaklı artan bir kalsiyum tepkisi göstermiştir. Ek olarak biyoişlevselliği geliştirmek için aljinat hidrojellerine karagenan adı verilen ek polimerler de eklenmiştir. Bunun sebebi karagenanın omurgasındaki sülfat grubu, hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşması için faydalı olmasıdır. Sonuç olarak, kapsüllenmiş adipoz türevli MSH'nin aljinat-

karagenan biyomürekkebi, tek başına aljinatla karşılaştırıldığında daha yüksek canlılık ve metabolik aktivite göstermiştir (Kim ve ark., 2019b).

Bir başka çalışmada ise Hong vd. 3B biyobaskı için aljinat ve polietilen glikol diakrilat (PEGDA) iç içe geçen ağdan oluşan bir sistem geliştirmiştir. PEGDA'nın kovalent çapraz bağlanmasını ve aljinatın iyonik çapraz bağlanmasını birleştiren bu çok bileşenli hidrojel sistemi, olağanüstü kırılma dayanıklılığına sahiptir ve hücre kapsüllemesi için de uygundur. Bu iç içe geçen ağın gelişmiş mekanik özellikleri, kopma sırasında sağlam ve yumuşak bir malzeme gibi davranır. Bu sistemin avantajlarından biri, tıbbi implantasyon cihazları için faydalı bir özellik olan tersinir iyonik çapraz bağlanması nedeniyle kısmen geri kazanılabilir olmasıdır. Geri kazanılabilirliğinin yanı sıra, bu yeni hidrojel sistemi, kapsüllenmiş hücrelerin hidrojelin deformasyonu olmadan gerilmesine izin veren geliştirilmiş sertliğe sahip yüksek esnekliğe sahiptir. In vitro çalışmaları, hem polietilen glikol (PEG) hem de aljinatın yüksek sito-uyumluluğu nedeniyle 7 günden fazla kültürden sonra hücrelerin %75 ila %86 arasında canlılık gösterdiği tespit edilmiştir (Hong ve ark., 2015). Armstrong vd. polietilen oksit-b-propilen oksit-b-etilen oksit blok kopolimerleri (pluronic F-127) ve aljinatı, iki aşamalı bir 3B baskı işlemi için karmaşık bir faz davranışına sahip bir biyomürekkep olarak birleştirilmiştir. Pluronic F127'nin ağırlıkça %13'ü ve sodyum aljinatın ağırlıkça %6'sı homojen bir şekilde karıştırılmıştır ve en iyi basılabilirliğe sahip optimize edilmiş bir biyomürekkep olarak kullanılmıştır. Pluronic F127, 37°C'de kendi kendini destekleyen bir 3B geometri sağlar ve yapının yıkanması için $CaCl_2$'nin kullanılması aljinat zincirlerini daha fazla çapraz bağlayabilir. Baskı sonucunda insan mezenkimal stromal hücreleri (iMSH'ler) başarıyla yazdırılmıştır ve biyomürekkep içinde kapsüllenmiştir. On günlük kültürden sonra hücreler, baskı yapısını olumsuz etkilemeden yüksek canlılık göstermiştir. Daha ileri araştırmalarda ise, vaskülarize kemik rejenerasyonu için silisyum (Si)-, magnezyum (Mg)- ve kalsiyum (Ca)- içeren biyoseramik (BRT-H) içeren bir biyomürekkep olarak pluronic F127, sodyum aljinat ve bir jelatin karışımı kombinasyonu kullanılmıştır. BRT-H iskelesi, endotel hücre göçünü indükleyerek anjiyogenezi kolaylaştırmakla kalmayıp, aynı zamanda konakçı kan damarlarının

sızmasını da desteklemiştir. Ayrıca BRT-H iskelelerinin in vivo çalışmalarda erken vaskülarizasyonu ve daha sonra kemik rejenerasyonunu ve yeniden şekillenmesini artırabileceğini göstermiştir (Zhang ve ark., 2017).

Geliştirilmiş mekanik özellikleri nedeniyle, selüloz nanofibriller de biyomedikal uygulamalarda geniş bir alana sahiptir. Aljinat içeren selüloz nanofibriller, olağanüstü biyouyumluluk ve biyobozunma kabiliyeti sergileyen doku ve hücre kapsüllemesinin atılması için bir sünger olarak kullanılmıştır. Ayrıca, nanoselüloz-aljinat biyomürekkebi, kıkırdak onarımını amaçlayan 3B baskı insan kondrositlerine uygulanmıştır ve bu biyomürekkep, baskı işlemi sırasında mükemmel jelleşme gösterip %70'in oldukça üzerinde bir hücre canlılığı sağlarken, şekil deformasyonuna uğrama eğilimin oldukça düşük olduğu anlaşılmıştır (Markstedt ve ark., 2015). Başka bir yeni çalışmada, kapsüllenmiş pankreatik adacıklarla 3B yapılar üretmek için bir aljinat ve metil-selüloz biyomürekkep kullanılmıştır. Burada, metil-selülozun eklenmesi, düşük aljinat konsantrasyonunun viskozitesini artırabilir ve dağıtımdan sonra malzemenin akışını azaltabilir. Basılı makro-gözenekli yapı, metabolitlerin ve besin maddelerinin difüzyonunu geliştirerek adacık büyümesini ve işlevini klinik olarak desteklemiştir (Duin ve ark., 2019).

1.3.8. Agaroz

Hidrojel ağı içindeki hücre dışı matris (HAM) benzeri bileşeni zenginleştirmek için agarozu farklı doğal protein tabanlı hidrojellerle karıştırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Doğal bir polimer olarak agaroz, doku mühendisliği için iyi bilinen bir polimerdir ve sıcaklıkta bir değişiklik olduğunda jel oluşturabilir. Agaroz tabanlı biyomürekkeplerin yeni gelişimi, nanokompozit hidrojellere odaklanmıştır. Küçük bir hacimde nanokompozit eklenerek, agaroz hidrojellerin akışbilimsel özellikleri ve biyoaktiviteleri, biyobaskı amacıyla değiştirilebilir. Örneğin, bir

çalışmada agaroz, iyi mekanik özellikler ve uzun süreli bozunma özellikleri sergileyen 3B baskı için bir biyomürekkep olarak kollajen tip I ile karıştırılmıştır. Kollajen ile karıştırmanın yanı sıra, agarozun basılabilirliğini artırmak için agaroza ek bir bileşen olarak aljinat da kullanılmıştır [107]. Bir HAM proteini olarak kollajen, sisteme biyoişlevsellik kazandırmıştır ve kolajenin agaroza dahil edilmesi, daha hızlı jelleşme oranı sayesinde basılabilirliği iyileştirmiştir. Çalışma sonucunda basılı yapılar içindeki hücreler yüksek canlılığını korumuştur ve yüksek miktarda kıkırdağa özgü HAM üretmiştir (Köpf ve ark., 2016).

1.3.9. Kollajen Bazlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler

HAM'den türetilen doğal bir malzeme olarak, kollajen zincirleri, yapısal ve biyokimyasal destek sağlamak için integrin-RGD bağlanması yoluyla hücrelere bağlanabilen bir RGD peptit motiflerine sahiptir. Kollajen olağanüstü biyolojik özelliklere sahip olsa da, kimyasal çapraz bağlama yaklaşımı genellikle toksiktir ve mekanik özellikler 3B basılmış yapıyı destekleyecek kadar sağlam değildir (Yeo ve Kim, 2017). Bu sorunlar ilave polimerler ile çözülebilir. Örneğin, bir çalışmada amniyotik sıvıdan izole edilmiş kök hücreler ve MKH'ler ile basılmış kollajen-fibrin jelleri yaraları tedavi etmek için kullanılmıştır (Skardal ve ark., 2012). Başka bir çalışmada ise, taşıyıcı malzemelerin salımını kontrol etmek için 3B baskı yönteminde grafen oksit nanoparçacıkları (GO-np) ile karıştırılmış kollajen tip I ve kitosan hibrit jel sistemi kullanılmıştır. Bu sistem aynı zamanda kondrosit rejenerasyonu için gerekli olan Rank/Rankl/OPG sinyal yolunu da etkilemiştir (Cheng ve ark., 2018).

1.3.10. Desellülerize (Hücresizleştirilmiş) HAM (dHAM) Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler

Şimdiye kadar birçok çalışma, ince bağırsak submukozası, kalp kapağı, kan damarı, deri, sinir, tendon, bağ, idrar kesesi, ses teli, amniyotik zar, kalp, karaciğer ve akciğer dahil olmak üzere doku ve organların hücresizleştirilmesine ve jelleştirilmesine odaklanmıştır (Bolland ve ark., 2007; Hoshiba ve ark., 2010; Petersen ve ark., 2010; Uygun ve ark., 2010; Whitlock ve ark., 2007). dHAM'nin enjekte edilebilir jel formu (hidrojel) doku mühendisliği alanında birçok farklı avantaja sahiptir. İlk olarak dHAM'den üretilmiş hidrojeller potansiyel olarak herhangi bir 3B şekle uyabilir ve minimal invaziv tekniklerle ilgili bölgeye iletilebilir (Zhang ve ark., 2021). Başka bir ifadeyle, dHAM hidrojelleri viskoz sıvı ön jel bir kateter veya şırınga ile enjekte edilebilir, hücre büyümesi için uygun üç boyutlu bir yapıya sahiptir ve 3B baskı ile işlenip bir kusur bölgesinin geometrik şekline özel bir hidrojel oluşturmak üzere fizyolojik sıcaklıkta polimerize edilebilir (Lin ve ark., 2018; Ungerleider ve ark., 2015). İkinci olarak, bu hidrojeller doğal matrisin doğal biyolojik aktivitesine sahiptir ve immünojenik hücresel malzeme içermez (Wolf ve ark., 2012). Üçüncü olarak, dHAM'nin mekanik özellikleri, bir hidrojel konsantrasyonu değiştirilerek veya çapraz bağlanarak kontrol edilebilir veya ayarlanabilir. Son olarak, dHAM hidrojelleri modifiye edilebilir ve hücreleri, terapötik ilaçları veya diğer biyolojik olarak aktif molekülleri destekleyebilir. Bu nedenle hücresizleştirilmiş dokulardan üretilen dHAM, hidrojelleri, in vitro vasküler ağ rekonstrüksiyonu için ve in vitro hücre kültürü sistemleri, biyomürekkepler, organoid türevleri için substrat olarak hücrelere rehberlik sağlamak üzere kullanılabilir. Büyüme ortamı, dokuya özgü hücre fenotiplerini korur ve geliştirir, soy yönelimli progenitör hücrelerin kemotaksisini indükler ve hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenler (Allen ve ark., 2010; Brennan ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2009). Ayrıca dHAM hidrojelleri, daha önce de belirtildiği gibi, kalp, akciğer, beyin, sinirler ve kolon dahil olmak üzere bir yaralanmadan sonra doku onarımını desteklemek için birçok in vivo çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2021). Örnek olarak, bir çalışmada dHAM adipoz, kıkırdak ve kalp dokusundan hücre yüklü bir biyomürekkep hazırlanmıştır ve başarıyla biyobaskılanmıştır (Pati ve ark., 2014). Başka bir çalışmada, ekstrüzyon biyoyazıcı ile kalp dHAM, insan kardiyak progenitör (öncü) hücreler ve jelatin metakrilat (GelMA)'tan kardiyak yamalar basılmıştır. Burada, GelMA baskı kabiliyetini,

mekanik özellikleri ve hücre canlılığını geliştirmek için bitomürekkep içine destek malzemesi olarak eklenmiştir. Ayrıca, GelMA'ya kalp dHAM'nin eklenmesi basılabilirliği önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiş olup boyama sonuçları, kalp dHAM liflerinin basılı yamalarda homojen bir şekilde dağıldığını ortaya çıkarmıştır (Bejleri ve ark., 2018). Farklı bir çalışmada, kardiyak fonksiyonu iyileştirmek ve kardiyak hipertrofi ve fibrozisi azaltmak için, önceden vaskülarize edilmiş kök hücre yüklü kalp dHAM tabanlı biyomürekkebin biyobaskısı yapılmıştır ve elde edilen önceden vaskülarize yamalar, epikardiyal iletim yoluyla verimli bir kök hücre iletimi göstermiştir (Jang ve ark., 2017). Bundan başka, dHAM tabanlı biyomürekkeplerin biyobaskısı, kornea dokusu mühendisliği için de kullanılmıştır. Kapsüllenmiş insan konka türevli mezenkimal kök hücrelere (MKH) sahip korneadan üretilmiş bir dHAM (Ko-dHAM) biyobasılmıştır. Bu Ko-dHAM biyomürekkep, doğal korneaya benzer bir kollajen ve GAG içeriği sergilemiş olup görüş için uygun şeffaflığa sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, elde edilen sonuçlar ile kök hücrelerin yalnızca Ko-dHAM biyomürekkep içinde keratositlere farklılaştığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2019a). Ek olarak, başka bir çalışmada ise, doğal bir vasküler ağa sahip trakea da kapsüllenmiş endotelyal ve fibroblast hücreleri ile trakeal dHAM (tmdHAM)'den biyobaskılanmıştır. Sonuçlar, tmdHAM'nin endotelyal yeniden oryantasyon ve sonuç olarak vasküler oluşum için doğal bir niş sağlayabildiğini göstermiştir (Park ve ark., 2018). Düzensiz şekilli kıkırdak ayrıca kıkırdak dHAM ve fiziksel olarak çapraz bağlanabilen ve biyomürekkebin viskozitesini kontrol edebilen ipek fibroin kullanılarak 3B olarak basılmıştır. Elde edilen biyomürekkep, tavşan kemik iliği kaynaklı MKH kondrojenik farklılaşması için en uygun mikro ortamı başarıyla sağlamıştır (Jung ve ark., 2018). Deriden türetilmiş HAM, tam kalınlıkta bir 3B insan derisi modeli basmak üzere biyomürekkebi hazırlamak için de kullanılmıştır. Endotelyal öncü hücreler ve adipozdan izole edilmiş kök hücreler yüklü biyobaskılı cilt yaması, yara iyileşmesini, neovaskülarizasyonu ve in vivo yeniden epitelizasyonu iyileştirmiştir (Kim ve ark., 2018).

Doku veya organdan elde edilecek bir hidrojel oluşumu için HAM’nin protein monomerik bileşenlerine çözündürülmesi ve bu monomerik bileşenlerin molekül içi

bağlarının homojen bir jel halinde kendiliğinden yeniden oluşmasını sağlamak için sıcaklık, tuz ve/veya pH kontrollü nötralizasyon gereklidir (Saldin ve ark., 2017). Johnson vd. jelleşme parametrelerinin (süre ve sıcaklık) HAM hidrojeli üzerindeki etkisi önemini vurgulamak için tek bir nötrleştirme parametresinin (pH, sıcaklık, iyonik güç) standart koşullardan (pH 7.4, 37°C, 1x PBS) farklı bir değere değiştirilmesinin özellikle miyokardiyal HAM hidrojelinin malzeme özellikleri üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada, jelleşme süresinin azaltılmış veya arttırılmış tuz konsantrasyonu ile modüle edilebildiği anlaşılmıştır ve jelleşme sıcaklığının 22°C'nin altına düşürülmesinin jelleşmeyi engellediği gösterilmiştir (Johnson ve ark., 2011).

HAM çözünmesiyle HAM hidrojeli oluşturmak için farklı yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler içinden, parçalanmış veya toz bir HAM formunun pepsin ile çözünmesi en yaygın olanıdır. Bu işlem “HAM sindirimi" olarak da adlandırılır ve işlemde toz haline getirilen HAM, pepsin içinde seyreltik (0.1 M) hidroklorik asit (HCl) ile karıştırılır (“Freytes yöntemi”) veya HCl yerine 0,5 M asetik asit kullanılır (“Voytik-Harbin yöntemi”) (Freytes ve ark., 2008; Miller, 1972; Voytik-Harbin ve ark., 1998). Pepsin, asitte çözünmeyen kollajenin önemli bir bölümünü çözündürmek için 1972'den beri kullanılan domuz mide sıvılarından elde edilen bir enzimdir ve kollajen fibril kümelerini çözmek için kollajen üçlü sarmal yapısının telopeptid bağlarını ayırır (Drake ve ark., 1966; Hulmes, 2008). Pepsin çözünmesi, sıvı görünür parçacıklar olmadan homojen olduğunda tamamlanır (24-96 saat) (Freytes ve ark., 2008). Uygulamada, "çözünür HAM" fizyolojik pH ve tuz konsantrasyonuna nötralize edilir ve sıcaklık kontrollü jelleşme için ilgili uygulama belirlenene kadar 37°C'nin çok altında düşük bir sıcaklıkta tutulur; örneğin, in situ (yerinde) jelleşme için iğne veya kateterle enjekte edilir veya 3 boyutlu hücre kültürü için bir inkübatöre yerleştirilir (Saldin ve ark., 2017). Dokudan bir HAM hidrojelinin çözündürülmesi ve oluşturulması için bir diğer yöntem de homojenizasyon ile protein ve glikoproteinlerin eldesi sürecini içerir. Homojenizasyonda fibronektin, kolajen IV ve kolajen I'i parçalayan ve HAM'yi sindiren bir dispas enzimatik adımı, kovalent olmayan bağı daha da bozan ve HAM proteinlerinin çözünürlüğünü artıran bir üre ekstraksiyon

adımı ve çözünmeyen kalıntı HAM bileşenlerini uzaklaştıran santrifüjlem adımı bulunur. Elde edilen çözündürülmüş ekstraktların sıcaklığı 37°C'ye yükseltilerek veya asetik asitle pH 4.0'a düşürülerek bir HAM hidrojel oluşması sağlanır ("Uriel yöntemi") (Uriel ve ark., 2008).

