



Özgün Araştırma / Original Article

Deri Doku Mühendisliği Amaçlı Üç Boyutlu Biyobaskı ve Keratinosit Kültürü

Aylin Şendemir Ürkmez¹, Umut Doğu Seçkin², Cansu Görgün³, Yiğit Uyanıkgil⁴

1 Aylin Şendemir Ürkmez, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü İzmir, Türkiye ORCID: 0000-0003-1818-6651

Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD İzmir, Türkiye

Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler ABD İzmir, Türkiye

2 Umut Doğu Seçkin, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD İzmir, Türkiye ORCID: 0000-0002-0123-0284

3 Cansu Görgün, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler ABD İzmir, Türkiye ORCID: 0000-0002-0460-2952

Department of Experimental Medicine, University of Genova, Genova, İtalya

U.O. Regenerative Medicine, Ospedale Policlinico San Martino, IRCCS per l'Oncologia, Genova, İtalya

4 Yiğit Uyanıkgil, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler ABD İzmir, Türkiye ORCID: 0000-0002-4016-0522

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD İzmir, Türkiye.

Geliş Geliş: 07.09.2017, Revizyon: 26.10.2017, Kabul Tarihi: 06.12.2017

Özet

Amaç: Bu çalışmada üç boyutlu biyoyazıcı için uygun bir biyomürekkep (hidrojel - hücre karışımı) üretilerek keratinosit hücrelerinin biyobaskısı hedeflendi. Elde edilen hidrojel yapıları epidermis doku kültüründe hücre proliferasyonu, canlılık analizi, hidrojel içinde hücre dağılımı ve morfolojisi belirlendi.

Yöntemler: Hücre kültürlerinde derinin üst tabakası olan epidermiste bulunan keratinosit hücreleri kullanılmıştır. Karakterizasyonu daha önce tamamlanmış olan HS2 insan keratinosit hücre hattı, farklı biyopolimerhidrojeller (jelatin, aljinat, kitosan) ve karışımları içinde süspanse edilip biyobaskı için en uygun hidrojel bulundu. 3B keratinosit kültürleri deney başlatılmasından 1, 4 ve 7 gün sonra canlılık analizi için MTT testine ve hücre dağılımı ve morfolojisinin görüntülenmesi için Hematoksilen- Eozin boyamasına tabi tutuldu.

Bulgular: Elde edilen MTT sonuçlarına göre hücre canlılıkları iki boyutlu (2B) kültürde elde edilen keratinosit canlılıklarının %50'sinden yüksek çıkmıştır. MTT sonuçları keratinositlerin üretilen hidrojel yapısı içerisinde tutunarak canlılıklarını sürdürdüklerini göstermektedir. Elde edilen hücre içerikli polimerik hidrojelin histoloji için kesit alınmasına uygun olduğu ve alınan kesitlere uygulanan hematoksilen/eosin boyaması sonucunda da hücrelerin hidrojel içinde homojen olarak dağıldıkları ve canlılıklarını korudukları belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada oluşturulan epidermis benzeri doku kesitleri üç boyutlu biyoyazıcı ile üretilmiş ve keratinositlerin hidrojeller içinde canlılıklarını sürdürüp doku iskelelerine tutundukları belirlenmiştir. Üretilen hidrojel biyomürekkeplerin deri doku mühendisliğinde ve özellikle yanıklarda epidermis tabakasının onarımında hızlı ve kişiye özel tedavi seçenekleri sunma potansiyeli vardır.

Anahtar kelimeler: Biyoyazıcı, Üç boyutlu (3B) biyobaskı, Deri doku mühendisliği, Hidrojel

DOI: 10.5798/dicletip.363931

Yazışma Adresi / Correspondence Yiğit Uyanıkgil, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, 35100 İzmir, Türkiye
e-mail: yigituyanikgil@gmail.com

3D Bioprinting and Cultivation of Keratinocytes for Skin Tissue Engineering

Abstract

Objective: In this study, production of a printable bio-ink (cell-hydrogel mixture), and bioprinting of keratinocytes were aimed. Cell proliferation, viability, distribution and morphology were evaluated within the epidermis-like hydrogels.

Methods: Keratinocytes from epidermis layer, that is the upper layer of skin tissue, were used. Human keratinocyte cell line (HS2) that had been characterized before we resuspended with indifferent hydrogels (gelatin, alginate, chitosan) and the mixtures to obtain the most suitable hydrogel for bioprinting. Bioprinted skin tissues were tested by MTT assay for viability analysis; and hematoxylin-eosin staining was performed for determination of cell distribution and morphology 1, 4 and 7 days after the beginning of the culture.

