T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROALG YÜKLÜ YARA ÖRTÜLERİNİN 3B BİYOBASKI İLE GELİŞTİRİLMESİ

Davut YERLİKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Didem BALKANLI

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Benan İNAN

Şubat, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROALG YÜKLÜ YARA ÖRTÜLERİNİN 3B BİYOBASKI İLE GELİŞTİRİLMESİ

Davut YERLİKAYA tarafından hazırlanan tez çalışması 05.02.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Didem BALKANLI Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Benan İNAN Yıldız Teknik Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Didem BALKANLI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Tuğba ÖZER, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Melek Mümine EROL TAYGUN, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Didem BALKANLI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Mikroalg Yüklü Yara Örtülerinin 3B Biyobaskı ile Geliştirilmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Davut YERLİKAYA

İmza

TEŞEKKÜR

Araştırmamı Yıldız Teknik Üniversitesi'ndeki laboratuvarında yürütme olanağını bana sağlayan, yüksek lisans programım boyunca sağladığı her türlü kaynak, destek ve rehberliğini esirgemediği için danışmanım Prof. Dr. Didem BALKANLI 'ya;

Bu tezin özellikle deneysel kısımlarında tüm sorularıma sabırla cevap veren ve her aşamada destekleriyle bana yardımcı olan eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Benan İNAN ‘a;

Tez çalışmam boyunca her türlü maddi ve manevi destekten dolayı arkadaşım Ahmet Göktuğ TÜFEK’ e;

Ayrıca katkılarından dolayı değerli jüri üyelerim Doç. Dr. Tuğba ÖZER ve Prof. Dr. Melek Mümine EROL TAYGUN 'a;

Bana her zaman güvenen ve her koşulda destek veren ailem ve dostlarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında kullanılan kutup mikroalg örneklerinin Antarktika’dan eldesi, T.C. Cumhurbaşkanlığı himayesinde, T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı uhdesinde ve TÜBİTAK MAM Kutup Araştırmaları Enstitüsü koordinasyonunca desteklenmiştir.

Davut YERLİKAYA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR iii
SİMGE LİSTESİ vi
KISALTMA LİSTESİ vii
ŞEKİL LİSTESİ viii
TABLO LİSTESİ ix
ÖZET x
ABSTRACT xii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Orjinal Katkı 3
2 MİKROALG YÜKLÜ YARA ÖRTÜSÜ 4
2.1 Yaranın Tanımı ve Türleri 4
2.2 Yaranın İyileşmesi 4
2.3 Yara İyileşmesinde Yara Örtüsü 5
2.3.1 Yara Örtülerinin Sınıflandırılması 6
2.3.2 Yara Örtüsünde Kullanılan Malzemeler 8
2.3.3 Yara Tedavisinde Mikroalglerin Kullanımı 12
2.4 Mikroalg Yüklü Yara Örtülerinin 3B Yazıcı ile Üretimi 15
3 DENEYSEL ÇALIŞMA 19
3.1 Mikroalg 19
3.2 Malzemelerin Hazırlanması 19
3.2.1 Biyomürekkebin Hazırlanması 20
3.2.2 Kalsiyum Klorür Çözeltisinin Hazırlanması 20
3.3 3B Yazıcı ile Basılabilirlik Testi 21
3.4 Mikroalg Yüklü Yara Örtülerinin 3B Biyobaskı ile Üretilmesi 24
3.5 Doku İskelelerinin İnkübasyonu ve Yapılan Ölçümler 24
3.5.1 Mikroalg Konsantrasyonunun Ölçülmesi 25
3.5.2 Suda Çözünmüş Oksijen Konsantrasyonunun Ölçülmesi 25
3.5.3 β-Karoten ve Klorofil-α Konsantrasyonlarının Ölçülmesi 25
4 DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA 26
4.1 3B Yazıcı ile Basılabilirlik Testi 26

4.2 Ortam pH'ı ve Mikroalg Büyüme Eğrisi 27
4.3 Oksijen Konsantrasyonu 31
4.4 β-Karoten ve Klorofil-α Konsantrasyonu 32
5 SONUÇ **34**
KAYNAKÇA **37**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **47**

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
rpm	Dakika Başına Dönüş Sayısı
°C	Derece Celsius
G	Gauge
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Kalsiyum Klorür Dihidrat
NaCMC	Karboksimetil Selüloz Sodyum Tuzu
CO_2	Karbondioksit
kPa	Kilopaskal
L	Litre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum Klorür

KISALTMA LİSTESİ

ECM	Ekstrasellüler Matris
HA	Hyaluronik Asit
PVA	Polivinil Alkol
PCL	Poli (ε-kaprolakton)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
UV	Ultraviyole
3B	Üç Boyutlu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 İdeal bir yara örtüsünde bulunması gereken özellikler [40]. **6**