1.3.11. Jelatin Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler

Jelatin, doku mühendisliği için bir biyomalzeme olarak yaygın şekilde kullanılan, zenginleştirilmiş RGD motifine sahip doğal bir polimerdir (C Echave ve ark., 2017). Jelatin düşük viskozite, ve mekanik bütünlük eksikliği gibi özellikleri nedeniyle ekstrüzyon yöntemiyle baskılanması zor olabilir (Panwar ve Tan, 2016). Bu sebeple, jelatin ve aljinat karışımı insan embriyonik kök hücrelerini 3B baskılamak için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır, çünkü bu kök hücreler ayrışma, kayma gerilimi, aydınlatma gibi hücresel mikro çevre değişikliklerine duyarlıdır (Ouyang ve ark., 2016).

Örneğin bir çalışmada, ağırlıkça %7,5 jelatin ve ağırlıkça %1 aljinat biyomürekkebinin hidrojel mekanik sağlamlığının yanı sıra en iyi hücre canlılığını korumak amacıyla baskı işlemi için en uygun parametre olduğu gösterilmiştir. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada ise ağırlıkça %3 (%1,5 bombyxmorisilk ve ağırlıkça %1,5 philosamia ricinisilk olmak üzere) ve ağırlıkça %7 jelatinden oluşan çapraz bağlayıcı içermeyen çok bileşenli bir biyomürekkep geliştirilmiştir. Oluşturulan bu yeni biyomürekkep, üstün biyouyumluluğu sergileyen bir deri altı fare modelinde kullanılmış olup herhangi bir uzun süreli bağışıklık reddi ortaya çıkarmamıştır. Kapsüllenmiş kondrositler, gelişmiş kıkırdağa özgü genlerin ekspresyonu ile kondrojenik potansiyel göstermiştir (Singh ve ark., 2019). Başka bir çalışmada, cilt yenilenmesi için birden fazla ilgili hücre tipini kapsüllemek için çok bileşenli bir biyobağlantı olarak bir gliserol, jelatin ve HA karışımı kullanılmıştır

(Jorgensen ve ark., 2020). Bu çalışma, umut verici klinik etkileri olan epitelizasyon ve kollajen yeniden şekillenmesi ile tam kalınlıkta yara kapanmasını teşvik etmek için cildin biyolojik olarak basılmasına olanak sağlamıştır.

Kesme inceltme özellikleri, elastikiyet, ayarlanabilir mekanik özellikler ve iltihap önleyici özellikler gösterebilen poliüretan (PU), jelatin tabanlı biyomürekkeplerin mekanik özelliklerini iyileştirmek amacıyla jelatine karıştırılıp ayarlanabilir modüllü bir poliüretan (PU)-jelatin multimateryal biyomürekkep geliştirilmiştir (Hsieh ve Hsu, 2019). Bu biyomürekkep, oda sıcaklığında mükemmel basılabilirlik ve baskıdan sonra güçlü mekanik stabilite göstermiştir. Ek olarak, kalsiyum (Ca^{2+}) varlığında PU'nun iyonik çapraz bağlanması ve 37°C'de jelatinin termal jelleşmesi gibi benzersiz çift çapraz bağlanma mekanizmaları nedeniyle, basılmış iskelenin sıkıştırma modu 3 kat artış göstermiştir. Bu biyomürekkep, yalnızca 80'den fazla katman büyük bir yapının 100 μm gibi yüksek çözünürlükte basılabilmesine izin vermekle kalmayıp, aynı zamanda MKH çoğalmasını ve kondrojenik farklılaşmayı da desteklemiştir.

Dahası, jelatinin aljinata dahil edilmesine yönelik yeni bir yaklaşım, iç içe geçmiş bir ağ yerine çok bişenli bir yapı oluşturmak için enzimatik bir süreçle geliştirilmiştir. Jelatin, fenolik hidroksil (Ph) grubunu aljinata ilave ederek ve kovalent bağlar oluşturarak enzimatik reaksiyon yoluyla kimyasal bir bağ oluşturabilir. Fibroblastların 3B biyobaskılanmasında optimal olmayan biyomürekkep olarak aljinat-Ph ve jelatin-Ph kombinasyonu kullanılmıştır. Bu kombinasyon sonucunda, hücrelerin %80'inden fazlası baskı sonrası canlılığı korumuştur ve hücreler 7 günlük kültürden sonra büyük bir çoğalma göstermiştir, ki bu da bu yeni biyobağlantının 3B biyobaskı için uygun olabileceğini göstermiştir (Arai ve ark., 2016).

1.3.12. Matrijel

Matrigel, Engelbreth-Holm-Swarm fare sarkomundan üretilen bir HAM'ye dayanır ve endotel farklılaşması ve kanser çalışmaları dahil olmak üzere in vitro çalışmalarda hidrojel iskele olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Yakın tarihli bir çalışmada, aljinat ile karıştırılmış matrigelin içinde kapsüllenmiş indüklenmiş pluripotent kök hücreleri (uPK) bir insan kortikal nöral yapısını oluşturmak için bir biyomürekkep olarak kullanılmıştır (Salaris ve ark., 2019). Burada, matrisin jelleşmesini önlemek için biyolojik baskı işlemi 0° C'de gerçekleştirilmiştir ve ekstrüzyon işlemi başlamadan önce şekil bütünlüğünü sağlamak için ek çapraz bağlama çözeltisi uygulanarak çapraz bağlama yapılmıştır. Yapılar ayrıca matrijelin jelleşmesini indüklemek için 37°C'de inkübe edilmiştir ve aljinat bileşeni aljinat-liyaz enzimi kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Bu çalışmada, kapsüllenmiş uPK'ler bir ağ aktivitesi davranışına sahip nöronlara ve glial hücrelere yüksek farklılaşma potansiyeli göstermiştir.

1.3.13. İpek Fibril Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler

İpek fibroin, ayarlanabilir mekanik özellikleri ve biyouyumluluğu sebebi ile kullanılabilir bir biyomalzeme olarak potansiyeli olmasına rağmen, ekstrüzyon işlemi sırasında tıkanmaya yol açabilecek kayma gerilmesine neden olan beta tabaka oluşumu nedeniyle 3B biyobaskıda kullanılması zordur (Cui ve ark., 2020). Bu sebeple potansiyel agregasyonu azaltmak ve ipeğin viskoelastik özelliklerini optimize etmek için sisteme genellikle ek polimerler eklenir. Örneğin, ipek fibroin ve jelatin karışımlarının kombinasyonu, fiziksel çapraz bağlama yoluyla iç içe geçen ağın oluşması nedeniyle kesme inceltme davranışı sergilemiştir (Das ve ark., 2013).Bu kombinasyon daha sonra Das vd. tarafından insan nazal inferior konka dokusundan türetilmiş MSH kapsüllemek için bir biyonik olarak kullanılmıştır (Das ve ark., 2015).

Araştırmacılar, mekanik stabilite ve sitotoksisite açısından fiziksel çapraz bağlama ve enzimatik çapraz bağlama yaklaşımları test etmiştir. Sonuç olarak, optimize edilmiş sistem, 7 günden fazla bozulma olmadan yapısal bütünlüğü koruyabilmiştir ve kapsüllenmiş hücrelerde, karşılıklı farklılaşma yeteneği göstermiştir.

1.3.14. Sentetik Polimer Tabanlı Çok Bileşenli Biyomürekkepler

Doğal polimerler değişken özelliklere sahip olabileceğinden, sentetik polimerler daha iyi yapısal karmaşıklık ve tasarım esnekliği sunabilir. HAM proteinlerinin ve ek çapraz bağlamanın eklenmesiyle, sentetik polimerler yüksek mekanik sağlamlık ve biyolojik özellikler gösterebilir (Liu ve Vunjak-Novakovic, 2016). Raphael vd. 3B biyoyazıcı için ticari olarak temin edilebilen kendinden montajlı peptit hidrojelleri kullanmıştır (Raphael ve ark., 2017). Bu çalışmada diğer hidrojel sistemlerinden farklı olarak, spesifik olarak sentezlenmiş peptid, kimyasal son işleme gerek kalmadan fizyolojik olarak iyonik mukavemet kazandırarak çözeltiden nanofibröz jele dönüştürülmüştür. Burada, peptitlerin kimyasal bileşimi hücre çoğalmasını teşvik edebilir ve hidrojelin gözenekli yapısı hücresel göçü sağlar. Bu sistem, yüksek hücre canlılığına sahip hem yumuşak hem de sert hidrojellerin basılmasına olanak sağlamıştır (Wan ve ark., 2016).

1.3. Hücreler arası matris (HAM)

Hücre dışı matris (HAM) veya hücreler arası matris (HAM), bazı çekirdek proteinlere kovalent olarak bağlanan glikozaminoglikanlar (GAG'ler) gibi proteoglikanlar ile iç içe geçmiş kolajen, fibronektin, vitronektin, laminin, tenasin, trombospondin, fibrillin ve kollajen tip II gibi proteinler ve büyüme faktörleri gibi özelleşmiş proteinlerden oluşan karmaşık bir ağdır (Manabe ve ark., 2008). Dokular

ve organlar, hücreler ve bu HAM proteinleri bileşenlerini içerir. Her doku ve organın bileşimi, birbirleriyle karşılıklı olarak etkileşime giren hücreler ve HAM ile spesifiktir. Hücreler HAM'yi üretirken, HAM tersine etkileşir ve hücrelerin davranışını etkiler. Hücreler, integrinler gibi hücre reseptörleri aracılığıyla HAM ile etkileşime girer. Hücre-HAM etkileşimleri, hücresel işlevler için önemli olan birkaç sinyal yolunu aktive eder. GAG'lar üzerinde yüklü grupların varlığı, doku ve organlarda moleküllerin ve metabolitlerin hareketine izin verir. Kollajen ve fibronektin vücudun ihtiyaç duyduğu gerekli fiziksel gücü sağlar. Elastin ve laminin proteinleri ile birlikte HAM'ye esneklik sağlarlar. Böylece HAM, doku ve organların hücre bazlı iskeletini oluşturmakla beraber doku yapılarını destekleyici, bağlayıcı ve doku gelişimini düzenleyici bir malzeme olarak kullanılır. Aynı zamanda hücre büyümesi, çoğalması, göçü ve farklılaşması gibi hücresel işlevleri düzenlemek için de kullanılabilir (Badylak ve ark., 2009). Bu sebeple, HAM'nin hücre davranışı üzerinde önemli bir etkisi vardır. Ayrıca HAM, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi çeşitli biyoaktif moleküller tarafından aktive edilen sinyal iletimini modüle edebilir (Hynes, 2009). HAM'nin düzensizliği, kanser, hipertansiyon, ateroskleroz, ve osteoartrit gibi çok çeşitli hastalıklara neden olabilir (Lukashev ve Werb, 1998).

1.5. Desellülarizasyon (Hücresizleştirme)

Hücresizleştirme yöntemi doğal HAM'nin bileşimini ve bütünlüğünü korurken, tüm hücresel bileşenlerin doku veya organdan verimli bir şekilde uzaklaştırılmasıdır (Kabirian ve Mozafari, 2020). Bundan dolayı, hücresizleştirme işlemi sırasında HAM altyapısının ve içeriğinin minimum düzeyde bozulması sağlanırken hücresel malzemeleri büyük ölçüde kaldırabilen etkili bir yöntem çok önemlidir (Xing ve ark., 2015).

Hücresizleştirme yönteminde kimyasal, enzimatik ve fiziksel yaklaşımlar gibi çeşitli yöntemler ve bunların kombinasyonları yer almaktadır. HAM bileşimini ve mikro yapısını değiştirebilen hücresizleştirme için çeşitli ajanlar mevcuttur ve istenmeyen HAM değişikliği için uygun bir ajanın seçilmesi önemlidir. Bu ajanlara asit-baz işlemi, deterjan işlemi, kenetleme ajanları, çözücüler gibi kimyasal, enzimatik yöntem gibi biyolojik ve donma-çözülme, polimerler gibi fiziksel ajanlar örnek gösterilebilir (Crapo ve ark., 2011a; Kabirian ve Mozafari, 2020). Asit-baz işlemi, sitoplazmik bileşenleri ve nükleik asitleri HAM'den katalize ederek çıkarmak için oldukça etkili bir yaklaşımdır; fakat bu işlem, büyüme faktörlerini ortadan kaldırırken HAM'nin bozulmasına ve sonuç olarak mekanik özellikleri etkilemesine neden olabilir. Deterjan işleminde, iyonik (sodyum dodesil sülfat (SDS)), iyonik olmayan (Triton X-100), ve Zitteriyonik (3-[(3cholamidopropyl)dimetilamonyo]-1-propansülfonat (CHAPS)) gibi deterjanlar hücre zarlarını ve nükleer maddeleri çözmeye yarar; ancak, bu ajanlar HAM'nin bozulmasına ve HAM'den protein çıkarılmasına neden olabilir. Ayrıca, HAM'nin hücresizleştirilmesi için DNA-protein etkileşimlerini bozan ve osmotik etkilerle hücre parçalanmasına neden olan hipotonik (Tris-HCl) ve hipertonik (NaCl) deterjanlar da kullanılabilir. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetraasetik asit (EGTA) gibi kenetleme ajanları, doku hücresizleştirme için yaygın olarak kullanılır. Bunlar, HAM'nin hücre yapışma bölgelerinde Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi metal katyonlarına sıkıca bağlanarak hücreleri bozar. Ancak hücre giderimi ve hücresel kalıntıları bırakabilir, bu nedenle yaygın olarak diğer yaklaşımlarla kombinasyon halinde kullanılırlar. Alkoller ve aseton gibi çözücüler, dehidrasyon mekanizması ile dokuları hücresizleştirebilir. Enzimatik yöntem, hücresel bileşenleri HAM'den spesifik olarak çıkarmak için tripsin ve nükleazlar gibi enzimleri kullanır. Bu yöntem hücreleri verimli bir şekilde bozabilse de enzim kalıntıları bağışıklık tepkisini indükleyebilir. Donma-çözülme, hücre içi buz kristalleri tarafından kimyasal maddeler kullanılmadan hücre zarını bozmak için çoklu döngülerde kullanılabilen fiziksel ajanlardan biridir. Biyouyumlu amfifilik bir polimer olan polietilen glikol (PEG), hücresel zarı kararsız hale getirerek doku hücresizleştirme için kullanılabilir (Crapo ve ark., 2011a).

İlk kez 2006 yılında, doku hücresizleştirme teknikleri ve bunların HAM özellikleri üzerindeki etkileri gözden geçirilmiştir (Gilbert ve ark., 2006). Bununla birlikte, yeni hücresizleştirme tekniklerinin gelişimi ve 3B tüm organ hücresizleştirmenin ortaya çıkışı o zamandan beri ortaya çıkmıştır. Hücresizleştirme işlemi, hücresizleştirmeden sonra HAM'nin etkinliğini en üst düzeye çıkarmak için ajanların belirli teknikler aracılığıyla uygulanmasıyla gerçekleştirilebilir. Hücresizleştirmede iki aşamalı perfüzyon, basınç gradyanı, süperkritik sıvı ve daldırma ve çalkalama yaygın tekniklerdir. Perfüzyon tekniğinde hücresizleştirme ajanları doku vaskülatürü yoluyla hücrelere verimli bir şekilde iletir, bu nedenle bu yaklaşım tüm organ hücresizleştirmesi için uygundur (Choudhury ve ark., 2018; Rahmati ve Mozafari, 2019). Basınç gradyanı ile hücresizleştirme ajanları dokulardan etkili bir şekilde itilebilir ve hücresel kalıntılar dokudan dışarı atılabilir. Süperkritik sıvı tekniği ile düşük viskoziteye ve yüksek taşıma özelliklerine sahip karbon dioksit gibi inert bir maddenin minimum HAM değişikliği ile hücreyi uzaklaştırması sağlanabilir (Casali ve ark., 2018). Kalp kapakçıkları, omurilik ve kıkırdak gibi birçok dokuda perfüzyon tekniği ile hücresizleştirmeye izin verecek bir damar ağı olmadığından dolayı bu tür dokularda genellikle daldırma ve ajitasyon tekniği kullanılır (Crapo ve ark., 2011b; Keane ve ark., 2015). Hem hücresizleştirme yöntemlerinin hem de kaynak dokuların çeşitliliği ve genişleyen klinik uygulama listesi, HAM'deki hücre kalıntılarının nicel bir tanıma göre objektif olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (Crapo ve ark., 2011a).

Hücresizleştirmenin değerlendirmesi ve onayı için, hücre çekirdeği tespiti ve kalan DNA miktarının belirlenmesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Ek olarak, hücre içi protein tespiti genellikle 2B kültürün hücresizleştirme onayı için kullanılır. dHAM'nin bileşimsel analizi, histokimyasal, immünokimyasal ve proteomik yöntemlerle gerçekleştirilir. Ayrıca taramalı elektron mikroskobu ve diğer yöntemlerle yapısal analizler yapılabilmektedir (Hoshiba, 2021).

1.6. DHAM' ın Doku Mühendisliğinde Kullanımı

Çok yönlü özelliklerinden dolayı HAM, hücresizleştirilmiş dokular, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için bir biyolojik iskele kaynağı olarak geniş çapta araştırılmıştır. Doku mühendisliği, yapı iskelelerinde yeniden tohumlanan hücrelerin işlevlerini eski haline getirmek için doğal HAM'yi taklit edecek şekilde tasarlanmış destekleyici yapı iskelelerine ekilen hücrelerle arızalı dokuları onarmaya, yeniden yapılandırmaya veya değiştirmeye çalışır (Xing ve ark., 2015). Bu amaçla, klinik ve preklinik araştırmalarda HAM'den oluşan biyolojik yapı iskeleleri kullanılır. Bu tür iskelelerin klinik kullanımı, HAM'nin toplandığı doku veya organın geometrik ve mekanik özellikleri ile sınırlandırılabilir. Bir başka deyişle, kaynak doku veya organ tipi ve sonraki işleme yöntemleri, bir HAM hidrojelinin topolojik, biyokimyasal, mekanik ve biyolojik özelliklerini etkiler (Zhang ve ark., 2021).