Results: According to the MTT results, cell viability was above 50% of that of control 2-dimensional cultures. MTT results are indicative of cell attachment and viability within the hydrogel structure. The resulting cell-laden polymeric hydrogel constructs were determined to be suitable for histological cross-sectioning, and hematoxylin/eosin histological staining indicated that cells were distributed homogeneously within the hydrogels; and they retained their viability.

Conclusion: It was shown that epidermis-like tissues were successfully produced using 3D bioprinting, and keratinocytes were able to attach the hydrogels and retain their viability. These hydrogel bioinks have the potential for skin tissue engineering applications, and particularly in fast and personalized treatment of burns in dermis layer.

Keywords: Bioprinter, Three-dimensional (3D) bioprinting, Skin tissue engineering, Hydrogel

GİRİŞ

Doku mühendisliği, doku yenilenmesi, organ fonksiyonlarının düzenlenmesi ve devamlılığı için mühendislik ilkelerinin yaşam bilimlerine uygulandığı disiplinler arası bir çalışma alanıdır¹. Doku mühendisliği yaklaşımı, canlı hücrelerin *in vitro* ortamda biyo malzemelerden oluşan destek iskeleleri üzerinde üretilmesi ve elde edilen hücre-biyo malzeme yapısının vücuttaki hasarlı bölgeye yerleştirilmesi prensibine dayanmaktadır. Doku mühendisliği çalışmalarında uzun vadede temel amaç, görevini yapamayacak duruma gelmiş hasarlı organ yerine, hücre, doku iskelesi ve uyarıcı/düzenleyici faktörler kullanılarak üç boyutlu fonksiyonel yapay doku ve organların oluşturulmasıdır²⁻⁴. Üç boyutlu (3B) biyobaskı, doku yapılarını üç boyutlu formda oluşturmak için birbirini takip eden katman yaklaşımı kullanarak, hücre fonksiyonu ve canlılığını koruyarak biyoyumlu bir materyal içerisinde üç boyutlu doku basım işlemidir⁵. Üç boyutlu biyobaskı yöntemi ile karaciğer, böbrek, kan damarları, deri greftleri

gibi yapıların oluşturulması konusunda çalışmalar sürmektedir^{6,7}. Biyobaskı ile üretilen doku yapılarında hücrelerin canlılığı ve doku farklılaşmasına öncül olması için dış faktörlerin sıkı kontrolü sağlanmalıdır. Hidrojel bütünlüğünün korunması, oksijen transferi ve besi ortamı sürekliliği önemli parametrelerdendir. Bu yöntem ile kişiden biyopsi ile alınan doku örneklerinden ilgili hücreler izole edilip *in vitro* kültürasyonla istenen miktar ve şekilde üretilebilecek, organ transplantasyonunda alıcı ve verici arasında immün yanıtın ortadan kaldırılması sağlanabilecektir⁸. Doku mühendisliği uygulamaları, deri greftleri, hücresel tedavi, ilaç salım sistemlerinde kullanılan bu yöntem, hücrelerin fiziksel olarak *in vivo* benzeri üç boyutlu ortamda davranışlarının incelenmesine de olanak sağlamaktadır^{9,10}.

Epidermis kültürünün biyobaskısında ilk adım, yazdırılmaya çalışılan dokunun tam boyutlarının saptanarak bunun baskısının gerçekleşmesi için bir bilgisayar modelinin

oluşturulmasıdır. Bir sonraki adım ise, doku baskısı için kullanılacak mürekkebin (polimer çözeltisi ve keratinosit içerikli) doğru akışkanlıkta üretilmesidir. Hazırlanan şekil ve boyutlarda basımı gerçekleştiren polimerin jelleşmesinin sağlanması için farklı yöntemler kullanılmakta olup bunların arasından en önemlisi kimyasal çapraz bağlama ile dokunun istenilen sürede katılaşmasını sağlamaktır¹¹. Son adım, oluşturulan dokunun standart hücre kültürü koşullarında kültive edilmesidir¹².