Şekil 2.2 Yara örtülerinin sınıflandırılması [44]. **8**

Şekil 2.3 a)Mikroalglerin kolajen bir iskeleye ekilmesi. b)SEM analizi ile ekilen hücrelerin homojen dağılımının görüntülenmesi [1]. **13**

Şekil 2.4 3B Biyobaskı sonrası mikroalg yüklü doku iskelesi. **16**

Şekil 2.5 Mikroalg yüklü doku iskelesi üretiminin şematik gösterimi. **18**

Şekil 3.1 *Chlorella variabilis* YTU.ANTARCTIC. 001 optik mikroskop görüntüsü (x100). **19**

Şekil 3.2 Col %5 malzemesinin basılabilirlik testi. **21**

Şekil 3.3 Farklı dolgu tipine sahip Col %10 malzemesinin basılabilirlik testi. **22**

Şekil 3.4 Farklı dolgu tipi ve katman sayısına sahip Col %10 malzemesinin basılabilirlik testi. **23**

Şekil 3.5 Col %15 malzemesinin basılabilirlik testi. **23**

Şekil 3.6 Çapraz bağlanma sonrası farklı katman sayısına sahip mikroalg yüklü doku iskeleleri. **24**

Şekil 4.1 16 günlük inkübasyon boyunca ortam pH değerleri. **28**

Şekil 4.2 16 günlük inkübasyon boyunca mikroalglerin büyüme eğrisi. **29**

Şekil 4.3 A, B ve C sırasıyla 1,3 ve 7. günlerde 3B biyobaskılı doku iskelelerinin fotoğrafları ve optik mikroskop görüntüleri. **30**

Şekil 4.4 A ve B sırasıyla 1 ve 7. Günlerde 3B biyobaskılı 40 katmanlı doku iskelesinin fotoğrafları. **31**

Şekil 4.5 16 günlük inkübasyon boyunca çözünmüş oksijen değerleri. **32**

Şekil 4.6 16 günlük inkübasyon boyunca β-karoten konsantrasyonu. **33**

Şekil 4.7 16 günlük inkübasyon boyunca klorofil-α konsantrasyonu. **33**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Yara örtüsünde kullanılan doğal polimerler [45]**.....10**
Tablo 3.1 Farklı içerikteki biyomürekkeplerin konsantrasyon değerleri**. 20**

ÖZET

Mikroalg Yüklü Yara Örtülerinin 3B Biyobaskı İle Geliştirilmesi

Davut YERLİKAYA

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Didem BALKANLI

Eş-Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Benan İNAN

3B biyobaskı teknolojisi, biyomühendislik tasarımı ile geliştirilen dokuları ve organları üretmek için ortaya çıkmıştır. 3B biyobaskı teknolojisi ile, hücrelerin hayatta kalması ve fonksiyonelliğini koruması için hidrojel bileşimleri insan vücudunun hücre dışı ortam özelliğini taklit edecek şekilde optimize edilmektedir. Büyük teknolojik gelişmelere rağmen, 3B biyobaskılı dokuların kullanılabilirliğini sağlamak için çözülmesi gereken birçok zorluk bulunmaktadır. Biyobaskılı doku ve organların ana sınırlamalarından birisi, dokulara oksijen taşınımının yeterli seviyede olmamasıdır. Bu bağlamda doku oksijenlenmesini iyileştirmek amacıyla, geniş bir klinik uygulama yelpazesi için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yaklaşımlardan, mikroalgler ve siyanobakteriler gibi fotosentetik mikroorganizmaların dahil edildiği, ışığa maruz kaldığında oksijenin lokalize ve kontrollü bir şekilde üretilebildiği ve salınabildiği, biyobaskı yöntemiyle üretilmiş biyomalzemelerin geliştirilmesi yakın zamanda keşfedilen umut verici bir

yaklaşımdır. Bu çalışmada canlı kutup mikroalgi (*Chlorella variabilis* YTU.ANTARCTIC. 001) yüklü doku iskelelerinin 3B biyobaskı yöntemi ile üretimi araştırılmıştır. Kutup mikroalgleri biyokimyasal olarak aktif maddeler üretmektedir. Bu organizmalar deniz mikroalglerinden daha fazla biyoaktif molekül üretir ve bu moleküller farmasötik bileşikler olarak kullanılabilmektedir. Yapılan deneyler sonucunda kutup mikroalglerinin doku iskelesinde bir hafta içerisinde iyi bir şekilde büyüdüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca 5 mg/L'den 10 mg/L'ye kadar dikkat çekici bir oksijen artışı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile kutup mikroalgi yüklü doku iskelelerinin geliştirilmesi, mikroalgler tarafından terapötik ajanlar olarak oksijen veya biyoaktif bileşiklerin dokuya sağlanması konusunda umut vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyobaskı, mikroalgler, biyomalzemeler, doku mühendisliği, 3B hidrojel.