1.7. Hücre Kültüründen dHAM

Doku ve organların yanısıra kültürlenmiş hücrelerin kullanımı, HAM yapı iskelelerini oluşturmanın alternatif bir yoludur. Bazı durumlarda, hücre kaynaklı HAM'ler doku veya organ kaynaklı HAM'lerden daha iyi olabilir. Son zamanlarda, kültürlenmiş hücrelerden üretilen HAM iskeleleri, biyomedikal bilim adamlarının ilgisini çekmiştir. Çünkü kültürlenmiş hücreler, hayvan dokularına kıyasla çeşitli avantajlar sunabilir (Cheng ve ark., 2009; Narayanan ve ark., 2009). İlk olarak, kültürlenmiş hücreler patojenler için taranabilir ve ardından HAM'nin elde edilmesi için patojensiz bir durumda muhafaza edilebilir. İkincisi, hücreden üretilen HAM yapı iskeleleri, hücresizleştirilmiş doğal dokuların yeniden doldurulması sırasında meydana gelebilecek zayıf hücre penetrasyonu sınırlaması olmadan istenen geometriyi ve gözenekliliği sağlayabilir. Üçüncüsü, in vitro kültürlenmiş hücrelerin kullanılması, farklı hücre tiplerinden toplanan HAM numunelerini karıştırma esnekliği sağlar.

Ayrıca, hücre türevli HAM yapı iskelelerinin bir diğer önemli avantajı da otolog hücrelerden hazırlanarak otolog HAM (oHAM) yapı iskeleleri oluşturulabilmesidir çünkü otolog hücreler hastalardan izole edilebilir ve daha sonra laboratuvarlarda genişletilebilir (Lu ve ark., 2011). Böylelikle hücre kaynaklı HAM, allojenik HAM'nin neden olduğu patojen transferi riskini ve ksenojenik HAM'nin neden olduğu istenmeyen konak yanıtlarını önler ve sınırlı otolog doku tedarikini engeller (Scobie ve ark., 2013).

Çeşitli çalışmalar, hücre kaynaklı HAM'nin iskele olarak uygulanmasının üstünlüğü olduğunu göstermiştir (Datta ve ark., 2006; Lu ve ark., 2011). Hücreler kültürlendiğinde HAM bileşenlerini etraflarında sentezler, salgılar ve bir araya getirirler. Yeterli HAM bir kez biriktiğinde, hücreler hücresizleştirme yoluyla çıkarılabilir. Bu nedenle, hücreden üretilen HAM'ler, hücre kültürü yoluyla kolayca elde edilir. En önemlisi, kültürdeki hücreler, sentezlenen HAM proteinlerinin miktarını kontrol etmek için gen yıkımı ve aşırı ekspresyon yoluyla manipüle edilebilir (Choudhury ve ark., 2018; Fitzpatrick ve McDevitt, 2015; Senthebane ve ark., 2018). Fakat hücre kaynaklı dHAM'lerin önemli bir dezavantajı, bileşimlerinin ve mekanik güçlerinin doğal HAM'den biraz farklı olabilmesidir (Hoshiba ve Tanaka, 2016).

Kolayca elde edilebilen hücreler olan MKH, hücre kaynaklı HAM'leri yapmak için yaygın olarak kullanılır. Bu tür MKH kaynaklı HAM'ler, kök hücreleri in vitro olarak farklılaşmamış hallerinde tutabilmektedir (Lin ve ark., 2012). MKHlerin yanısıra fibroblast hücre tabakaları tip I, II, III kollajenler, elastin, GAGler, ve fibronektin gibi yüksek miktarda HAM'ler üretebildiğini birkaç çalışmada gösterilmiştir (Dzobo ve ark., 2016; Gattazzo ve ark., 2014; Senthebane ve ark., 2018; Xing ve ark., 2015). Böylelikle, fibroblast kaynaklı HAM iskeleleri, hücre yapışma yerleri ve doku mühendisliği yapıları için mekanik olarak güçlü destekler olarak kullanılabilirler (Xing ve ark., 2015). Örneğin bir çalışmada, osteoblast türevli bir HAM'nin MC3T3-E1 (osteoblast) hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını teşvik edebildiğini göstermiştir. Aynı çalışma, fibroblast kaynaklı HAM'nin aynı hücrelerin

proliferasyonunu indükleyebildiğini gösterilmiştir (Guo ve ark., 2011). Ancak başka bir çalışmada, fibroblast kaynaklı HAM'nin adipoz doku türevli MSH proliferasyonunu azaltsa da β-katenin sinyali yoluyla in vitro kondrojenik farklılaşmasını indükleyebildiği ve bu hücreler üzerinde yaşlanma karşıtı etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Dzobo ve ark., 2016). Dahası, bir çalışma, mekanik olarak gerilmiş kardiyak fibroblastlardan türetilen bir HAM'nin ventriküler hücrelerin metabolik aktivitesini iyileştirdiği ve gözlenen etkiden proteoglikana bağlı bir glikozaminoglikanın sorumlu olduğunu göstermiştir (Guo ve ark., 2013). Ek olarak, başka araştırmacılar, insan akciğer fibroblast HAM'si bir kollajen hidrojele dahil edip oluşan bu fibroblast-dHAM hidrojelin endotel hücre tabakası olan HUVEC'ler için anjiyojenik bir mikro ortam sağladığı göstermiştir. Ayrıca, aynı araştırmacılar, 3 boyutlu yapıda fibcroblast-dHAM ve anjiyojenik büyüme faktörlerinin sinerjistik bir etkisini gözlemişlerdir (Du ve ark., 2017).

1.8. 3 Boyutlu Biyoyazıcı

3B biyobaskı, hücre yüklü biyomürekkepleri 3B dijital modellerden işlevsel doku yapılarına ve organlara dönüştürme işlemidir(Vijayavenkataraman ve ark., 2016) .3 boyutlu biyobaskının klasik doku mühendisliği tekniklerine göre bazı avantajları vardır. Klasik doku mühendisliği yöntemlerinin karmaşık biyobenzer yapıları üretmedeki yetersizliği sonucunda basit dokular oluşturulur. Böylece tasarlanmış doku orijinaline benzemeyen hücre mikro çevrelerine sahip olur fakat 3B biyobaskı karmaşık, sofistike, biyobenzer doku yapıları üretme potansiyeline sahiptir (Zhang ve ark., 2016). Otomasyon, yüksek hassasiyet, istenilen şeklin üretilebilmesi ve kontrol (makro-morfoloji, gözenek boyutu, gözeneklilik, gözeneklerin bağlantıları), çok çeşitli materyallerin basılabilirliği, proteinlerin, büyüme faktörlerinin, ilaçların homojen dağılım gösterebilmeleri teknolojinin önemli avantajlarındandır (Cui ve ark., 2017a). 3B biyobaskı, sağlık sektöründe hastalık modelleme, ilaç keşfi ve rejeneratif tıp dahil olmak üzere çok yönlü uygulamaya sahiptir (Jain ve ark., 2022).

3 boyutlu biyobaskı ve 3 boyutlu baskı arasında fark vardır. İki baskı türünde de katmanlı bir yapıda 3 boyutlu baskılar oluşturulur. Fakat 3B biyobaskıda canlı bir doku oluşturmak üzere canlı hücreler yüklü biyomürekkepler ve biyolojik ajanlar kullanılırken 3B baskıda canlı hücreler ve biyolojik malzemeler kullanılmaz. Hücre ekimi için kullanılan 3B iskele üretiminde kullanılan 3B baskı, 3B biyobaskı ile karıştırılmamalıdır (Vijayavenkataraman ve ark., 2018).

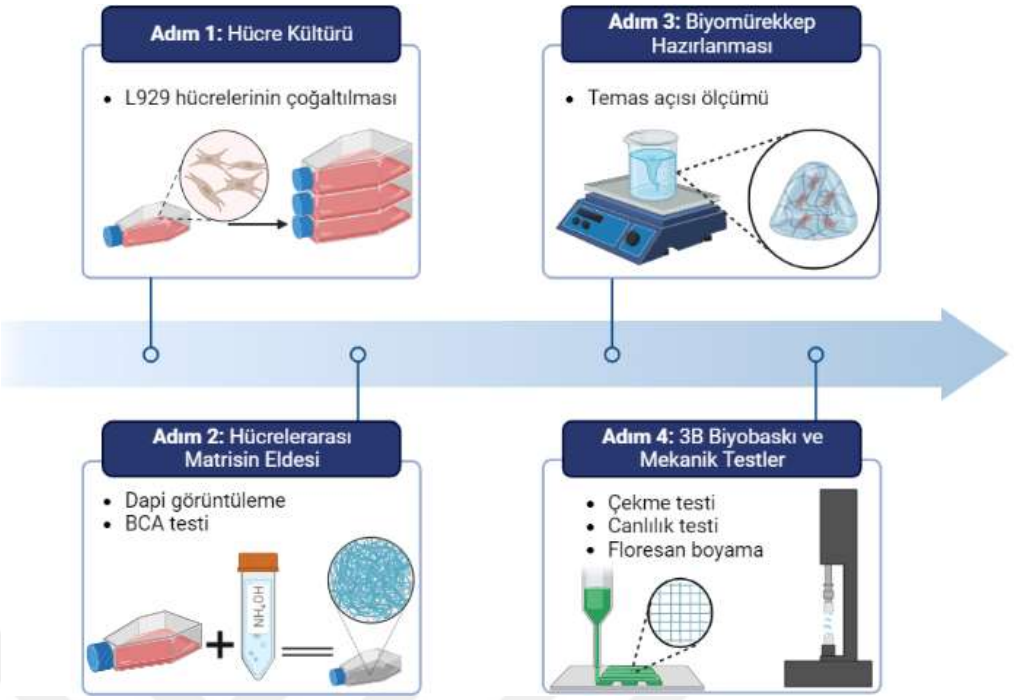
Tipik bir biyobaskı işlemi, işlem öncesi, işlem ve işlem sonrası olmak üzere kabaca üç ana adımdan oluşur (Datta ve ark., 2018). İşlem öncesi aşaması, bilgisayarlı tomografi (CT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve ultrason görüntüleme teknikleri kullanılarak doku veya organın görüntülenmesini veya uygulama alanına bağlı olarak çizim programlarında 3D modellerin oluşturulduğu aşamadır. Bilgisayar ortamında elde edilen 3 boyutlu modeller genellikle stl dosyası olarak kaydedilir ve 3B biyoyazıcı arayüzüne aktarılır. İşlem adımı, hastalardan veya hücre hatlarından hücrelerin toplanması, biyobaskı işlemi için in vitro veya ex vivo olarak kültürlenmesi ve çoğaltılması ile başlar. Basılması amaçlanan dokuyu taklit eden özelliklere sahip uygun biyomürekkep seçilir ve hücreler biyomürekkep içinde süspanse edilir. Hücre yüklü biyomürekkep bir biyoyazıcı kullanılarak tasarlanan 3B modele göre basılıp canlı doku veya organ benzeri yapılara dönüştürülür. İşlem sonrası aşama, hastalara nakledilmeden veya hastalık modelleme veya ilaç testi için in vitro modeller olarak kullanılmadan önce doku olgunlaşması için bir biyoyazıcıda basılmış yapıların muhafaza edildiği ve gerekli biyolojik ajanlar yardımıyla olgunlaştırıldığı aşamadır (Vijayavenkataraman ve ark., 2018).

Tüm biyobaskı yöntemleri benzer ürünler üretse de baskılama yöntemlerine göre sınıflandırılabilir. Biyobaskı yöntemlerinin çoğu üç ana sınıfa ayrılır: damlacık/inkjet tabanlı, lazer tabanlı ve ekstrüzyon tabanlı.(Persaud ve ark., 2022) her birinde biyomürekkep dağıtımı otomatize sistemle gerçekleştirilir ve CAD programları ile

baskı planı cihaza aktarılır. Modelin şekline bağlı olmadan baskı x, y ve z düzlemlerinde hareketle baskı alınır (Ozbolat ve ark., 2017).

1.9. Hipotez

Hidrojel tabanlı matris iskelelerinin hücrelerin tutunmasında, çoğalmasında, farklılaşmasında ve haberleşmesinde etkili oldukları bilinmektedir. Biyobenzer olarak tasarlanan hücre iskelelerin hücrenin biyolojik ortamda bulunduğu mikroçevreyi taklit etmesi doku mühendisliği çalışmalarında büyük önem arz etmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda biyobenzer iskele malzemesin doğal veya sentetik polimerler yerine, doku veya organların içinde bulunduğu biyolojik ortamlarından elde edilen ekstraselüler malzemeden üretilmesi fikri ortaya çıkıştır. Farklı çalışmalar dokuların hücresizleştirilmesi ile elde edilen HAM' ın doku mühendisliği çalışmalarında faydalı olabileceğini ortaya koymuştur. Fakat donör dokusunun yetersiz kaldığı veya olmadığı durumlarda doku parçalarından yeterli dHAM eldesi mümkün olmamaktadır. Yakın zamanda 2 boyutlu hücre kültüründen de dHAM'nin elde edilebileceği gösterilmiştir.(Franco-Barraza ve ark., 2016) Literatür taramalarında hücre kültürü tabanlı dHAM'nin yenileyici tıpta kullanılabileceğini anlatan çalışmalara rastlanmıştır. Fakat dHAM'nin 3 boyutlu biyobaskıda kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Hücre kültüründen elde edilen dHAM'ın biyomürekkep içerisinde kullanılabileceği, bu sayede biyomürekkebin hücrelerin doğal ortamlarında içinde bulunduğu mikroçevreyi daha iyi taklit edebileceği düşünülmüştür. Biyobenzer olan dHAM içerikli hidrojel biyomürekkebin ise 3 boyutlu yapılarda hücre canlılığını olumlu yönde etkilemesi beklenmektedir. Tez deneylerinin planlaması şekil 1.1' de gösterildiği gibidir.



Şekil 1.1 Tezin adımları ve deney planı

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

2.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi

Tez çalışması için kullanılan l929 hücre hattı LONZA Group AG'den ticari olarak tedarik edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan L929 hücre hattı ile ilgili gerekli bilgiler aşağıda verilmiştir:

- Hücre: L929 fare fibroblast hücre hattı
- Yaklaşık 2,7 milyon hücre içeren 1 x cryo tüp l929 hücre hattı
- Mezenkimal Besiyeri Ortamının içeriği: MEM, %10 FBS, %1 Pen-Strep,

Satın alınan hücreler, kullanılmadığı süre boyunca DMSO içeren freezing media içerisinde sıvı azot tankında muhafaza edildi. Hücreler kültürlenme aşamasında, azot tankından koruyucu ekipman kullanılarak çıkarıldı. Cryo tüp içindeki Hücrelerin osmotik şoka uğramaması amacıyla hücreler 37° su banyosunda içinde küçük bir buz parçası kalana kadar hızlı bir şekilde çözdürüldü. Su banyosu kontaminasyon riskine açık bir ortamdır. Olası kontaminasyon riskine karşı tüp etanolle dikkatli bir şekilde silindi. Cryovial tüp, steril sınıf II Laminar kabin içerisinde açıldı. Dmso içeren besiyerinden uzaklaştırmak amacıyla hücreler önden yine su banyosunda 37°C ye ısıtılan 1ml complete MEM besiyeri (MEM, %10 FBS, %1 Pen-Strep) ile toplanıp serolojik pipet yardımı ile 15 ml'lik santrifüjlenebilir falkon tüpe alındı. Dmsonun hücreye verdiği zararı en aza indirmek amacıyla falcon tüp üzerine 5 ml Daha MEM besiyeri eklendi. Falkon tüpe toplanan hücreler 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüp üzerinde biriken süpernatant vakumlu serolojik pipet yardımı ile

çekilerek atıldı. Hücre peleti falkon sertçe sallanarak parçalandı. Bu sayede hücreler Tüp içerisinde aspire edilmeyen 0.5 ml kadar besiyeri içerisinde homojen bir şekilde çözündü. Çözünen hücreler üzerine 10 ml taze besiyerinden eklendi ve hücreler süspanse edildi. Falcon tüp içerisindeki hücrelere stres yaşatmadan yavaş bir şekilde toplandı ve Tc-75 kültür kabına alındı. Hücre kültür kabı ters ışık mikroskobunda kontrol edildi ve hücrelerin canlı oldukları doğrulandı. Hücre kabı olası kontaminasyon riskine karşı %70 etanol ile silindikten sonra %5 karbondioksit (CO_2) ve 37°C sahip hücre inkübatörüne kaldırıldı.

2.1.2. Hücrelerin 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.

Hücre kültüründe çoğaltılan hücreler besiyeri ile beslenip çoğalırlar. Hücreler kültür yüzeyinin büyük bir kısmını kapladığında çoğalma hızları düşmektedir. kontakt inhibisyon adı verilen bu mekanizma sonucunda hücreler çoğalmayı durdurur ve metabolik atıklarını hücre besiyerine vermeye devam ederler. Metabolik atıklar sonucunda toksik hale gelen besiyeri bu sefer hücrelere zarar vermeye başlar. Bu nedenle hücrelerin çoğalmasını sağlamak amacıyla hücreler %80 konfuluent oranına ulaştığında pasajlanması gerekmektedir. Pasajlama sonrası hem metabolik atıklar uzaklaştırılmış olur hem de hücreler yeni kültür kabında daha az alan kapladıklarından büyüme hızları düşmez.