Bu çalışma kapsamında alijinat, kitosan ve jelatin polimerleri kullanılmıştır. Aljinat, kahverengi suyosunlarından elde edilen, kalsiyum iyonlarıyla çapraz bağlanan, doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan anyonik bir hidrojeldir. Yapılan in vitro çalışmalarda aljinatjelatin deri doku mühendisliği, kıkırdak doku mühendisliği ve kemik doku mühendisliği gibi uygulamalar için uygun bir biyopolimer olduğu belirlenmiştir¹³⁻¹⁶. Kitosan, hücre ve organ kültürlerinde kullanılan organik bir biyomateryal olup, karides ve yengeç kabuklu canlılardan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen yüksek moleküler katyonik bir polisakkarittir veasetik asit, formik asit gibi seyreltik asitlerde çözünür. Kitosan, dayanıklı bir biyomalzeme olarak kemik doku mühendisliği başta olmak üzere, kıkırdak doku mühendisliği, kontrollü ilaç salımı, greft üretimi gibi uygulamalarda kullanılmaktadır¹⁷⁻²⁰. Jelatin, kolajenin hidrolize edilmesi ile elde edilen, biyoyumluluğu ve biyobozunurluğu yüksek bir biyomalzemedir. Özellikle kemik ve kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında ve yara tedavisinde sıklıkla kullanılır²¹⁻²³. Jelatin sıcaklık ile çapraz bağlanma reaksiyonu gösterdiği için kolaylıkla hidrojel formunda elde edilebilir²⁴. Bu çalışmanın amacı üç farklı polimerin farklı oranlarda karıştırılarak stabil bir hidrojel elde edilmesi, elde edilen hidrojel ile keratinositlerin birleştirilmesi ile oluşan biyomürekkep ile Biyobaskı yapılması ve bir hafta süre ile hücrelerin canlılık ve dağılımının izlenmesidir.

YÖNTEMLER

A. Mekanik Modifikasyon

Kendi yazılım bilgileri doğrultusunda özgün bir çalışma sistemine sahip Ultimaker 2 prototip üretim sistem yazıcıları, 3B baskı ve model üretim teknolojilerinde kullanılmaktadır. Çalışmada, X, Y ve Z düzleminde hareket edebilen ve polimer baskı teknolojisinde kullanılan 3B baskı cihazı üzerinden hareket edildi. Bu çalışmada kullanılan cihaz poli-laktik asit (PLA) yapılı filament baskısı gerçekleştirmektedir. Ancak bu yöntemde polimerin eritilerek basılması sebebiyle basım sırasında hücre canlılığının korunması olanaksızdır. Cihaz üzerinde mekanik olarak nozzle sistemi değiştirilmiş, biyomürekkep taşıyıcı olarak şırınga aparat sistemi entegre edilmiştir. Bu sistem sayesinde biyobaskı uygulanabilir hale gelmiştir. Biyomürekkebin baskısı için gerekli olan güç kaynağı pompa sistemine entegre edilmiş ve şırınga-pompa sistemi steril serum seti ile birbirine bağlanmıştır. Cihaz üzerinde yapılan mekanik modifikasyonlar sonucu cihaz ile biyolojik malzeme baskısı gerçekleştirilmiştir. Cihaz ile gerçekleştirilen biyobaskı örneği Şekil 1' de gösterilmiştir.

B. Hücre Çalışmaları

Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı stoklarında bulunan insan keratinosit hücre hattı (HS2) kullanıldı²⁵. Üretim ortamı olarak %10 fetal sığır serumu(FBS), %1L-glutamin ve %0,1 gentamisin içeren DMEM F12 besiyeri kullanıldı. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde kültive edilerek çoğaltıldı. Biyomürekkep üretim ve kültivasyon çalışmaları Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar laboratuvarlarında (EBioPhase) gerçekleştirildi.

C. Jel Çalışmaları

C.1. Aljinat Hazırlanması

Aljinat (Sigma-Aldrich, Lot # BCBM3568V) %1, %2 ve %3 derişime sahip olacak şekilde ultra saf su ile çözdürülerek hazırlandı. 121⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi. Aljinat hidrojelinin çapraz bağlanması Ca²⁺, Mg²⁺ gibi iyonlar ile sağlandığından %2'lik 100 mL CaCl₂ solüsyonu 0.20 µm çaplı filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi. Biyobaskı sonrası çapraz bağlanma CaCl₂ çözeltisinin jel üstüne enjeksiyonu ile sağlandı.

C.2. Jelatin Hazırlanması

Jelatin (Sigma-Aldrich, Lot # SLBK6158V) %2 ve %3 derişime sahip olacak şekilde ultra saf su ile çözdürülerek hazırlandı. 121⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi. Çapraz bağlanması ısıl değişim ile sağlandığı için jel formunun stabilitesinin korunması amaçlı jelatin çözeltisi +4⁰C'de muhafaza edildi.

C.3. Kitosan Hazırlanması

Kitosan (Sigma-Aldrich, Lot # SLBR0547V) %1 ve %2 derişime sahip olacak şekilde ultra saf su ile hazırlandı. 121⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi. Kitosanın çözünmesi için karışım sonrası %1 veya %2'lik asetik asit çözeltisi oluşturacak oranda hesaplanan asetik asit çözeltileri ultra saf su içinde hazırlanarak 0.2 µm filtrelerden geçirildi ve steril hale getirildi. Sterilizasyon sonrasında asetik asit çözeltisi kitosan çözeltisine eklendi ve 1 gece manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında çözünmesi için karıştırıldı.

Oluşturulan hidrojellerin jelleşme özellikleri ve basılabilirlik durumları Tablo 1'de gösterilmiştir. Yapılan optimizasyonlar sonucu farklı polimerlerin farklı konsantrasyonlarında hidrojeller hazırlanmıştır.

C.4. Aljinat-Jelatin-Kitosan Hidrojellerinin Hazırlanması

Hazırlanan %3 aljinat hidrojeline %2 jelatin ve %2 kitosan belirli oranlarda karıştırıldı ve hibrit hidrojeller elde edildi. Elde edilen çözeltiler baskı işlemine tabi tutuldu. Bu işlem sonrası oluşturulan karışımların jelleşmesi ve basılabilirlikleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Baskı sonrası çapraz bağlanma, jelana maddesi aljinat olduğu için, %2 çözeltiye sahip CaCl₂ çözeltisi enjekte edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 1. Hidrojellerin Basılabilirlik Değerlendirmeleri

Hidrojel	Konsantrasyon (% m/v)	Jelleşme	Biyobaskı
Aljinat	%2	✓	✓
Aljinat	%3	✓	X
Kitosan	%1 + %1 Asetik asit	✓	X
Kitosan	%1 +%2 Asetik asit	✓	X
Kitosan	%2 +%1 Asetik asit	✓	X
Kitosan	%2 +%2 Asetik asit	X	X
Jelatin	%2	X	X
Jelatin	%3	X	X

✓: istenilen durum X: istenmeyen durum

Tablo 2: Hidrojellerin karışım oranlarına bağlı olarak jelleşme ve baskı özellikleri

Hidrojel	Karıştırma Oranı	Jelleşme	Baskı
Aljinat-Jelatin	1:1	✓	✓
Aljinat- Kitosan	2:1	✓	✓
Aljinat-Jelatin-Kitosan	1:1:1	XX	X

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu olarak oluşturulacak deney düzeneği için:

- Aljinat (Materyal 1: Mat1)
 - Aljinat-Jelatin (Materyal 2: Mat2)
 - Aljinat-Kitosan (Materyal 3: Mat3)
- karışımlarının baskısının yapılmasına karar verilmiştir.

D. Hidrojellerin Hücrelerle Karıştırılarak Biyo-Mürekkeplerin Hazırlanması

Yapılacak biyobaskı için oluşturulacak hücre süspansiyonunda hücre sayımı gerçekleştirilmiş ve hücreler polimer çözeltileri içine toplam konsantrasyon 10^6 hücre/mL olacak şekilde karıştırılarak 50 mL'lik tüplere 40'ar mL olarak aktarılmıştır.

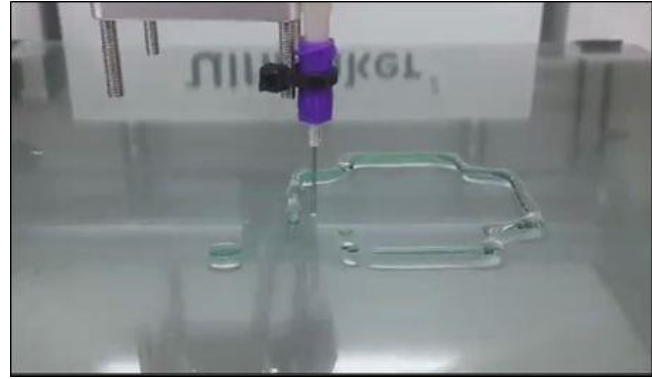
E. Hidrojellerin Basımı, Hücre Canlılığı ve Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

Biyobaskı için hazır hale getirilen biyo-mürekkepler 3B biyoyazıcı ile kare formda basılarak %2'lik $CaCl_2$ çözeltilisi ile jelleştirilmiştir. Biyobaskı ile elde edilen doku yapıları 7 günlük kültüre alınarak, 1., 4. ve 7. günlerde MTT canlılık analizi için spektrofotometre ile yapılan ölçümde absorbans değerleri 570 ve 690 nm'de okutulmuştur. Hücre dağılımlarının belirlenmesi için 7. günde paraformaldehit ile fikse edilen hücre içerikli hidrojeller kriyostat ile kesit alınarak Hematoksilen-Eozin boyamaya tabi tutulmuştur. Biyobaskı sonrası oluşturulan 3B dokularda ve iki boyutlu kontrol hücre hattında MTT analizi için üçer tekrar (n=3), Hematoksilen-Eozin boyama malzemeleri için ikişer tekrar yapılmıştır. Hücre canlılıkları her bir örneğin absorbans değeri, o deney setine ait 2B hücre kontrolün ortalama absorbans değerine oranlanıp % canlılık oranları belirlenerek grafiklendi. Grafiklerde 3 tekrarın ortalaması \pm standart sapmaları (SD) sütun grafik olarak verildi. Uygulanan testten elde edilen verilerin anlamlılık derecelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için GraphPad Prism programı (ver.6, GraphPad Software, Inc., San Diego Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Deney grupları (örnek sayısı=3) arasındaki istatistiksel farklar çift yönlü ANOVA (varyans analizi) yöntemi ile, %95 güven aralığında ($p \leq 0.05$) değerlendirilmiştir. Gruplar arasında ikili ilişkiler Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) yöntemiyle saptanmıştır.