Pasajlama aşamasında ilk olarak hücreler inkübatör içinden alındı. Ters ışık mikroskopu ile canlılıkları ve yüzeye tutundukları doğrulandı. Hücre kabı alkol ile temizlendikten sonra steril laminer akış kabinine taşındı. Metabolik atıkların da içinde bulunduğu besiyeri vakum ile aspire edildi. Artık besiyerinden uzaklaştırmak amacıyla Kültür kabı içine, üzerine yüzeyi kaplayacak kadar DPBS eklendi. Hücre kapının yüzeyi dikkatli bir şekilde DPBS ile yıkandıktan sonra tekrar aspire edildi. Yüzeye yapışan hücreleri kaldırmak amacıyla 1.5 ml tripsin edta kullanıldı. Hücre kabı yüzeyi tripsin edta ile tamamen kaplandıktan sonra. Bir enzim olan tripsinin optimum çalışma sıcaklığı 37°C dir. Bu nedenle tripsin ekli hücre kapları 3 dakika boyunca 37°C de inkübe edildi. İnkübasyondan alınan hücre kabına hafifçe vurarak hücrelerin tamamen kabın yüzeyinden kalkması sağlandı. Ters ışık mikroskopunda hücrelerin tamamen kalktıkları doğrulandı. Hücreler kalktıktan sonra hala aktif olan tripsin enzimi üzerine 3 ml %10 FBS içeren taze hücre besiyeri eklendi. FBS tripsin enzimini inhibe ederek çalışmasını durdurur. Tripsini hücre kültüründen uzaklaştırmak adına besiyeri içindeki süspanse hücreler serolojik pipet ile çekilip 15 ml'lik falcon tüpüne aktarıldı. Falcon tüp santrifüj 5 dakika boyunca 300 g kuvvetinde santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda tüpün üzerindeki süpernatant çekildi ve hücre peleti parçalandı. Hücreler taze besiyeri içinde süspanse edildikten sonra eşit olarak 4 faklı Tc 175 kabına aktarıldı. Her bir kültür kabının üzerine taze besiyeri eklenerek besiyeri 14 ml'ye tamamlandı. Her hücre kültürü kabında hücrelerin varlığı ışık mikroskopunda doğrulandıktan sonra, hücre kültürü kapları 37°C sıcaklığa ve %5 karbondioksit içeriğine sahip hücre inkübatörüne kaldırıldı.

2.2. Hücre Kültürünün Hücresizleştirilmesi ve HAM Eldesi

Hücre kültüründen ecm etmek amacıyla iki farklı protokelden iki farklı tampon çözelti hazırlandı. İki solüsyon ile hücresizleştirme deneyleri yapıldı. Solüsyonların içeriği aşağıda verilmiştir:

Solüsyon 1

- 20mM NH_4OH
- dH_20

Solüsyon 2

- 20mM NH_4OH
- DPBS
- %0,5 Triton X-100

Hücreler denemeler için 6 kuyucuklu petri kabı ve 100 mm petri kaplarına ekildi. Hücresizleştirme deneylerinde hücrelerin çıkarıldığını ve geriye sadece ecm kaldığını göstermek için gerekli koşul petri kaplarında dapi boyamasının hücreye özgü ışıma göstermemesi olarak kabul edildi. Petri kaplarına ekilen hücrelerin hücresizleştirilmesi adına ilk olarak solüsyon 1 ile 1. protokole uygun işlem yapıldı. Ekili hücrelerin medyaları çekildikten sonra DPBS ile hücreler yıkandı. Stok solüsyonu 6,44 mM olan NH_4OH çözeltisinden 30µl alınarak 10 ml ddH_2O içerisine eklendi. 6 well plate ve 100 mm dish te %90 üzerinde confluent oranına ulaşmış hücrelerin medyası çekildi. Hücreler DPBS ile yıkanarak medya uzaklaştırıldı. 100 mm dish üzerine 3 ml 6 well plate de ekili her kuyu için 0.5 ml solüsyon 1 verildi. Kültür kapları 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Solüsyon içerisindeki NH_4OH'ı uzaklaştırmak adına bol miktarda (kabın tamamen dolduracak kadar). ddH_2O eklendi. Daha sonra çözünen hücresel materyal dikkatli bir şekilde kap üzerinden serolojik pipet yardımı ile alındı ve atıldı.

10 ml DPBS içerisine 30 µl NH4OH ve 50µl Triton X-100 eklenerek solüsyon 2 hazırlandı. Protokol 2 deneyleri için benzer bir süreç izlendi. Tekrardan 6 well ve 100 mm dish te %90'ın üzerinde konfluent oranına ulaşmış hücrelerin medyaları çekildi. DPBS ile yıkandı. Üzerlerine 0.5 ml ve 3 ml solüsyon eklendi. Petri kapları 37°C ye sahip inkübatörde 5 dakika boyunca inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon süresinin sonucunda petri kapları dikkatle alındı, üzerine kabı dolduracak kadar DPBS

eklendi. HAM'ın çökelmesi için örnekler 12 saat boyunca +4 buzdolabına tutuldu. Sürenin sonunda üzerindeki DPBS ve solüsyon 2 karışımı dikkatlice çekildi.

2.3. Hücresizleştirmenin Gösterilmesi

Hücrelerin kültür kabından başarıyla çıkarıldığını göstermek adına hücre kapları %4 paraformaldehit solüsyonu ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek fikslendi. PBS ile yıkama işleminin ardından yüzeyi kaplayacak kadar DAPI boyası eklendi. Mikroskop görüntüleri Zeiss Cell Discoverer cihazından DAPI görüntüleri 358nm absorbans değerine 461nm ışma dalga boyuna sahip filtre ile alındı. Yüzeyi kaplayan HAM görüntüleri aynı mikroskopta phase contrast ayarında görüntülendi.

2.4. HAM Varlığının Kontrolü

Yüzeyde mikroskop ile görülemeyen ecm proteinlerinin varlığını göstermek adına "Pierce™ BCA Protein Assay Kit" kullanarak ecm proteinlerinin varlığı ve miktarı ölçüldü. Protein ölçümü almak adına 6 well ve 100 dish üzerinde hücresizleştirme işleminden sonra petri kabı yüzeyinde var olan HAM proteinlerinin toplanması amacıyla cell scrapper kullanıldı. Yüzeydeki proteinler 50 µl DPBS damlatılarak toplandı. Yüzeden kazınan proteinler 1ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Protein kiti içerisinden çıkan örnek albümin standart ampülleri ile seri seyreltme yapıldı. Seri seyreltme kit içerisinde bulunan kullanım kılavuzua uygun şekilde hazırlandı. Seyreltilmiş örnekler 96 well plate üzerindeki kuyucuklara yüklendi. Benzer şekilde HAM örnekleri de aynı 96 well plate üzerine yüklendi. Kit içeriğinden çıkan reaksiyon solüsyonları kılavuza uygun olarak her bir kuyucuğa verildi. Kuyucuk başına 196µl A reaksiyon solüsyonu ve 4µl B reaksiyon solüsyonu eklendi. Test kiti

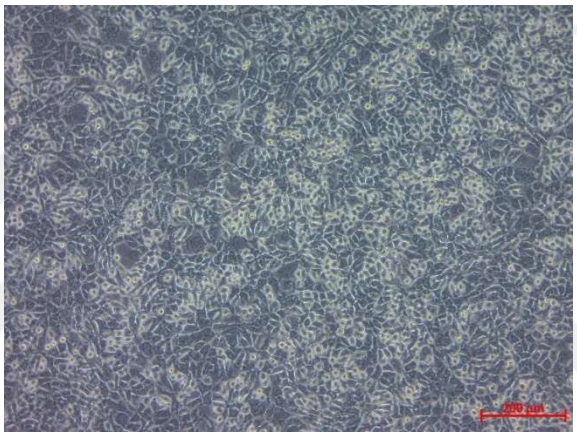
renk değişimine göre protein miktarını göstermektedir. Renk değişiminin gerçekleşmesi için kimyasal tepkimenin başlaması ve devam etmesi gereken sıcak 37°C dir. Bu amaçla 96 well plate 37°C'ye sahip inkübatörde inkübasyona kaldırıldı. Renk değişimi gözlenen örneklerin okunabilmesi adına ölçümler 562 nm'de EpochTM Microplate Spectrophotometer cihazından alınmıştır. 3 tekrarlı yapılan ölçümlerin ortalaması alınarak protein konsantrasyonu ölçümü yapılmıştır.

2.5. Büyük Ölçekte Hücre Kültürü Tabanlı dHAM Üretilmesi

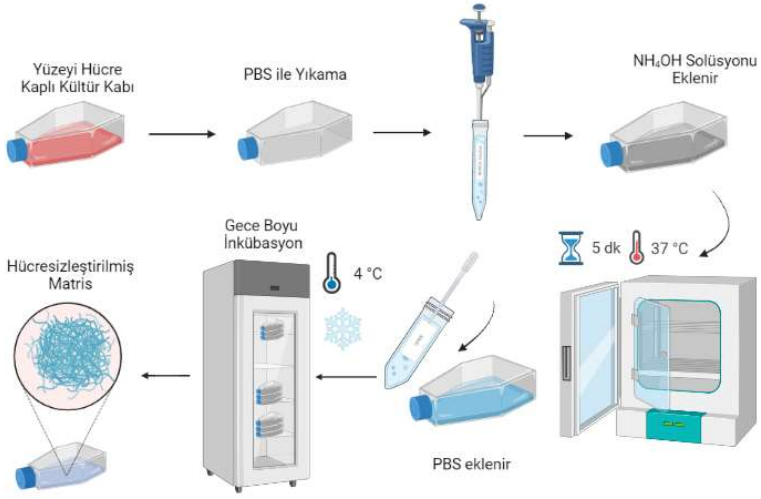
Elde edilebilirlikleri önceki deneylerde gösterilen hücresizleştirilmiş dHAM'leri büyük ölçekte üretmek ve 3B biyoyazıcıda kullanmak amacıyla büyük miktarda hücreye gereksinim duyuldu. Bu ihtiyacı karşılamak adına ilk olarak Tc 75 kabında bulunan hücreler seri Pasajlama işlemlerinin ardından çoğaltıldı. Çoğaltma işlemleri sonucunda 8 adet Tc 175 hücre kapını dolduran hücre elde edildi (yaklaşık olarak 192*10^6 adet hücre). Yüksek miktarda HAM üretilmesi amacıyla şekil 2.1' de gösterildiği üzere hücrelerin yüksek doluluk miktarına ulaşmasına izin verildi. Bu kütür kaplarının yarısı sıvı nitrojen içinde donduruldu. Geriye kalan 4 adet Tc 175 kabı pasajlanmaya devam edildi. Seri pasajlamadan sonra 2 adet Tc 175 ve 10 adet Tc 75 kabından protokol 2 de anlatılan teknik ile dHAM elde edildi.

dHAM Eldesi için şu adımlar izlendi, hücresizleştirilecek hücre kültürü kapları üzerindeki besiyeri aspire edildi, artık besiyeriyerinin uzaklaştırılması amacı ile pbs ile yıkandı. Yıkanan hücreler üzerine 20mM NH_4OH ve %0,5 Triton X-100 içeren DPBS içerisinde hazırlanmış çözelti eklendi. Her kültür kabında yüzyi kaplayacak kadar NH_4OH çözeltisi kullanıldı. Tc 75 için 4 ml, Tc 175 için ise 10 ml çözelti eklemesi yapıldı. kültür kapları %5 CO_2 ve 37°C sıcaklığa sahip hücre inkübatöründe 5 dakika boyunca inkübe edildi. 5 dakikanın sonunda kültür kapları sarsılmadan inkübatörden alınarak üzerine NH_4OH çözeltisinin 3 katı kadar DPBS eklendi. Hücre

kaplarının sterilliğini korumak adına kapların kapakları parafilm ile kapatıldı. Yüzeyde birikerek oluşan HAM'ın bir noktada birikmesi amacıyla kültür kapları gece boyunca +4 buzdolabında tutuldu. Hücresizleştirme sürecinin göresel olarak anlatımı şekil 2.2' de gösterilmiştir. dHAM cell scrapper ile toplandı 50 ml'lik falcon tüp içerisinde toplanarak santrifüjlendi. Tüp üzerindeki artık PBS ve solüsyon 2 içeriği dikkatlice çekildi. Hücrelere zararlı olabilecek solüsyon içeriğini uzaklaştırmak adına tüp içerisine DPBS eklenerek dHAM üzerinde tekrar yıkama yapılarak santrifüjlendi. yıkama işlemi 2 defa daha tekrarlandı bu sayede NH_4OH ve Triton X-100 dHAM'dan uzaklaştırılmış oldu.



Şekil 2.1 hücresizleştirme öncesi l929 hücreleri



Şekil 2.2 Kültür kaplarının hücresizleştirilmesi

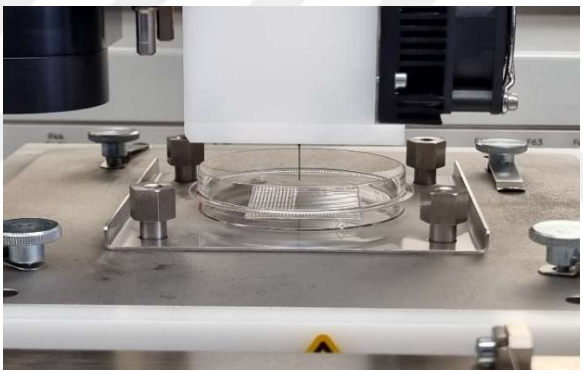
2.6. 3B Biyoyazıcı İçin Biyomürekkep Hazırlanması

Biyomürekkep 3B biyoyazıcı için hücreleri taşıyan bir iskele görevi görür. Biyomürekkebin hazırlanması için 10 ml ddH_2O ve 10 ml MEM hücre besiyeri manyetik karıştırıcıya aktarıldı. Karıştırma sıcaklığı 37°C ye ayarlandı. Karışım homojenize olduktan ve istenilen sıcaklığa geldikten sonra üzerine önceden ultraviyole ışınına maruz bırakılmış 0,5 gram sodyum aljinat kontrollü bir şekilde eklendi. Aljinatın karışım içerisinde iyice çözünebilmesi için 2 saat boyunca karıştırmaya devam edildi. Karışım üzerine daha sonra 1,6 gram jelatin eklendi. 4 saat boyunca süren karıştırılmanın ardından. Elde edilen dHAM, karışım içine eklendi. Karışım toplam 6 saat, 30 dakika boyunca karıştırılmış oldu. Son durumda elde edilen yüksek viskoziteye sahip dHAM katkılı biyomürekkep %0,5 dHAM %2,5 sodyum aljinat ve %8 jelatin oranına sahip oldu. Çalışmanın etkinliğini gösterebilmek adına dHAM içermeyen kontrol gurubuna ait biyomürekkep de benzer yöntemle hazırlandı. Son durumda Kontrol grubu jelinin içeriği %2,5 sodyum aljinat ve %8 jelatin oranına sahip oldu. Hazırlanan biyomürekkeplerin ağzı sıkıca kapatılarak 50 ml falkon tüpe aktarıldı. İçindeki hava kabarcıklarından arındırılmak amacıyla 12 saat boyunca 37°C sıcaklığa sahip hücre inkübatöründe tutuldu.

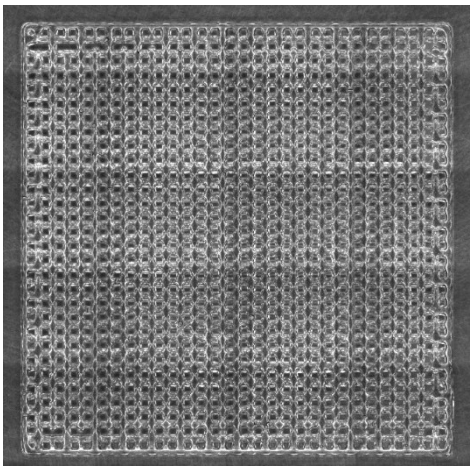
2.7. 3 Boyutlu Biyobaskı

Hücre kültüründe çoğaltılan hücreler hücre kabından kaldırılarak 15 ml falcon tüp içine toplandı. Her mililitre jele karşılık 1 milyon hücre olacak şekilde toplam 10'ar milyon hücre hem kontrol hem de dham içeriğine sahip iki ayrı biyomürekkep içinde süspanse edildi. Bunun için hazırlanan biyomürekkepler ve hücreler 5dk boyunca 37°C sıcaklığa sahip manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Biyomürekkepler içerisinde süspanse edilen hücreler 3B biyoyazıcı kartuşuna toplandı. Kartuş cihaza yüklendi kartuş sıcaklığı 37°C ye baskı tablası sıcaklığı ise 4°C ye ayarlandı. Fusion 360

programında çizilen 30*30*3 mm boyutlarındaki ızgara görünümüne sahip kare prizma cihaz arayüzüne aktarıldı. Baskı için 0.25 mm kalınlığında iğne ucu kartuşa takılarak baskı işlemine geçildi. Şekil 2.3'te görüldüğü üzere baskılar 60 mm kültür kabı üzerine alındı. Şekil 2.4'te görüldüğü üzere baskılanan ızgara biçimli yapıların 3D bioyazıcı cihazının kendi kamerasından farklı katmanlar için fotoğraflar çekildi. Baskısı alınan her 3 boyutlu yapı üzerine 5 mililitre 100mM steril $CaCl_2$ eklendi. $CaCl_2$ baskılanan yapının içinde çapraz bağların oluşmasını sağlamak amacı ile eklenmiştir. 3 boyutlu baskılar $CaCl_2$ içerisinde 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra $CaCl_2$ mikropipet yardımı ile kültür kabı içerisinden çekildi. Baskıların kurumaması ve hücrelerin beslenebilmesi adına kültür kapları içine 3 ml 37°C MEM besiyeri eklendikten sonra kültür kabı içindeki baskılar 37°C ve %5 CO2 oranına sahip hücre inkübatörüne kaldırıldı.