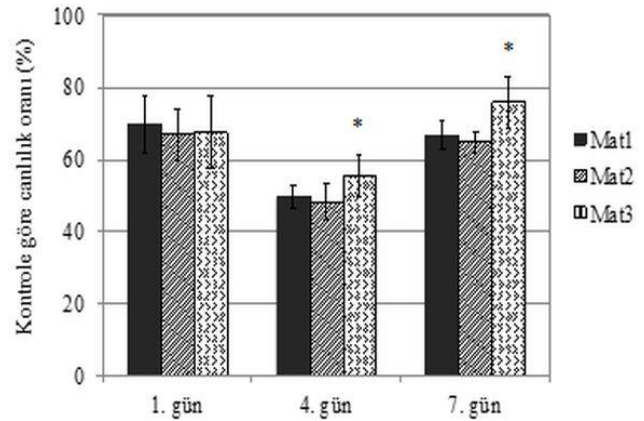
BULGULAR

MTT Analiz Sonuçları

MTT canlılık analiz sonuçlarına göre test edilen bütün günlerde jeller içinde hücre canlılıkları 2B kontrollerle karşılaştırıldığında %50'nin üzerindedir. Özellikle aljinat+kitosan (Mat3) jellerde, diğer iki hidrojelden daha yüksek hücre canlılığı gözlenmiştir (Şekil 2). Bu sonuçlar keratinositlerin kullanılan hidrojeller içinde canlılıklarını sürdürerek rahatça üreyebildiklerini göstermektedir.



Şekil 1. Modifiye cihaz ile gerçekleştirilen Hidrojel biyobaskı örneği.



Şekil 2. MTT canlılık analizleri. (* $p \leq 0,05$)

Hematoksilen- Eozin Boyama Sonuçları

Hematoksilen- Eozin boyama sonucu elde edilen doku iskelelerine ait görüntüleri Şekil 3-5'de gösterilmiştir. Bu görüntülerde Aljinat-Jelatin-Kitosan hidrojellerinin gözenekli yapılarının hücre tutunması ve büyümesi için uygun olduğu görülmektedir.

Elde edilen biyobasılmış doku iskelelerinin hücre tutunmaları ve besin/oksijen transportu için uygun, üç boyutlu, bağlantılı porlu yapılarla sahip olduğu gözlemlenmiştir. Kullanılan malzemelerin dondurarak kesit alınmasına (kriyokesit) uygun olduğu gözlemlenmiştir. Hücreler (mavi/mor) hidrojel içerisinde oldukça homojen dağılım göstermiştir. Doku iskelelerinin yapısı Hematoksilen-Eozin boyama ile açık bir şekilde (pembe) belirlenmiş ve porlu yapı elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu porlu yapılar sayesinde hücreler için tutunma ortamları oluşturulduğu ve hücre proliferasyonu gerçekleştirildiği MTT analizi ile doğrulanmıştır.