Şekil 2.3 3b biyobaskı



Şekil 2.4 Izgara görünümüne sahip biyobaskı

2.8. Temas Açısı Ölçümü

Baskılanabilirlik testi için cihaz manuel itme konumuna alındı. 10 saniye boyunca 1.5 bar basınç uygulanarak iğne ucundan damlacık şeklinde biyomürekkep elde edildi. Damlacık kültür petri kabından kesilerek elde edilen poilstiren malzeme üzerine alındı. 3x lens kullanılarak fotoğraf kamerası ile yatay eksende 90° açı yapacak şekilde fotoğrafı çekildi. Temas açısının ölçümü imageJ programı ile yapıldı.

2.9. Çekme Testi

Kontrol gurubu ve hücreler arası matriks eklenmiş biyomürekkep ile baskılanan yapılar şekil 2.7'de gösterildiği gibi çekme testine sokuldu. Test cihazı olarak shimadzu Precision Universal / Tensile Tester cihazı kullanıldı. Baskılanan örnekler dikkatli bir şekilde cihaza yerleştirilerek sabitlendi. Her örnek 3 tekrar olacak şekilde test cihazına aktarıldı. Örnekler kopana kadar örneklere y ekseni boyunca çekildi. Çekme testinde 50N luk yük hücresi kullanılmıştır. Otomatik oluşturulan Çekme verileri hesaplamalar için Excel tablosuna aktarılmıştır. Malzemenin uzama miktarındaki değişim(ε) şekil 2.5'te gösterildiği gibi mühendislik gerinimi denklemi ile hesaplandı

$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L}$$

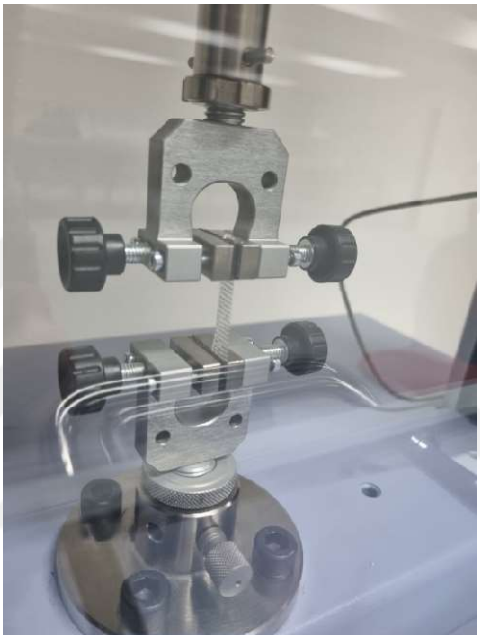
Şekil 2.5 Mühendislik gerinimi denklemi

Malzeme gerilimi ise şekil 2.6'da gösterildiği gibi mühendislik gerilimi(σ) denklemi kullanılarak hesaplandı. Alınan her veri denklemler kullanılarak elde edilen

gerilim ve gerinim değerlerine çevrildi. Bu değerler sayesinde gerilim ve gerinim grafiği çizildi.

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

Şekil 2.6 Mühendislik gerilimi denklemi



Şekil 2.7 Çekme testi

2.10. Alamar Blue Canlılık ve Çoğalma Testi

3 Boyutlu biyoyazıcı kullanılarak basılan yapılar içindeki hücrelerin 7. Günde çoğalma ve canlılıklarını analiz etmek amacıyla alamarBlue™ Cell Viability Reagent kullanıldı. 2ml MEM besiyeri içerisinde tutulan baskıların besiyerine 200 µl alamar Blue eklendi. baskılar ışık görmeyecek şekilde 4 saat boyunca inkübasyona alındı. İnkübasyon sonucunda örneklerin besiyeri 110µl alınarak 96 well plate içerisine toplandı. HAM içermeyen Kontrol grubu ve HAM içeren baskı grubu besiyeri 4

tekrarlı olacak biçimde yüklendi. Kolorimetrik ölçüm boyunda EpochTM Microplate Spectrophotometer ile yapıldı. dalga boyu 570 nm seçilerek okuma alındı.

2.11. İstatistiksel Analiz

Yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar arası farkların istatistiksel olarak anlamlı veya anlamsız olduğunu belirlemek amacıyla GraphPad Prism 9 yazılımı kullanıldı. İstatistiksel analiz bu program yardımı ile yapıldı ve bağımsız Student t testi kullanıldı. Sonuçlardan elde edilen grafik yine GraphPad Prism 9 programı ile çizilmiştir. Biyolojik canlılık testi 4 tekrar (n=4) olacak şekilde yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

Bu Tez çalışmasında 2 boyutlu kültürlenen hücrelerin ürettiği hücre dışı matrisin toplanarak 3 Boyutlu baskı için hazırlanan biyomürekkebin yapımında kullanılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda hücresizlerin genetik materyalinin çıkarıldığını gösteren hücre boyaması, hücreler arası matrisin varlığını göstermek amacıyla bikinkoninik asit (BCA) testi yapılmıştır. Biyomürekkebin basılabilirliğini göstermek amacıyla temas açısı ölçümü, baskının mekanik özelliklerini belirlemek için çekme deneyi yapılmıştır. Son olarak hücrelerin basılan hidrojel içerisinde yaşadığını göstermek amacıyla Hücrelerin proliferasyonunu canlılığını ve gösteren Alamar blue ve LIVE/DEAD™ boyamaları yapıldı.

3.1 Hücresizleştirme Solüsyonunun Seçilmesi

İki çözelti için de hücresizleştirme deneyleri yapıldı. 20mM NH_4OH ve dH_2O içeren solüsyon 1 100mm petri kabına ekilen hücrelere verildi. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında solüsyonun hücreler üzerinden uzaklaştırılmasını sağlamak amacı ile petri kabını dolduracak kadar dH_2O petri kabına verildi. Solüsyon içerisinde çözünmüş halde bulunduğu düşünülen genetik materyal dikkatli bir şekilde aspire edilerek petri kabından ulaştırıldı. Genetik materyalin ekili hücrelerden tamamen çıkarıldığını göstermek adına DAPI ile boyamak üzere +4° C sıcaklığa sahip buzdolabına kaldırıldı.

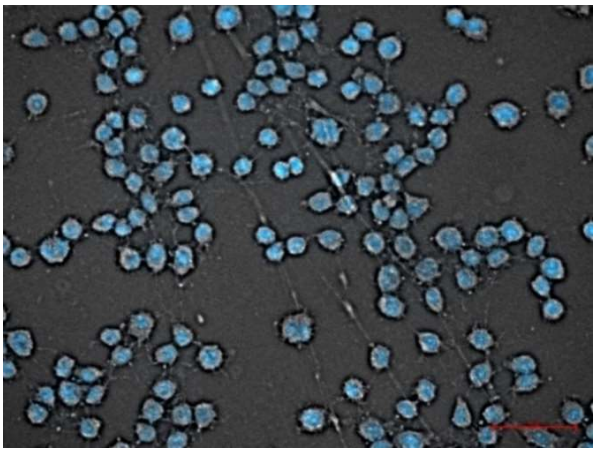
20mM NH_4OH, %0,5 Triton X-100 ve DPBS içeren solüsyon 2 hazırlandı. 100 mm petri kabına ekilen hücreler üzerine 3 ml Solüsyon 2 verildi. Petri kabı 37°C sıcaklığa sahip hücre inkübatörü içinde 5 dakika boyunca inkübe edildi. Solüsyonun

hücrelere olan etkisini azaltmak adına petri kabı üzerine 20 ml DPBS verildi. Hücre dışı matrisinin petri kabının yüzeyinde kalmasını sağlamak adına gece boyunca kalması için + 4° C sıcaklığa sahip buzdolabına kaldırıldı. Ertesi gün yüzeyde çözündüğü düşünülen genetik materyal dikkatlice aspire edildi. DAPI boyaması yapılmak üzere petri kabı +4°C sıcaklığa sahip buzdolabına kaldırıldı.

3.2. DAPI Boyaması

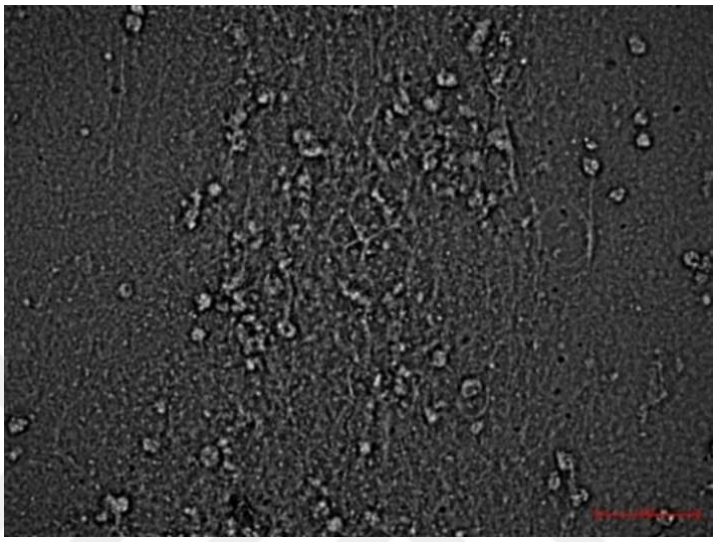
Faklı solüsyonlar ile hücresizleştirilen hücrelerin genetik materyalinin olmadığını göstermek amacı ile örnekler %4 paraformaldehit çözeltisi ile 20 dakika boyunca fikslendi DPBS ile yapılan yıkamanın ardından örnekler dapı (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) ile karanlık ortamda boyandı. 5 dakika süren oda sıcaklığında inkübasyonun ardından zeiss cell discoverer 7 cihazında dapi filtresinde görüntü alındı.

Şekil 3.1’ de görüldüğü gibi solüsyon 1 ile muamele edilen hücrelerde dapi boyaması hücre çekirdeği içinde ışıma verdi ve genetik materyalin ve hücrelerin istenildiği gibi hücre kabı yüzeyinden uzaklaştırılamadığı gösterildi.

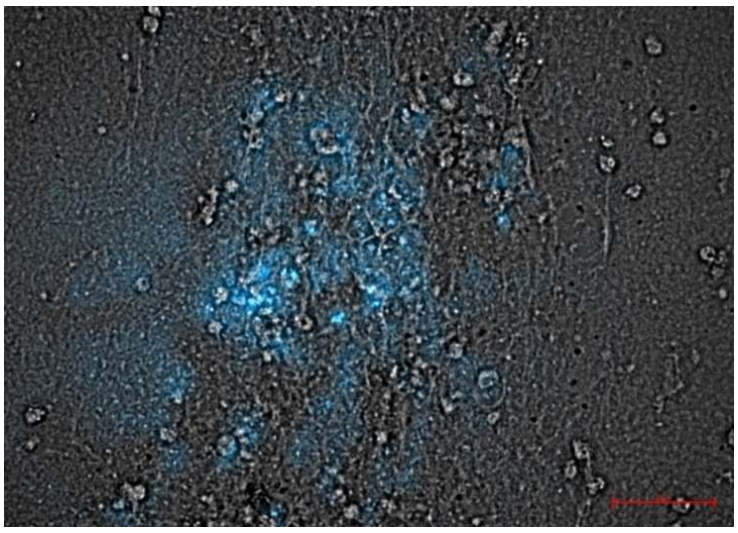


Şekil 3.1 Solüsyon 1 ile muamele edilmiş DAPI boyalı hücreler

Şekil3.3'te görüldüğü gibi Solüsyon 2 ile muamele edilen hücrelerde DAPI boyaması hücreye özgü ışıma vermedi. DAPI boyaması sonucunda hücrelerin ve genetik materyalinin yüzeyden başarılı bir şekilde uzaklaştırılabildiği gösterildi.



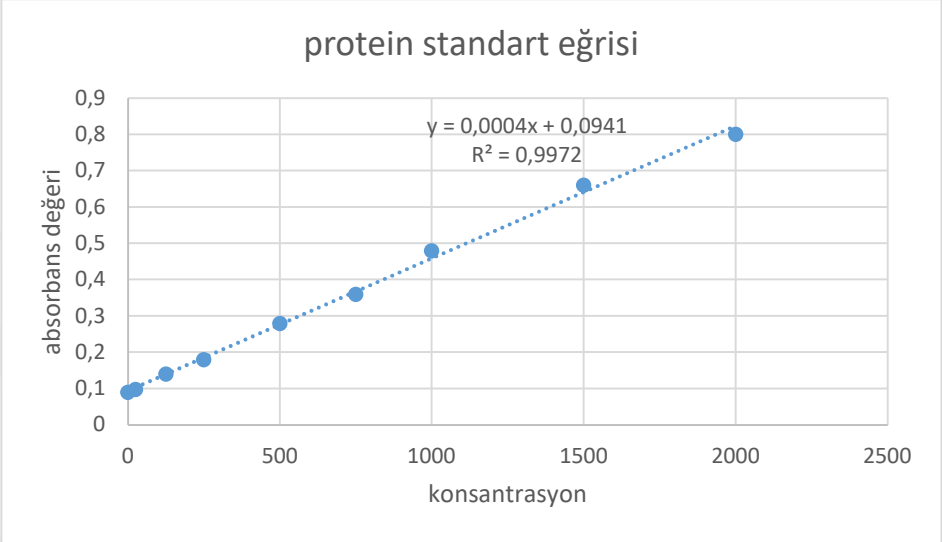
Şekil 3.2 Solüsyon 2 ile muamele edilmiş hücreler



Şekil 3.3 Solüsyon 2 ile muamele edilmiş hücrelerin DAPI filtreli görüntüsü

3.3. Bikinkoninik Asit (BCA) Testi

Hücresizleştirilen örneklerde hücre dışı matrisin varlığı BCA testi ile gösterildi. Hücresizleştirilen örnekler cell scrapper ile 150µl pbs içinde toplandı. 96 well plate içine toplanarak okuma alındı. Öncelikle DPBS için test kiti kurallarına uygun olacak şekilde farklı absorbans değerlerinde protein konsantrasyonları belirlendi ve şekil 3.4'te görüldüğü gibi standart protein eğrisi grafiği çizildi.



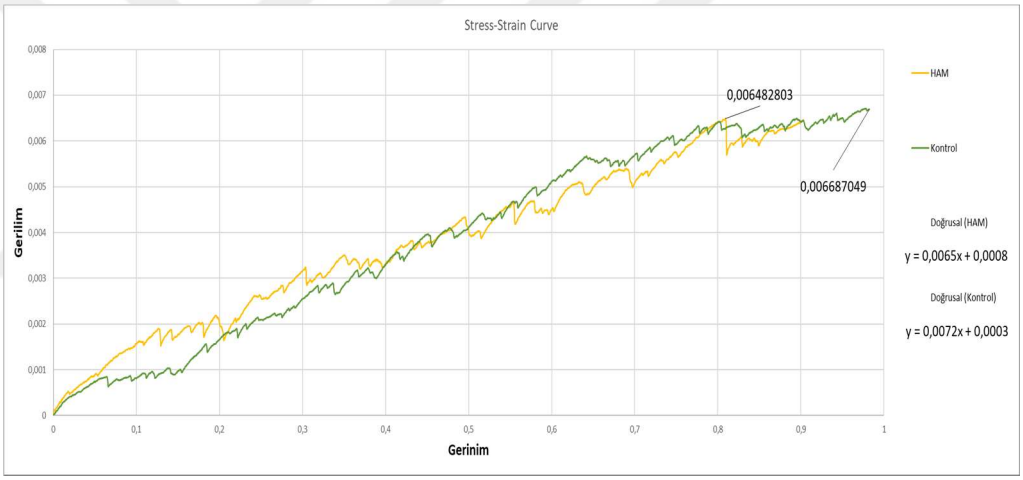
Şekil 3.4 Protein standart eğrisi

Protein eğrisi oluşturulduktan sonra standart eğrisinin denklemi çıkarıldı. Solüsyon 2 ile hücresizleştirilen petri kapları için bulunan absorbans değerleri denklemde yerine yazılarak örneklerden toplanan proteinlerin konsantrasyon değerleri belirlendi. 6 kuyulu petri kabının 2 kuyusu yüzeyinden cell scrapper ile kazınarak toplanan örneklerin ortalama protein konsantrasyon değeri 273,5µg/ml olarak hesaplandı.

3.4. Çekme Testi

Şekil 3.5' de görüldüğü gibi hazırlanan biyomürekkepler kullanılarak basılan yapılar, baskı sonrası $CaCl_2$ ile çapraz bağlandıktan sonra çekme testine sokuldu.

Çekme testi ile yapıların mekanik dayanımları belirlendi. Elastisite modülleri (Young's modulus) karşılaştırıldı. HAM kullanılan biyomürekkepte daha düşük elastisite modülü gözlendi. Biyomürekkep içine eklenen HAM' ın baskının mekanik dayanımını azaltabileceği görüldü. Ham grubunun kaldırabileceği en yüksek kuvvet 0,006482803 newton/mm2 ölçülürken kontrol grubunun kaldırabileceği en yüksek kuvvet 0,006687049 newton/mm2 ölçülmüştür. Yapıların elastik modülleri deformasyon noktasına kadar çizilen grafiğin doğrusallaştırılması sonucu elde edilen doğruların denklemi yardımı ile hesaplandı. Denklemlerin eğimleri alınarak elastik molülü değerleri belirlendi. HAM içeren grubun elastik modülü 6,5 kPa ölçülürken, HAM içermeyen kontrol grrubunun elastik modülü 7,2 kPA olarak ölçüldü.