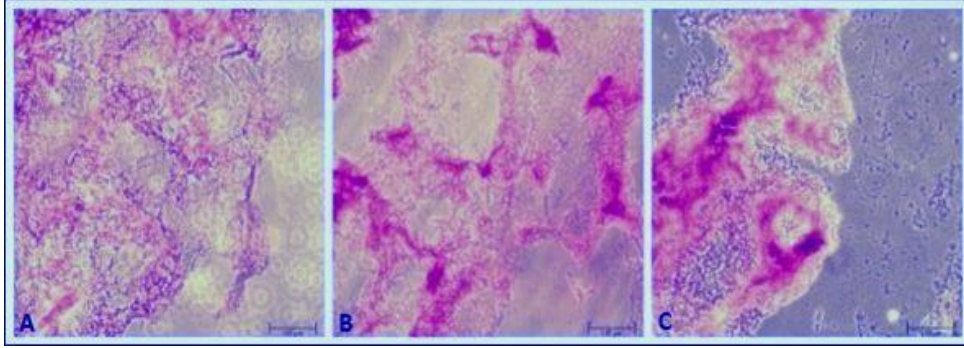
TARTIŞMA

Üç boyutlu biyobaskı yöntemi diğer doku mühendisliği yöntemleri arasında hidrojel ve hibrit hidrojellerin farklı ve çok çeşitli hücreler ile beraber, yüksek hassasiyet ve çözünürlükte basımı, kompleks geometrilerin üretiminin sağlanabilmesi, hatta kişiye özel ürünlerin basılabilmesi açısından büyük avantajlar sağlamaktadır²⁵. Biyomürekkeplerin basılabilirliği için en önemli özellikleri vizkoziteleridir. Çok çeşitli biyomürekkepler arasında en sık kullanılanlar jelatin ve polietilen glikol (PEG) gibi kayma gerilmesi altında vizkozitesi düşen, bu sebeple akışkanlığı yüksek olan, basım işlemi bittikten sonra kendiliğinden jelleşen malzemeler olmuştur²⁶⁻²⁸. Ancak bu hidrojellerin bütünlük ve katılıklarını koruyabilmeleri için üretim sonrası ikincil bir çapraz bağlama işleminden geçmeleri gerekmektedir. Çapraz bağlama genellikle kimyasal yollarla yapıldığı için bu işlem hücre canlılığında önemli düşüslere

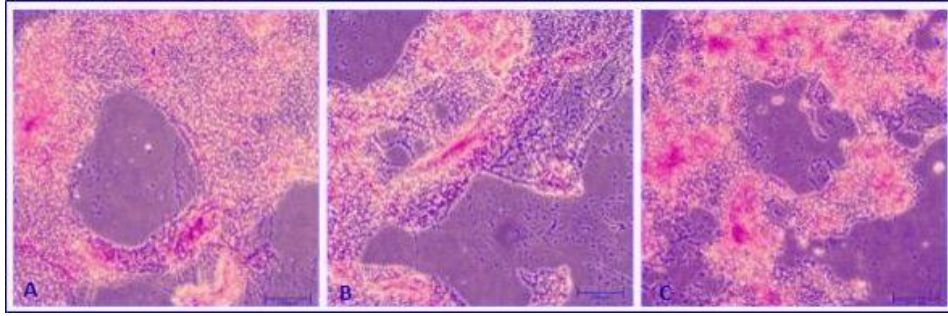
neden olmaktadır²⁹. Bu sebeple aljinatın Ca²⁺ iyonu varlığında hızla fiziksel yolla çapraz bağlanabiliyor olması, diğer hidrojellere göre biyobaskı için kullanımını arttırmıştır. Duan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, damar doku mühendisliği ile oluşturulan damar modeli için aljinat ve jelatin hidrojelleri kullanılmış, elde edilen hibrit hidrojeller ile doku kültürü çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir³⁰. Koch ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı hidrojel ve biyopolimerler kullanarak deri doku mühendisliği çalışması için biyobaskı optimizasyonuna çalışılmış, aljinat ve kollajen biyopolimerleri kullanarak keratinosit ve fibroblastik deri katmanlarının biyobaskısı gerçekleştirilmiştir³¹.

Biyobaskının başarısını belirleyen ikinci unsur kullanılan hücrelerin doğru seçimidir. Biyobaskı yöntemi jellerin içinde yüksek sayıda hücre eklenmesini gerektirdiği için, kullanılacak hücrelerin hem yüksek sayılarda üretilebilmesi, hem de baskı sırasında uygulanan kayma gerilmelerine dayanıklı olmaları gerekmektedir³²⁻³⁴. Bu çalışma kapsamında aljinat, jelatin ve kitosan hidrojelleri ve bu hidrojellerden elde edilen hibrit hidrojellerin biyobaskılarının optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve deri doku mühendisliği uygulaması için deri epidermis tabakasında bulunan keratinosit hücre hattı ile biyobaskı gerçekleştirilip canlılık analizi ve histolojik boyama uygulanmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre hücre canlılıkları kontrol olarak kullanılan 2 boyutlu kültüründeki canlılıkla karşılaştırıldığında %50'nin üzerinde çıkmıştır. MTT sonuçları hücrelerin hidrojel yapısı içerisinde biyobaskı sırasında uygulanan kayma gerilmelerine dayanıklı olduklarının göstergesidir. Ancak kullanılacak her hücre tipi için hücrelerin zarar görmeyeceği optimum kayma gerilmesi miktarının belirlenmesi ve gerekirse buna uygun şekilde jel vizkozitesive/veya baskı hızı değiştirilerek bu gerilmenin altında kalınmaya dikkat edilmesi gerekmektedir. Birden çok

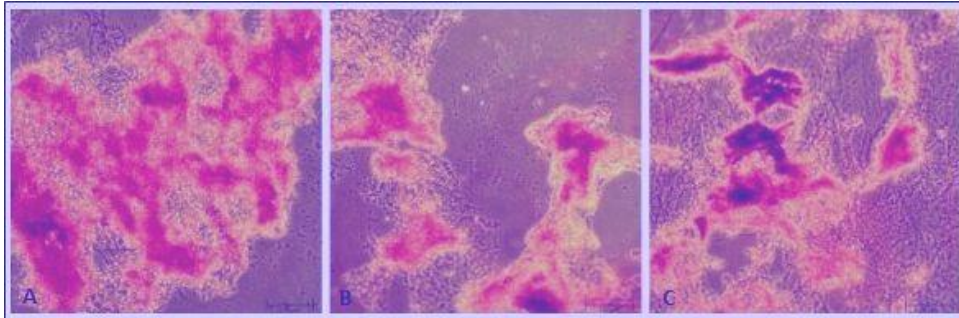
hücre tipinin bir arada biyobaskısı hedeflendiği durumlarda biyomürekkebin reolojik özelliklerinin ve baskı hızının belirlenmesi daha da zorlaşacaktır.



Şekil 3. 1. Gün H&E boyama görüntüleri 10X büyütme (A: Aljinat, B: Aljinat+ Jelatin, C:Aljinat+Kitosan). Ölçek çizgisi = 100 µm



Şekil 4. 4. gün H&E boyama görüntüleri 10X büyütme (A: Aljinat, B: Aljinat+ Jelatin, C:Aljinat+Kitosan). Ölçek çizgisi = 100 µm.



Şekil 5. 7. gün H&E boyama görüntüleri 10X büyütme (A: Aljinat, B: Aljinat+ Jelatin, C:Aljinat+Kitosan). Ölçek çizgisi = 100 µm.

Çalışmamızda kullanılan üç hidrojel içinden hücre canlılığı açısından en iyi olarak belirlenen aljinat-kitosan hibrit hidrojeldir. Sadece aljinat kullanılan biyobaskı örneklerinde baskıya uygun viskoziteyi elde edebilmek için aljinat konsantrasyonu arttırılmak zorundadır^{35,36}. Bu da jel içindeki gözenekliliği düşürerek hücre canlılığında önemli düşüşe sebep olmaktadır³⁷. Cohen ve arkadaşlarının bir çalışmasında uygun viskozite sağlamak için %2 konsantrasyonda aljinatbiyobaskı öncesinde CaSO₄ ile karıştırılmıştır; ancak bu yaklaşım baskı süresinin çok kısa olmasını gerektirdiği için son ürünün boyutlarını önemli ölçüde sınırlamaktadır³⁸. Bu çalışmada kullanılan aljinat-kitosan hibrit jellerinde kitosan, düşük konsantrasyon dahil hibrit jel yapısının stabilitesinin korunmasını sağlamaktadır. Hücre canlılığı hidrojel yapısı içerisinde bulunan hücrelerin hidrojel içine tutunabilmeleri, yeterli oksijen ve besiyerine ulaşabilmeleri, hidrojellerin hücreler için gerekli mekanik özellikleri göstermesine bağlıdır^{8,12}. Hematoksilen-Eozin boyama sonucunda elde edilen görüntülerde çalışmada kullanılan hidrojellerin gözenekli yapılarının hücre tutunması ve büyümesine olacak sağlayacak nitelikte olduğu görülmektedir. Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan doku iskelelerinin en önemli özelliklerinden biri hücre tutunması ve yayılması için yeterli yüzey alanı olan, besiyerinin ve atık maddelerin difüzyonunun hızla ve etkili şekilde sağlayacak büyüklükte, kendi içinde bağlantılı gözenek yapısına sahip olmalarıdır³⁹.

Bu çalışmada farklı hidrojeller kullanılarak üç boyutlu biyoyazıcı ile üretilen epidermis benzeri doku kesitlerinin doku mühendisliği uygulamalarında, özellikle yanıklarda epidermis onarımında hızlı ve kişiye özel tedavi seçenekleri sunma potansiyeli mevcuttur. Deri dokusunu daha doğru taklit etmek için dermal fibroblastlar, duysal sinirler gibi ilgili diğer hücreler de eklenerek, daha kompleks ve hiyerarşik deri modellerinin biyobaskısıyla

birlikte hem daha fonksiyonel doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesi, hem de farmasötik çalışmalarda yeni terapötiklerin denenmesinde kullanılabilecek 3B modellerin üretimi mümkün olacaktır.