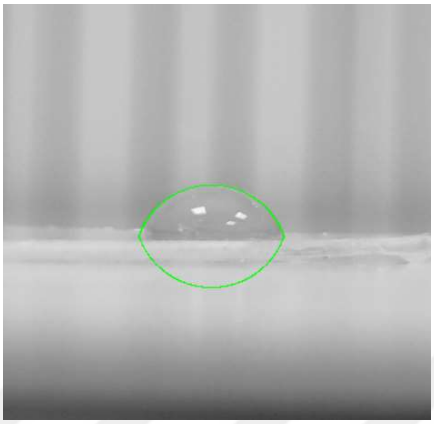


Şekil 3.5 Kontrol-ham gerilim gerinim grafiği

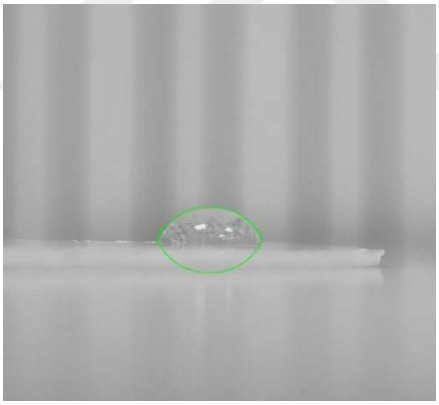
3.5. Temas Açısı Ölçümü

Temas açısı ölçümleri basılabilirliğin ölçütü olarak belirlendi. Bu nedenle baskı adımına geçilmeden önce belirlenen iğne ucu ve basınçta temas açısı ölçümleri alındı. Damlalar baskının da alınacağı polistiren malzeme üzerine damlatıldı. Damlaların damlatıldığı yüzeye dik olarak. Fotoğrafları çekildi. 60° ile 70° arasında temas açısı

biyoyazıcıda basılabilirlik adına ideal değer olarak kabul edilir (Naghieh ve Chen, 2021). Yapılan testlerde HAM yüklü biyomürekkebin temas açısı 70.579° kontrol grubunun temas açısı 68.837° olarak ölçüldü. Damlacıkların temas açıları ImageJ programı yardımı ile ölçüldü.



Şekil 3.6 Ham temas açısı

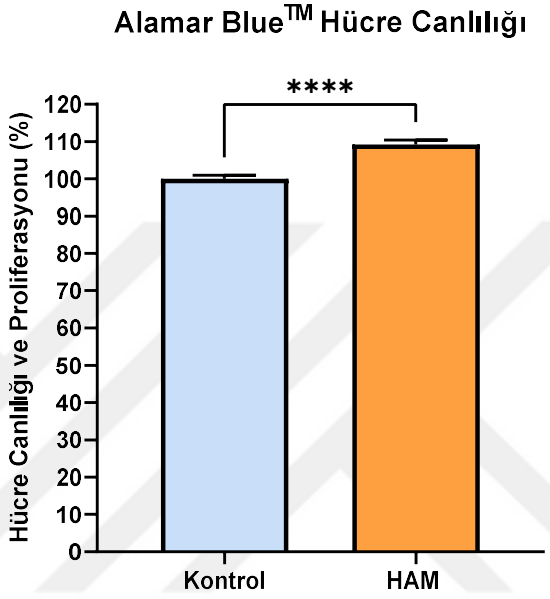


Şekil 3.7 Kontrol temas açısı

3.6. Hücre Çoğalmasının Tespiti

Baskıların 7. Gününde hücre çoğalmasının hala devam ettiğini göstermek amacı için Alamar BlueTM Cell Viability Reagent kiti kullanılmıştır. 3 Boyutlu baskıların

çoğalma testi için baskıdan sonra 7. gündeki hücrelerin medyaları kullanıldı. Bu baskılarım medyaları içine Alamar BlueTM Cell Viability Reagent kitinde belirtilen oranda Alamar blue eklendi. Daha sonra 570 nm dalga boyunda EpochTM Microplate Spectrophotometer kullanılarak ölçüm alındı. Ham içermeyen kontrol grubu Baskı ve Ham içeren biyomürekkep ile hazırlanan Baskı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yakalandı.



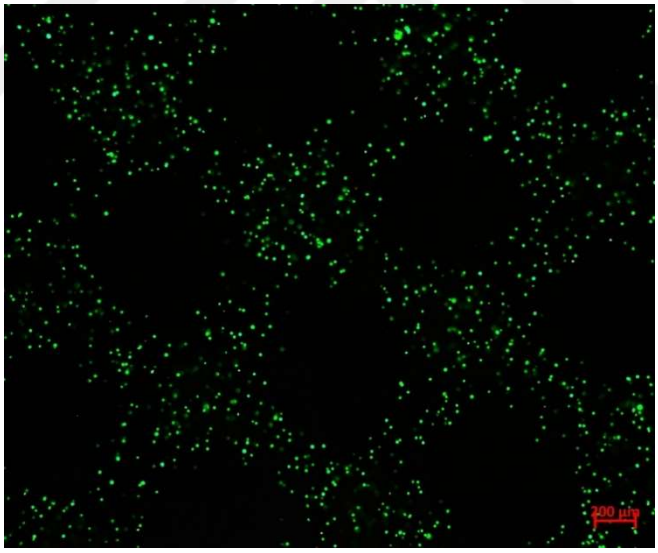
Şekil 3.8 Kontrol ve ham canlılık ve proliferasyon grafiği

3.7. 3B Baskıdaki hücrelerin Canlılığının Floresan Boya ile Belirlenmesi

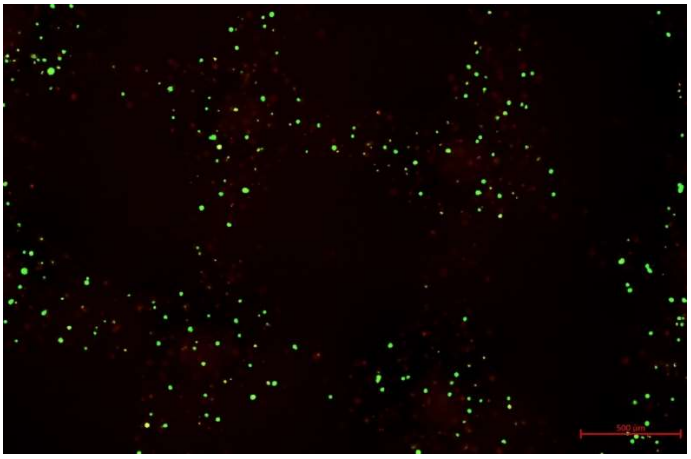
Baskılanan hücrelere 1. Günde ve 7. Günde floresan boyama yapılmıştır. 3B biyobaskı ile basılan hücreli iskeleler ticari olarak tedarik edilen Thermo Fisher Scientific LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity kit ile boyanıştır. Hücre içi esteraz aktivitesini belirlemek için yeşil floresan Calcein-AM kullanılır. Calcein-AM sayesinde canlı hücreler yeşil renk ile boyanmış olur. Plazma membranının bütünlüğünün kaybolduğunu göstermek için kırmızı floresan Etidyum homodimer-1

(EthD-1) kullanılır. İki boya DPBS içinde kit protokolüne uygun olarak karıştırıldıktan sonra iki boya eşzamanlı olarak baskılanan yapı yüzeyini kaplayacak miktarda, baskılanan yapılar üzerine karanlık ortamda verildi. karışım; 2,5 ml DPBS, 5 µl Ethidium homodimer-1 (EthD-1), 1,25 µl Calcein-AM 15 ml falkon tüp içine alınarak vorteks cihazı ile karıştırılmıştır. Işıktan etkilenmemesi adına çevresi alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

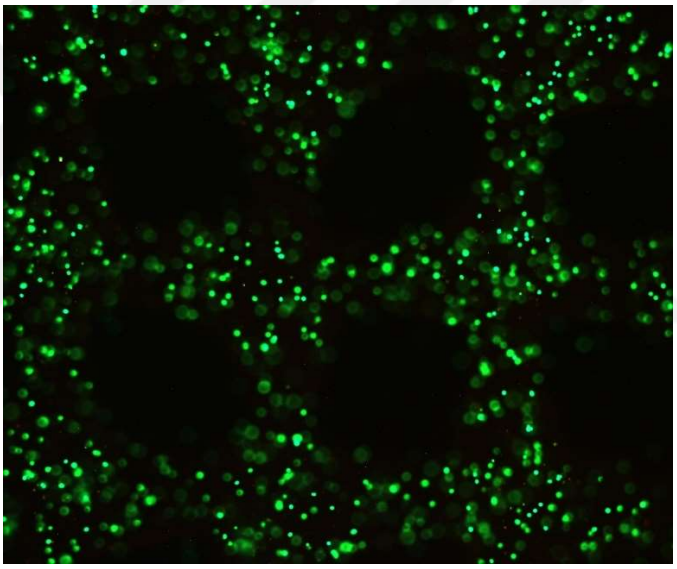
Boyama sonucunda hem kontrol grubunun hem de HAM eklenmiş biyomürekkep ile baskılanan yapılardaki hücrelerin büyük çoğunluğunun 1. Günde ve 7. Günde yaşayarak canlılıklarını koruyabildikleri şekil 3.10 ve şekil 3.12' de olduğu gibi gösterildi. Ham grubu görüntüleri primovert floresan mikrosopta, kontrol grubu görüntüleri ise cell discoverer 7 cihazında çekildi. Ölü hücrelerin daha net görülebilmesi adına geniş objektif kullanıldı.



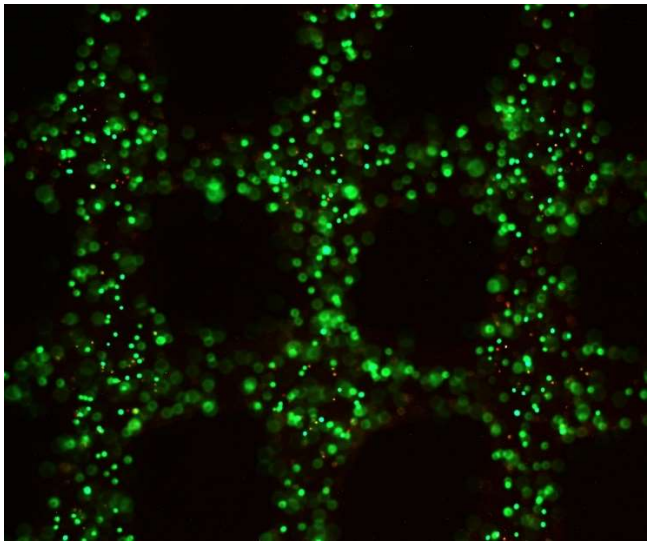
Şekil 3.9 Kontrol grubu 1. gün canlı ve ölü floresan boyama



Şekil 3.10 Kontrol grubu 7. gün canlı ve ölü floresan boyama



Şekil 3.11 Ham grubu 1. gün canlı ve ölü floresan boyama 4x



Şekil 3.12 Ham grubu 7. gün canlı ve ölü floresan boyama 4x

4. TARTIŞMA

Tez çalışmasında hücre kültüründen elde edilen dHAM'nin 3B Biyoyazıcı teknolojisi ile yenileyici tıp alanında kullanılabileceğini göstermek dHAM katkılı bir biyomürekkep hazırlanmıştır. Daha önce anlatıldığı gibi doku mühendisliği, yapı iskelelerinde yeniden tohumlanan hücrelerin işlevlerini eski haline getirmek için doğal HAM'yi taklit edecek şekilde tasarlanmış destekleyici yapı iskelelerine ekilen hücrelerle arızalı dokuları onarmaya, yeniden yapılandırmaya veya değiştirmeye çalışır(Xing ve ark., 2015). Literatür incelendiğinde hücre kaynaklı HAM'nin iskele olarak uygulanmasının üstünlüğü olduğunu gösteren çalışmalara rastlanmıştır(Lu ve ark., 2011).

Dokuların hücresizleştirilerek kullanılması sayesinde hücrelerin ihtiyaç duyduğu proteinler ve mikroçevresel yapı korunur. Hücresel bileşenler doku veya organlardan verimli bir şekilde uzaklaştırılırken doğal HAM bileşimi ve bütünlüğü korunur. Doku mühendisliği çalışmalarında en önemli etki doğal hücre mikroçevresini taklit ederek sağlanıyorken en iyi biyobenzer malzemenin de hücrelerin kendi ürettikleri HAM olduğu düşünülebilir.

Hücre dışı matris (HAM), bazı çekirdek proteinlere kovalent olarak bağlanan glikozaminoglikanlar (GAG'ler) gibi proteoglikanlar ile iç içe geçmiş kolajen, fibronektin, vitronektin, laminin, tenasin, trombospondin, fibrillin ve kollajen tip II gibi proteinler ve büyüme faktörleri gibi özelleşmiş proteinlerden oluşan karmaşık bir ağdır (Manabe ve ark., 2008). Hücre dışı matrisler doğal doku ve organların yanısıra hücre kültüründen de elde edilebilmektedir. İki farklı HAM kaynağının da avantajlı olduğu durumlar vardır. Fakat hücre kültüründen elde edilen HAM düşünüldüğünde doku kaynaklı HAM ye göre öne çıkan 3 adet avantajı vardır. İlk olarak kültürlenmiş hücreler çeşitli patojenler bakımından incelenebilir ve steril koşullarda HAM elde edilip sonraki kullanım için muhafaza edilebilir. İkinci olarak hücre penatrasyon

sınırlaması olmadan istenilen geometriye ve gözenekliliğe sahip olarak tekrar oluşturulabilir. İstnilen mekanik özellikleri sağlamak amacı ile farklı hücre kaynaklarının HAM'leri ile karıştırılabilir. En önemlisi ve sonuncusu hücre kültüründen elde edilen ECM herhangi bir donöre ihtiyaç duymaz ve otolog olarak hazırlanabilir. İstenilen ölçekte laboratuvarda çoğaltılabilir(Lu ve ark., 2011). Bu özelliği ile düşük patojen riski ve istenmeyen konak yanıtının önüne geçilmiş olur(Scobie ve ark., 2013).

Tez çalışmasında ticari olarak satın alınan L929 fare fibroblast hücreleri kullanıldı. Hızlı çoğalabilmeleri ve yüksek HAM üretebilme kapasiteleri nedeni ile iyi bir hücre kaynağı olabileceği düşünüldü. Hücre pasajlanması yapıldıktan sonra donmuş durumda olan hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğalabildikleri gözlemlendi.

Hücreler 1 adet Tc 75 kültür kabından çoğaltılan pasajlandıktan sonra toplamda 8 adet Tc 175 kültür kabı elde edildi ve hücresizleştirme adımına geçildi. Farklı protokollerden alınan NH_4OH bazlı iki solüsyon hazırlandı. Solüsyon 1(Au - Hellewell ve ark., 2017) ve solüsyon 2(Franco-Barraza ve ark., 2016) protokollere uygun olarak hazırlanarak hücrelere verildi. Solüsyon 1 kullanılarak istenilen sonuca ulaşılamadı. Solüsyon 2 ile hücresizleştirme başarı ile gerçekleştirildi. Hücresizleştirmenin gerçekleştirildiği dapi boyamaları ile teyit edildi.

Hücresizleştirme sonucu yüzeyde biriken HAM de protein varlığının kontrolü ve konsantrasyonu için BCA testi ile yapıldı. yaklaşık 2,3 milyon hücreden 273,5 µg/ml protein izole edilebildiği gösterildi. Hücre kültürünün hücresizleştirilerek HAM'nin hala yüzeyde var olduğu bu deney sonucunda gösterildi. Hücre kültüründen elde edilebilen HAM'nin doku kaynaklı HAM'ye göre oldukça az olması farklı kültürleme tekniklerinin kullanılması gerektiğini göstermektedir. Bu bağlamda HAM eldesi için 3 boyutlu hücre kültürü metotları ve biyoreaktörlerin kullanılması düşünülmelidir.

Baskı aşaması öncesinde HAM'nin iyi yıkanması büyük önem arz etmektedir. HAM eldesinde kullanılan Triton X-100 ve NH_4OH canlı hücrelere ciddi ölümcül zararlar vermektedir. Ayrıca biyomürekkebi incelterek mekanik dayanımını da azaltmaktadır. İyi yıkanmamış HAM ile hazırlanan biyomürekkebin hücrelere zarar verdiği önceden yapılan denemelerde görüldü. Bu nedenle baskılamanın tekrarlanması gerekti. Tekrarlanan deneylerde hücre canlılığını korumak ve biyomürekkebin mekanik özelliklerini bozmamak adına HAM yıkamaları DPBS ile yapıldı. her yıkama sonrası +4°C de soğuk santrifüj yapılarak 1300 G kuvvetinde döndürüldü. 3B biyobaskı sırasında kontrol grubunun, HAM içeren biyomürekkep grubuna göre daha yüksek kesinlikle baskılanabildiği gözlemlendi. Bu gözlemlerden hareketle HAM katkısının biyomürekkebin mekanik özelliklerini bir miktar değiştirdiği söylenebilir.

HAM'ın biyomürekkep içerisine ekleme aşamasında karşılanan diğer bir zorluk izole edilen HAM içeriğinin toplanması idi. Toplama ince pipet ucu ile yapıldığı taktirde HAM'ın pipet ucuna yapıştığı ve pipet ucundan ayrılamadığı görüldü. Bu nedenle HAM, mikropipet ucu bistüri ile kesilerek toplandı. Ayrıca HAM bütünlüğü bozulduğu taktirde falkon tüpün farklı kısımlarına yapıştığı ve toplamanın mümkün olmadığı farkedildi. Bu nedenle HAM dikkatli bir şekilde ve tek seferde toplanmalıdır.