Teşekkür

Proje çalışmalarında yardımlarından ötürü Biyolog Armağan YARGIN'a teşekkür ederiz. Bu çalışma 1139B411402337 numaralı TÜBİTAK 2209B Sanayi Odaklı Lisans Projesi kapsamında TÜBİTAK tarafından finansal desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma her hangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Lanza R, Langer R, Vacanti JP. Principles of tissue engineering: Academicpress; 2011.
2. O'brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Mater Today. 2011; 14:88-95.
3. Akdoğan E, Omay SB. Organ Mühendisliğinde Kök Hücre Uygulamaları. Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci. 2006; 2:63-8.
4. Kim I-Y, Seo S-J, Moon H-S, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnol Adv. 2008; 26:1-21.
5. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. NatBiotechnol. 2014;32:773-85.
6. Kolesky DB, Truby RL, Gladman A, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. Adv Mater. 2014;26:3124-30.

7. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*. 1981; 211(4486):1052-4.
8. Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33:6020-41.
9. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108:1713-26.
10. Auger FA, Berthod F, Moulin V, Pouliot R, Germain L. Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;39:263-75.
11. Stanton M, Samitier J, Sanchez S. Bioprinting of 3D hydrogels. *Lab Chip*. 2015;15:3111-5.
12. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim D-H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv*. 2016;34:422-34.
13. Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy*. 2000;16:571-7.
14. Priya SG, Jungvid H, Kumar A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2008; 14:105-18.
15. Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*. 2000;21:795-801.
16. Yücesan E, Başoğlu H, Göncü B, Kandaş NÖ, Ersoy YE, Akbaş F, Aysan E. Mikroenkapsüle edilen paratiroid hücrelerinin *in-vitro* optimizasyonu. *Dicle Tıp Derg*. 2017;44:373-80.
17. Uslu B, Arbak S. Doku Mühendisliğinde Kitozanın Kullanım Alanları. 2010.
18. Suh J-KF, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 2000;21:2589-98.
19. Kutlu B, Aydın T, Seda R, Akman AC, Gümüşderelioglu M, Nohutcu RM. Platelet-rich plasma-loaded chitosan scaffolds: Preparation and growth factor release kinetics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101:28-35.
20. Pandey AR, Singh US, Momin M, Bhavsar C. Chitosan: Application in tissue engineering and skin grafting. *J Polym Res*. 2017;24:125.
21. Liu X, Smith LA, Hu J, Ma PX. Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30:2252-8.
22. Hori K, Sotozono C, Hamuro J, et al. Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing. *J Control Release*. 2007;118:169-76.
23. Lien S-M, Ko L-Y, Huang T-J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009; 5:670-9.
24. Kang H-W, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999;20:1339-44.
25. Skardal A, Zhang J, Prestwich GD. Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetra crylates. *Biomaterials*. 2010; 31:6173-81.
26. Highley CB, Rodell CB, Burdick JA. Direct 3D printing of shear-thinning hydrogels into self-healing hydrogels. *Adv. Mater*. 2015;27:5075-9.
27. Hinton TJ, Jallerat Q, Palchesko RN, et al. Three-dimensional printing of complex biological structures by free form reversible embedding of suspended hydrogels. *Sci. Adv*. 2015; 1:e1500758.
28. Colosi C, Shin SR, Manoharan V, et al. Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3D tissue constructs using low viscosity bioink. *Adv. Mater*. 2015;28:677-84.
29. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol. Biosci*. 2006;6:623-33.
30. Duan B, Hockaday LA, Kang KH, Butcher JT. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2013; 101:1255-64.
31. Koch L, Deiwick A, Schlie S, et al. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol Bioeng*. 2012; 109:1855-63.
32. Miller JS. The billion cell construct: will three-dimensional printing get us there? *PLoS Biol*. 2014; 12:e1001882.
33. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol*. 2014;32:773-85.
34. Blaeser A, Campos DFD, Puster U, Richtering W, Stevens MM, Fischer H. Controlling shear stress in 3D bioprinting is a key factor to balance printing resolution and stem cell integrity. *Adv. Healthc. Mater*. 2016; 5:326-33.
35. Fedorovich NE, Schuurman W, Wijnberg HM et al. Biofabrication of osteochondral tissue equivalents by printing to topologically defined, cell-laden hydrogel scaffolds. *Tissue Eng C Methods*. 2012;18:33-44.

36. Luo Y, Lode A, Gelinsky M. Direct plotting of three-dimensional hollow fiber scaffolds based on concentrated alginate pastes for tissue engineering. *Adv Healthcare Mater.* 2013;2:777–83.
37. Malda J, Visser J, Melchels FP et al. 25th Anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater.* 2013;25:5011–28.
38. Cohen DL, Malone E, Lipson H et al. Direct free form fabrication of seeded hydrogels in arbitrary geometries. *Tissue Eng.* 2006; 12:1325–35.
39. Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review. *Int J MolSci.* 2016;17:1974.