NH_4OH solüsyonu kültür kabı üzerine yavaş bir şekilde verilmelidir. Aksi taktirde hücrelerin yüzeye yapışık halde bulundukları yapı bozulacak ve HAM yüzeyden kalkacaktır. HAM'ın kullanım alanına göre yüzeyde kalması veya yüzeyden kalkması tercih edilebilir. Yüzeyden tamamen kaldırmak amacıyla 5 dk inkübasyon sürecinde kültür kabı her dakika başında sarsılarak HAM'ın solüsyon yüzeyine çıkması sağlanabilir.

Baskılanan yapıların kabul edilebilir sınırlar içinde olduğunu ve yeterli mekanik dayanıma sahip olduğunu göstermek adına 3B yapılar çekme testine sokuldu. Test sonucunda hem kontrol grubunun hem de HAM içeriğine sahip baskıların

dayanımlarının benzer olduğu sonucuna varıldı. Analizler sonucunda kontrol grubunun daha büyük elastik modülüne sahip olduğu gösterildi. Baskı sırasında gözlenen hataların düşük elastik modülünden kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü. Test sonucunda elde edilen verilere dayanarak baskılanan yapıların ileride yumuşak doku çalışmalarında ve yumuşak doku kanser çalışmalarında kullanılabileceği düşünüldü.

Baskılanan yapılardaki hücrelerin yaşamlarını devam ettirebilmesi adına hücrelerin basıldığı 60 mm petri kaplarına MEM hücre medyası eklendi. 1. Gün ve 7. Günde LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity kit ile boyama yapılmıştır. 7. Günde 1. Güne göre ölü hücre sayısında artış gözlenmiştir. Fakat 7. Günde hem kontrol hem de HAM içeren grupta canlı hücreler, ölü hücrelere göre çok daha fazla miktarda idi. İki grup arasında floresan boyama sonucunda ciddi bir fark gözlemlenemedi.

7. günde jel içindeki hücrelerin hala çoğalabildiğini gözlemlemek adına hücre medyalarına alamar blue verildi. Çoğalma ve canlılık belirteci olan alamar blue ile 4 saat süren inkübasyonun ardından hücrelerin 7. Günde dahi çoğalabildikleri spektrofotometrik okumalarla gösterildi. Ham katkılı biyomürekkep ile basılan baskıların canlılıklarının yaklaşık olarak %10 daha fazla olduğu ortaya konuldu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında hücre kültüründen elde edilen hücreler arası matris kullanılarak geliştirilen biyomürekkebin hücrelere etkisi incelendi. Çalışmalarda hücre kültür kabından HAM' ın başarı ile izole edilebildiği ve toplanarak biyomürekkep yapımında kullanılabildiği gösterildi. NH_4OH hücresizleştirme çalışmalarında önemli bir molekül olsa da tek başına hücresizleştirme için etkili olmadığı düşünüldü. Hücresizleştirme solüsyonunda kullanılan Triton X-100' ün hücresizleştirme açısından önemli olduğu gösterildi. Hücre kültüründen toplanan dHAM eklenerek üretilen aljinat ve jelatin karışımı ile mekanik dayanımı yüksek biyomürekkeplerin üretilebileceği gösterilmiştir. Her ne kadar dHAM eklenerek hazırlanan biyomürekkep içindeki hücrelerin canlılık oranlarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu ortaya konulmuş olsa da 3 boyutlu Biyoyazıcı teknolojisinde hücre canlılığını etkileyen çok sayıda parametre olduğu unutulmamalıdır. Deneyler sonucunda, Toplanan hücreler arası matrisin canlı hücreler üzerinde ciddi bir etki yaratamadığı düşünüldü. Kesin sonuçlara ulaşmak adına bu tez çalışmasında toplanarak jel içerisine aktarılan ve oransal olarak jel içerisinde %0,5 dHAM olarak bulunan miktarın çok daha fazlasına ihtiyaç duyulmaktadır. dHAM' ın bu tez çalışmasında yüksek basılabilirlik ve mekanik dayanım özellikleri gösteren aljinat jelatin karışımı olan biyomürekkep içerisine farklı konsantrasyonlarda eklenip, en az 3 tekrarlı deneylerle hücreler üzerindeki etkisine bakılmalıdır.

Bu bulgulardan hareketle hücreler arası matrisin biyomürekkebe zarar vermeden biyomürekkep içerisine aktarılabildiği gösterildi. Hazırlanan biyomürekkep kullanılarak yüksek çözünülürlükte baskılar alınabileceği Temas açısı ölçümleri ile gösterildi. Fakat HAM' ın düşük protein konsantrasyonuna sahip olduğu ve hücreler tarafından az miktarda üretildiği anlaşıldı. Bu sorunun giderilmesi adına gelecek çalışmalarda Hücrelerin daha fazla HAM üretebilmesi için suplementler çalışılmalı ve kültürleme süresi optimize edilmelidir. Hücrelerin genetik modifikasyonlara

uğratılarak da fazla HAM üretebilme kapasiteleri de çalışılmalıdır. Baskılar üzerinde daha fazla fark yaratabilmesi için çok daha fazla miktarda HAM toplanmalıdır. Bu noktada HAM üretiminin biyoreaktörler içinde veya farklı 3 boyutlu hücre kültürü yöntemleri ile üretilmesi gerekmektedir. Böyle bir üretimi geleneksel hücre kültürü kaplarında yapmak hem yüksek maliyet hem de yoğun iş yükü gerektirmektedir. Hücre kültürü tabanlı HAM'ın 3B biyoyazıcı teknolojisinde kullanılmadan önce odaklanılması gereken temel bir problem vardır. O da yüksek miktarda HAM'ın nasıl üretilebileceğidir. Yeni biyobenzer malzemeler geliştirmek yerine hali hazırda var olan canlı kaynaklı malzemelerin modifikasyonlarının canlılarla daha uyumlu bir özellik sergileyebildiği unutulmamalıdır.

ÖZET

Hücre Kültürü Kaynaklı Hücreler Arası Matris Tabanlı Biyomürekkep ile 3 Boyutlu Biyobaskı

3 boyutlu (3B) biyoyazıcı teknolojisi gelecekte doku mühendisliği çalışmaları adına umut vadeden bir teknoloji olarak görülmektedir. Günümüzde ise farklı hücre tipi ve hücre yoğunluğuna sahip doku ve organlar üretmek mümkün değildir. Karmaşık dokuların 3B biyoyazıcı ile oluşturulamamasının temel zorluklarından birisi farklı hücre tiplerinin farklı hücre dışı ortamlara ihtiyaç duymalarıdır. Bu hücre dışı ortama hücreler arası matris (HAM) adı verilmektedir. HAM vücuttaki hücreleri ve dokuları çevreleyen, destekleyen ve onlara şekil veren geniş bir protein ve sinyal molekülleri ağıdır. Hücre dışı matris, hücrelerin çevrelerindeki diğer hücrelere bağlanmasına ve iletişim kurmasına yardımcı olur. hücre büyümesinde, hücre hareketinde ve diğer hücre işlevlerinde önemli bir rol oynar. 3B biyobaskı yönteminde hücre dışı ortam biyomürekkep adı verilen doğal veya sentetik polimerler yardımı ile taklit edilmeye çalışılır. İyi tasarlanmış bir biyomürekkep 3B basılan yapı içindeki hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemelidir. Bu nedenle, son zamanlarda doğal dokuların hücresizleştirilerek biyomürekkep tasarımında kullanılma fikri önem kazanmıştır. Hücrelerin uzaklaştırılması sonucu elde edilen HAM'ye hücresizleştirilmiş hücre dışı matris (dHAM) adı verilmektedir. Hazırlanmasında dHAM kullanılan biyomürekkeplere dHAM tabanlı biyomürekkep adı verilmektedir. Bu tür biyomürekkeplerin dokuya özgü kompleks bileşimleri hücreler için biyokimyasal olarak en iyi ortamı sağlarlar. Bu çalışmada ise hücreler arası matris doğal dokular yerine 2 boyutlu (2B) hücre kültüründen elde edilerek bir biyomürekkep hazırlanmıştır. Hazırlanan bu dHAM tabanlı biyomürekkebin 3B olarak basılan yapıdaki hücrelere etkisi gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: 3B biyobaskı, Biyomürekkep, hücre kültürü kaynaklı hücreler arası matris, hücresizleştirme, doku mühendisliği

SUMMARY

3D Bioprinting with Cell Derived Extracellular Matrix Based Bioink

3D bioprinting technology is seen as a promising technology for tissue engineering researches in the future. Today, it is not possible to produce tissues and organs with different cell types and cell densities. One of the main challenges of inability of creating complex tissues with a 3D bioprinter is that different cell types require different extracellular environments. This extracellular environment is called the extrecellular matrix (ECM). ECM is a vast network of proteins and signaling molecules that surround, support, and gives shape to the cells and tissues in the body. The extracellular matrix helps cells connect and communicate with other cells in their environment. It plays an important role in cell growth, cell movement, and other cell functions. In the 3D bioprinting method, the main goal is mimicking the extracellular environment with the help of natural or synthetic polymers called bioinks. A well-designed bioink should support the growth, proliferation and differentiation of cells within the 3D printed structure. Therefore, the idea of using natural tissues in bioink design by decellularization has gained importance recently. The ECM can be obtained with removal of cells. Procedure is called decellularization. Decelularized ECM is called extracellular matrix (dECM). Bioinks that use dECM in their preparation are called dECM-based bioinks. The tissue-specific complex compositions of such bioinks provide the best biochemical environment for cells. In this research, a bioink was prepared by obtaining the intercellular matrix from 2-dimensional (2D) cell culture instead of natural tissues. The effect of this prepared dECM-based bioink on the cells in the 3D printed structure was observed.

Keywords: 3D bioprinting, bioink, cell derived ECM, decellularization, tissue engineering

KAYNAKLAR

AHN S-K, KASI RAJESWARI M, KIM S-C, SHARMA N ve ZHOU Y (2008). Stimuli-responsive polymer gels. *Soft Matter*. **4:** 1151-1157

AKHTAR M F, HANIF M ve RANJHA N M (2016). Methods of synthesis of hydrogels… A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **24:** 554-559

ALLEN R A, SELTZ L M, JIANG H, KASICK R T, SELLARO T L, BADYLAK S F ve OGILVIE J B (2010). Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro. *Tissue Engineering Part A*. **16:** 3363-3374

ARAI K, TSUKAMOTO Y, YOSHIDA H, SANAE H, MIR TANVEER A, SAKAI S, YOSHIDA T, OKABE M, NIKAIDO T ve TAYA M (2016). The development of cell-adhesive hydrogel for 3D printing. *International Journal of Bioprinting*. **2:**

AU - HELLEWELL A L, AU - ROSINI S ve AU - ADAMS J C. (2017). A Rapid, Scalable Method for the Isolation, Functional Study, and Analysis of Cell-derived Extracellular Matrix. *JoVE*. e55051

BADYLAK S F, FREYTES D O ve GILBERT T W (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta biomaterialia*. **5:** 1-13

BEJLERI D, STREETER B W, NACHLAS ALINE LY, BROWN MILTON E, GAETANI ROBERTO, CHRISTMAN K L ve DAVIS M E (2018). A bioprinted cardiac patch composed of cardiac-specific extracellular matrix and progenitor cells for heart repair. *Advanced healthcare materials*. **7:** 1800672

BIANCO P ve ROBEY P G (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature*. **414:** 118-121

BOLLAND F, KOROSSIS S, WILSHAW S-P, INGHAM E, FISHER J, KEARNEY J N ve SOUTHGATE J (2007). Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering. *Biomaterials*. **28:** 1061-1070

BREGG R K (2005), *Current topics in polymer research*: Nova Publishers.

BRENNAN E P, TANG X-H, STEWART-AKERS ANN M, GUDAS L J ve BADYLAK S F (2008). Chemoattractant activity of degradation products of fetal and adult skin extracellular matrix for keratinocyte progenitor cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. **2:** 491-498

BRYANT S J ve ANSETH K S (2002). Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly (ethylene glycol) hydrogels. *Journal of*

Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials. **59:** 63-72

MARI C E, S BURGO L, L PEDRAZ J ve ORIVE G (2017). Gelatin as biomaterial for tissue engineering. *Current pharmaceutical design*. **23:** 3567-3584

CASALI D M, HANDLETON R M, SHAZLY T ve MATTHEWS M A (2018). A novel supercritical CO2-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties. *The Journal of Supercritical Fluids*. **131:** 72-81

CHENG H-W, TSUI Y-K, CHEUNG K MC, CHAN D ve CHAN B P (2009). Decellularization of chondrocyte-encapsulated collagen microspheres: a three-dimensional model to study the effects of acellular matrix on stem cell fate. *Tissue Engineering Part C: Methods*. **15:** 697-706

CHENG Z, LANDISH B, CHI Z, NANNAN C, JINGYU D, SEN L ve XIANGJIN L (2018). 3D printing hydrogel with graphene oxide is functional in cartilage protection by influencing the signal pathway of Rank/Rankl/OPG. *Materials Science and Engineering: C*. **82:** 244-252

CHIMENE D, LENNOX K K, KAUNAS R R ve GAHARWAR A K (2016). Advanced bioinks for 3D printing: a materials science perspective. *Annals of biomedical engineering*. **44:** 2090-2102

CHOUDHURY D, TUN H W, WANG T ve NAING M W (2018). Organ-derived decellularized extracellular matrix: a game changer for bioink manufacturing? *Trends in biotechnology*. **36:** 787-805

CHUDZIK K (2016). Generation of induced pluripotent stem cells from fibroblast cell lines and gene editing in pluripotent stem cell. *Undergraduate thesis. Krems an der Donau: IMC University of Applied Sciences*.

CIDONIO G, COOKE M, GLINKA M, DAWSON JI, GROVER L ve OREFFO R (2019). Printing bone in a gel: using nanocomposite bioink to print functionalised bone scaffolds. *Materials Today Bio*. **4:** 100028

CRAPO P M, GILBERT T W ve BADYLAK S F (2011a). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. **32:** 3233-3243

CRAPO P M, GILBERT T W ve BADYLAK S F (2011b). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. **32:** 3233-3243

CUI H, N M, FISHER J P ve ZHANG L G (2017a). 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Adv Healthc Mater*. **6:**

CUI X, HARTANTO Y ve ZHANG H (2017b). Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society Interface*. **14:** 20160877

CUI X, SOLIMAN B G, ALCALA-OROZCO C R, LI J, VIS M A, SANTOS M, WISE S G, LEVATO R, MALDA J ve WOODFIELD T BF (2020). Rapid photocrosslinking of silk hydrogels with high cell density and enhanced shape fidelity. *Advanced healthcare materials*. **9:** 1901667

DAS S, PATI F, CHAMEETTACHAL S, PAHWA S, RAY A R, DHARA S ve GHOSH S (2013). Enhanced redifferentiation of chondrocytes on microperiodic silk/gelatin scaffolds: toward tailor-made tissue engineering. *Biomacromolecules*. **14:** 311-321

DAS S, PATI F, CHOI Y-J, RIJAL G, SHIM J-H, KIM S W, RAY A R, CHO D-W ve GHOSH S (2015). Bioprintable, cell-laden silk fibroin–gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. *Acta biomaterialia*. **11:** 233-246

DATTA N, P PHAM Q, SHARMA U, SIKAVITSAS V I, JANSEN J A ve MIKOS A G (2006). In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103:** 2488-2493

DATTA P, BARUI A, WU Y, OZBOLAT V, MONCAL K K, ve OZBOLAT I T (2018). Essential steps in bioprinting: From pre- to post-bioprinting. *Biotechnology Advances*. **36:** 1481-1504

DRAKE MP, DAVISON PF, BUMP S ve SCHMITT FO (1966). Action of proteolytic enzymes on tropocollagen and insoluble collagen. *Biochemistry*. **5:** 301-312

DU P, SUHAERI M, HA S S, OH S JA, KIM S-H ve PARK K (2017). Human lung fibroblast-derived matrix facilitates vascular morphogenesis in 3D environment and enhances skin wound healing. *Acta biomaterialia*. **54:** 333-344

DUBBIN K, HORI Y, LEWIS K K ve HEILSHORN S C (2016). Dual-stage crosslinking of a gel-phase bioink improves cell viability and homogeneity for 3D bioprinting. *Advanced healthcare materials*. **5:** 2488-2492

DUIN S, SCHÜTZ K, AHLFELD T, LEHMANN S, LODE A, LUDWIG B ve GELINSKY M (2019). 3D Bioprinting of functional islets of langerhans in an alginate/methylcellulose hydrogel blend. *Advanced healthcare materials*. **8:** 1801631

DZOBO K, TURNLEY T, WISHART A, ROWE A, KALLMEYER K, VAN VF A, THOMFORD N E, DANDARA C, CHOPERA D ve PEPPER M S (2016). Fibroblast-derived extracellular matrix induces chondrogenic differentiation in human adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells in vitro. *International journal of molecular sciences*. **17:** 1259

ENGLER A J, SEN S, SWEENEY H L ve DISCHER D E (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. **126:** 677-689

ERGİN E, EKİCİ Y ve ATAÇ F B (2018). Tissue Engineering and its Appllication Areas. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. **38:** 70-78

FITZPATRICK L E ve MCDEVITT T C (2015). Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Biomaterials science*. **3:** 12-24

FRANCO-BARRAZA J, BEACHAM D A, AMATANGELO M D ve CUKIERMAN E (2016). Preparation of Extracellular Matrices Produced by Cultured and Primary Fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol*. **71:** 10 19 11-10 19 34

FREYTES D O, MARTIN J, VELANKAR S S, LEE A S ve BADYLAK S F (2008). Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials*. **29:** 1630-1637

FREITAS BEATRIZ CG, TRUJILLO C A, CARROMEU C, YUSUPOVA M, HERAI R H ve MUOTRI A R (2014). Stem cells and modeling of autism spectrum disorders. *Experimental Neurology*. **260:** 33-43

GAETANI R, FEYEN DRIES AM, VERHAGE V, SLAATS R, MESSINA E, CHRISTMAN K L, GIACOMELLO A, DOEVENDANS PIETER AFM ve SLUIJTER JOOST PG (2015). Epicardial application of cardiac progenitor cells in a 3D-printed gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function after myocardial infarction. *Biomaterials*. **61:** 339-348

GAO GE, KIM B S, JANG J ve CHO D-W (2019). Recent strategies in extrusion-based three-dimensional cell printing toward organ biofabrication. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. **5:** 1150-1169

GATTAZZO F, URCIUOLO A ve BONALDO P (2014). Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. **1840:** 2506-2519

GILBERT T W, SELLARO T L ve BADYLAK S F (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. **27:** 3675-3683

GLOTZBACH J P, WONG V W, GURTNER G C ve LONGAKER M T (2011). Regenerative medicine. *Curr Probl Surg*. **48:** 148-212

GROLL J, BURDICK J A, CHO D-W, DERBY B, GELINSKY M, HEILSHORN S C, JUENGST T, MALDA J, MIRONOV V A ve NAKAYAMA K (2018). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*. **11:** 013001

GU QI, TOMASKOVIC-CROOK E, LOZANO R, CHEN Y, KAPSA R M, ZHOU QI, WALLACE G G ve CROOK J M (2016). Functional 3D neural mini-tissues from printed gel-based bioink and human neural stem cells. *Advanced healthcare materials*. **5:** 1429-1438

GUO Y, LIU L, HAO Q, LI R, ZHANG X, WANG L ve NING B (2011). Effects of extracellular matrix produced in vitro on growth and differentiation of MC3T3-E1 cells. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*. **27:** 1606-1612

GUO Y, ZENG Q-C, ZHANG C-Q, ZHANG XI-Z, LI RUI-XIN, WU JI-MIN, GUAN JING, LIU LU, ZHANG XIN-CHANG ve LI J-YU (2013). Extracellular matrix of mechanically stretched cardiac fibroblasts improves viability and metabolic activity of ventricular cells. *International journal of medical sciences*. **10:** 1837

HOCKADAY LA, KANG KH, COLANGELO NW, CHEUNG PYC, DUAN BIN, MALONE E, WU JUN, GIRARDI LN, BONASSAR LJ ve LIPSON H (2012). Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication*. **4:** 035005

HONG S, SYCKS D, CHAN H F, LIN S, LOPEZ G P, GUILAK F, LEONG K W ve ZHAO X (2015). 3D printing of highly stretchable and tough hydrogels into complex, cellularized structures. *Advanced materials*. **27:** 4035-4040

HOSHIBA T (2021). Cultured cell-derived decellularized extracellular matrix (cultured cell-derived dECM): Future applications and problems—A mini review. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. **17:** 100256

HOSHIBA T, LU H, KAWAZOE N ve CHEN G (2010). Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert opinion on biological therapy*. **10:** 1717-1728

HOSHIBA T ve TANAKA M (2016). Decellularized matrices as in vitro models of extracellular matrix in tumor tissues at different malignant levels: Mechanism of 5-fluorouracil resistance in colorectal tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. **1863:** 2749-2757

HSIEH C-T ve HSU S-H (2019). Double-network polyurethane-gelatin hydrogel with tunable modulus for high-resolution 3D bioprinting. *ACS applied materials & interfaces*. **11:** 32746-32757

HULMES DJS (2008), "Collagen diversity, synthesis and assembly," in Collagen: Springer, pp. 15-47.

HYNES R O (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. **326:** 1216-1219

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

JAIN P, KATHURIA H ve DUBEY N (2022). Advances in 3D bioprinting of tissues/organs for regenerative medicine and in-vitro models. *Biomaterials*. **287:** 121639

JANG J, PARK H-J, KIM S-W, KIM H, PARK J Y, NA S J, KIM H JI, PARK M N, CHOI S H ve PARK S H (2017). 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden

decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. *Biomaterials*. **112:** 264-274

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

JOHNSON T D, LIN S Y ve CHRISTMAN K L (2011). Tailoring material properties of a nanofibrous extracellular matrix derived hydrogel. *Nanotechnology*. **22:** 494015

JORGENSEN A M, VARKEY M, GORKUN A, CLOUSE C, XU L, CHOU Z, MURPHY S V, MOLNAR J, LEE S J ve YOO J J (2020). Bioprinted skin recapitulates normal collagen remodeling in full-thickness wounds. *Tissue Engineering Part A*. **26:** 512-526

JUNG CHI S, KIM B K, LEE J, MIN B-H ve PARK S-H (2018). Development of printable natural cartilage matrix bioink for 3D printing of irregular tissue shape. *Tissue engineering and regenerative medicine*. **15:** 155-162

KABIRIAN F ve MOZAFARI M (2020). Decellularized ECM-derived bioinks: Prospects for the future. *Methods*. **171:** 108-118

KEANE T J, SWINEHART I T ve BADYLAK S F (2015). Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*. **84:** 25-34

KIM B S, KWON YW, KONG J-S, PARK G TA, GAO GE, HAN WONIL, KIM M-B, LEE H, KIM J H ve CHO D-W (2018). 3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: A step towards advanced skin tissue engineering. *Biomaterials*. **168:** 38-53

KIM H, PARK M-N, KIM J, JANG J, KIM H-K ve CHO D-W (2019a). Characterization of cornea-specific bioink: high transparency, improved in vivo safety. *Journal of tissue engineering*. **10:** 2041731418823382

KIM M H, LEE Y W, JUNG W-K, OH J ve NAM S Y (2019b). Enhanced rheological behaviors of alginate hydrogels with carrageenan for extrusion-based bioprinting. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. **98:** 187-194

KIM Y B, LEE H ve KIM G H (2016). Strategy to achieve highly porous/biocompatible macroscale cell blocks, using a collagen/genipin-bioink and an optimal 3D printing process. *ACS applied materials & interfaces*. **8:** 32230-32240

KÖPF M, CAMPOS DF D, BLAESER A, SEN K S ve FISCHER H (2016). A tailored three-dimensionally printable agarose–collagen blend allows encapsulation, spreading, and attachment of human umbilical artery smooth muscle cells. *Biofabrication*. **8:** 025011

KÖRBLING M ve ESTROV Z (2003). Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? *New England Journal of Medicine*. **349:** 570-582

KYLE S, JESSOP Z M, AL-SABAH A ve WHITAKER I S (2017). 'Printability'of candidate biomaterials for extrusion based 3D printing: state-of-the-art. *Advanced healthcare materials*. **6:** 1700264

LIM K S, SCHON B S, MEKHILERI N V, BROWN G CJ, CHIA C M, PRABAKAR S, HOOPER G J ve WOODFIELD TB (2016). New visible-light photoinitiating system for improved print fidelity in gelatin-based bioinks. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. **2:** 1752-1762

LIN H, YANG G, TAN J ve TUAN R S (2012). Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials*. **33:** 4480-4489

LIN T, LIU S, CHEN S, QIU S, RAO Z, LIU J, ZHU S, YAN L, MAO H ve ZHU Q (2018). Hydrogel derived from porcine decellularized nerve tissue as a promising biomaterial for repairing peripheral nerve defects. *Acta biomaterialia*. **73:** 326-338

LIU Z ve VUNJAK-NOVAKOVIC G (2016). Modeling tumor microenvironments using custom-designed biomaterial scaffolds. *Current opinion in chemical engineering*. **11:** 94-105

LOO Y, LAKSHMANAN A, NI M, TOH L L, WANG S ve HAUSER C AE (2015). Peptide bioink: self-assembling nanofibrous scaffolds for three-dimensional organotypic cultures. *Nano letters*. **15:** 6919-6925

LU H, HOSHIBA T, KAWAZOE N, KODA I, SONG M ve CHEN G (2011). Cultured cell-derived extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. **32:** 9658-9666

LUKASHEV M E ve WERB Z (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in cell biology*. **8:** 437-441

MAKUKU R., WERTHEL J. D., ZANJANI L. O., NABIAN M. H. ve TANTUOYIR M. M. (2022). New frontiers of tendon augmentation technology in tissue engineering and regenerative medicine: a concise literature review. *J Int Med Res*. **50:** 3000605221117212

MALDA J, VISSER J, MELCHELS F P, JÜNGST T, HENNINK W E, DHERT W J, GROLL J ve HUTMACHER D W (2013). 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced materials*. **25:** 5011-5028

MANABE R-I, TSUTSUI K, YAMADA T, KIMURA M, NAKANO I, SHIMONO C, SANZEN N, FURUTANI Y, FUKUDA T ve OGURI Y (2008). Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105:** 12849-12854

MANDRYCKY C, WANG Z, KIM K ve KIM D-H (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology advances*. **34:** 422-434

MARKSTEDT K, MANTAS A, TOURNIER I, MARTÍNEZ Á H, HAGG DL ve GATENHOLM P (2015). 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose–alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*. **16:** 1489-1496

MASTERS J R ve STACEY G N (2007). Changing medium and passaging cell lines. *Nature protocols*. **2:** 2276-2284

MICHAEL S, SORG H, PECK C-T, KOCH L, DEIWICK A, CHICHKOV B, VOGT P M ve REIMERS K (2013). Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PloS one*. **8:** e57741

MILLER E J (1972). Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. *Biochemistry*. 11: 4903-4909

MIRONOV V. 2003. Printing technology to produce living tissue. Taylor & Francis.

NARAYANAN K, LECK K-J, GAO S ve WAN A CA (2009). Three-dimensional reconstituted extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. **30:** 4309-4317

NAGHIEH Sve CHEN X (2021). Printability–A key issue in extrusion-based bioprinting. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. **11:** 564-579

OUYANG L, YAO R, ZHAO Y ve SUN W (2016). Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*. **8:** 035020

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

OZBOLAT I T., MONCAL K K. ve GUDAPATI H (2017). Evaluation of bioprinter technologies. *Additive Manufacturing*. **13:** 179-200

PANWAR A ve TAN L P (2016). Current status of bioinks for micro-extrusion-based 3D bioprinting. *Molecules*. **21:** 685

PARK J Y, RYU H, LEE B, HA D-H, AHN M, KIM S, KIM J Y, JEON N L ve CHO D-W (2018). Development of a functional airway-on-a-chip by 3D cell printing. *Biofabrication*. **11:** 015002

PARSONAGE G, FILER A D, HAWORTH O, NASH G B, RAINGER G E, SALMON MICHAEL ve BUCKLEY C D (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends in immunology*. **26:** 150-156

PATI F, JANG J, HA D-H, WON K S, RHIE J-W, SHIM J-H, KIM D-H ve CHO D- (2014). Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nature communications*. **5:** 1-11

PEREIRA RF, SOUSA A, BARRIAS C C, BÁRTOLO PJ ve GRANJA P L (2018). A single-component hydrogel bioink for bioprinting of bioengineered 3D constructs for dermal tissue engineering. *Materials Horizons*. **5:** 1100-1111

PERSAUD A, MAUS A, STRAIT L ve ZHU D (2022). 3D Bioprinting with Live Cells. *Engineered Regeneration*. **3:** 292-309

PETERSEN TH, CALLE EA, ZHAO L, LEE E J, GUI L, RAREDON M B, GAVRILOV K, YI T, ZHUANG Z W ve BREUER C (2010). Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*. **329:** 538-541

RAHMATI Mve MOZAFARI M (2019). Nano-immunoengineering: opportunities and challenges. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. **10:** 51-59

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

SALARIS F, COLOSI C, BRIGHI C, SOLOPERTO A, DE TURRIS V, BENEDETTI M C, GHIRGA S, ROSITO M, DI A S ve ROSA A (2019). 3D bioprinted human cortical neural constructs derived from induced pluripotent stem cells. *Journal of clinical medicine*. **8:** 1595

SALDIN L T, CRAMER M. C, VELANKAR S. S, WHITE L J ve BADYLAK S F (2017). Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater*. **49:** 1-15

SCHAEFFER W I (1984). Usage of vertebrate, invertebrate and plant cell, tissue and organ culture terminology. *In vitro*. **20:** 19-24

SCOBIE L, PADLER-KARAVANI V, LE BAS-BERNARDET S, CROSSAN C, BLAHA J, MATOUSKOVA M, HECTOR R D, COZZI E, VANHOVE B ve CHARREAU B (2013). Long-term IgG response to porcine Neu5Gc antigens without transmission of PERV in burn patients treated with porcine skin xenografts. *The Journal of Immunology*. **191:** 2907-2915

SENTHEBANE D A, JONKER T, ROWE A, THOMFORD N E, MUNRO D, DANDARA C, WONKAM A, GOVENDER D, CALDER B ve SOARES N C (2018). The role of tumor microenvironment in chemoresistance: 3D extracellular matrices as accomplices. *International journal of molecular sciences*. **19:** 2861

SINGH Y P, BANDYOPADHYAY A ve MANDAL B B (2019). 3D bioprinting using cross-linker-free silk–gelatin bioink for cartilage tissue engineering. *ACS applied materials & interfaces*. **11:** 33684-33696

SKARDAL A, MACK D, KAPETANOVIC E, ATALA A, JACKSON J D, YOO JAMES ve S SH (2012). Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem cells translational medicine*. **1:** 792-802

TANG J, CUI X, CARANASOS T G, HENSLEY M T, VANDERGRIFF A C, HARTANTO Y, SHEN D, ZHANG H, ZHANG J ve CHENG KE (2017). Heart repair using nanogel-encapsulated human cardiac stem cells in mice and pigs with myocardial infarction. *ACS nano*. **11:** 9738-9749

TARIN D ve CROFT CB (1969). Ultrastructural features of wound healing in mouse skin. *Journal of anatomy*. **105:** 189-190

TOMASEK J J, GABBIANI G, HINZ B, CHAPONNIER C ve B R A (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*. **3:** 349-363

ULLAH F, OTHMAN M H, JAVED F, A Z ve AKIL HMD (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*. **57:** 414-433

UNGERLEIDER JL, JOHNSON TD, RAO N ve CHRISTMAN KL (2015). Fabrication and characterization of injectable hydrogels derived from decellularized skeletal and cardiac muscle. *Methods*. **84:** 53-59

URIEL S, HUANG J-J, MOYA M L, FRANCIS M E, WANG R, CHANG S-Y, CHENG M-H ve BREY E M (2008). The role of adipose protein derived hydrogels in adipogenesis. *Biomaterials*. **29:** 3712-3719

UYGUN B E, SOTO-GUTIERREZ A, YAGI H, IZAMIS M-L, GUZZARDI M A, SHULMAN C, MILWID J, KOBAYASHI N, TILLES A ve BERTHIAUME F (2010). Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature medicine*. **16:** 814-820

VIJAYAV S, YAN W. C, LU W F, WANG C H ve FUH J Y H (2018). 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. **132:** 296-332

VIJAYAVENKATARAMAN S, LU W ve FUH J (2016). 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. *Biofabrication*. **8:** 032001

VOYTIK-HARBIN S L, BRIGHTMAN A O, WAISNER B Z, ROBINSON J P ve LAMAR C H (1998). Small intestinal submucosa: A tissue-derived extracellular matrix that promotes tissue-specific growth and differentiation of cells in vitro. *Tissue engineering*. **4:** 157-174

WAN S, BORLAND S, RICHARDSON S M, MERRY C LR, SAIANI A ve GOUGH J (2016). Self-assembling peptide hydrogel for intervertebral disc tissue engineering. *Acta biomaterialia*. **46:** 29-40

WHITEHEAD A K, BARNETT H H, CALDORERA-MOORE M E ve NEWMAN J J (2018). Poly (ethylene glycol) hydrogel elasticity influences human mesenchymal stem cell behavior. *Regenerative biomaterials*. **5:** 167-175

WHITLOCK PATRICK W, SMITH THOMAS L, POEHLING GG, SHILT JEFFREY S ve VAN D M (2007). A naturally derived, cytocompatible, and architecturally optimized scaffold for tendon and ligament regeneration. *Biomaterials*. **28:** 4321-4329

WOLF MA T, DALY K A, BRENNAN-PIERCE E P, JOHNSON S, CARRUTHERS C A, D'AMORE A, NAGARKAR S P, VELANKAR S S ve BADYLAK S F (2012). A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*. **33:** 7028-7038

WOODFIELD T BF, MORONI L ve MALDA J (2009). Combinatorial approaches to controlling cell behaviour and tissue formation in 3D via rapid-prototyping and smart scaffold design. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. **12:** 562-579

XING Q, YATES K, TAHTINEN M, SHEARIER E, QIAN Z ve ZHAO F (2015). Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation. *Tissue Eng Part C Methods*. **21:** 77-87

YEO M G ve KIM G H (2017). A cell-printing approach for obtaining hASC-laden scaffolds by using a collagen/polyphenol bioink. *Biofabrication*. **9:** 025004

ZHANG W, DU A, LIU S, LV M ve CHEN S (2021). Research progress in decellularized extracellular matrix-derived hydrogels. *Regen Ther*. **18:** 88-96

ZHANG W, FENG C, YANG G, LI G, DING X, WANG S, DOU Y, ZHANG Z, CHANG J ve WU C (2017). 3D-printed scaffolds with synergistic effect of hollow-pipe structure and bioactive ions for vascularized bone regeneration. *Biomaterials*. **135:** 85-95

ZHANG Y S, DUCHAMP M, OKLU R, ELLISEN L W., LANGER R ve KHADEMHOSSEINI A (2016). Bioprinting the Cancer Microenvironment. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. **2:** 1710-1721

ZHANG Y, HE Y, BHARADWAJ S, HAMMAM N, CARNAGEY K, MYERS R, ATALA A ve VAN D M (2009). Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. *Biomaterials*. **30:** 4021-4028