ABSTRACT

Development of Microalgae-Loaded Wound Dressing via 3D Bioprinting

Davut YERLİKAYA

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Didem BALKANLI

Co-supervisor: Assist. Prof. Dr. Benan İNAN

3D bioprinting technology has emerged to produce tissues and organs developed with bioengineered design. With 3D bioprinting technology, hydrogel compositions are optimized to mimic the extracellular environment of the human body for cells to survive and maintain their functionality. Despite major technological advances, there are many challenges that need to be solved to ensure the usability of 3D bioprinted tissues. One of the main limitations of bioprinted tissues and organs is that oxygen transport to the tissues is not sufficient. In this context, new approaches are needed to improve tissue oxygenation for a wide range of clinical applications. Among these approaches, the development of biomaterials produced by bioprinting, in which photosynthetic microorganisms such as microalgae and cyanobacteria are included, and in which oxygen can be produced and released in a localized and controlled manner when exposed to light, is a recently discovered promising approach. In this study, the production of live polar microalgae (*Chlorella variabilis* YTU.ANTARCTIC. 001) loaded tissue scaffolds using the 3D bioprinting method was investigated. Polar microalgae produce biochemically

active substances. These organisms produce more bioactive molecules than marine microalgae, and these molecules can be used as pharmaceutical compounds. As a result of the experiments, it was observed that microalgae grew well on the tissue scaffold within a week. Additionally, a remarkable increase in oxygen was detected from 5 mg/L to 10 mg/L. The development of polar microalgae-loaded tissue scaffolds with this study holds promise for the providing oxygen or bioactive compounds as therapeutic agents by microalgae to the tissue.

Keywords: Bioprinting, microalgae, biomaterials, tissue engineering, 3D-plotted hydrogel.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Doku mühendisliği uygulamaları rejeneratif tıp alanında birçok fırsat sunmaktadır, ancak bu uygulamaların bazı temel sorunları vardır ve bu sorunlardan en önemlisi 3 boyutlu (3B) doku kültürlerine yeterli oksijenin sağlanamamasıdır [1]. Ayrıca, biyomühendislik ürünü mikrodokuların/hücre yüklü biyomateryallerin in vivo uygulamalarda implantasyonu sonrasında oksijen eksikliğine (hipoksi) bağlı olarak hücresel apoptoz ve mikro doku nekrozu gözlenebilmektedir [2].

Hipoksiyi azaltmak amacıyla yapı iskelelerinde ve mikroküre lerde oksijen kaynağı olarak sodyum perkarbonat, magnezyum peroksit, kalsiyum peroksit ve hidrojen peroksit gibi oksijen salan malzemeler kullanılmaktadır [3]. Bununla birlikte, bu malzemeler, tuz yan ürünlerinin ayrışması ve uygun olmayan salım profilleri nedeniyle hücre canlılığını olumsuz yönde etkileyen hücreler için sitotoksiktir [3].

Bu nedenle hücrelere sürekli oksijen kaynağı olabilen fotosentetik oksijen üreten mikroalgler son yıllarda yenilikçi bir yaklaşım olarak kullanılmaya başlanmıştır. Oksijen, harici bir oksijen kaynağı olmasa bile, mikroalgler tarafından insan hücrelerine fotosentetik olarak sağlanır [4]. Hopfner ve ark., algleri in vitro doku mühendisliği için oksijen kaynağı olarak kullanarak, algleri ve memeli hücrelerini birlikte kültürlediler ve sonuçta fotosentetik bir biyomateryal elde etmişlerdir [1]. Bu çalışmanın devamında yer alan başka bir çalışmada Schenck ve ark. in vivo bir deneyde elde ettikleri fotosentetik biyomateryali bir fareye implante etmiş, mikroalgler en az 5 gün hayatta kalmış ve önemli bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmamıştır. Ayrıca mikroalglerin varlığında yaralı bölgede yüksek düzeyde vaskülarizasyon elde etmişlerdir [5]. Dahası kullanılan mikroalglerin türleri de oldukça önemlidir. Bu çalışmada kullanılan kutup mikroalgleri zorlu çevre koşullarına uyum sağlamak için hücre zarının yapısını ve fonksiyonunu değiştirir, çeşitli modifikasyonlar yapmalarına olanak tanır ve fizyolojik olarak aktif maddeler üretirler [6]. Kutup mikroalgleri, deniz mikroalglerine nazaran daha fazla biyoaktif molekül üretebilme yeteneğine sahiptir. Ürettikleri bu biyoaktif moleküller doku mühendisliği alanında tedavi amaçlı kullanılabilir. Bu özellikler sayesinde kutup

mikroalgleri yara iyileşmesinde kullanılacak yara örtüleri için potansiyel canlılar olabilirler [6].

Eklemeli imalat, nano ölçekten mikro ve makro ölçeğe kadar çok çeşitli uygulamalarda kullanılan bir yöntemdir [7]. Bu üretim tekniği ile istenilen malzeme (hayvan, bitki veya alg hücreleri içerenler) homojen bir şekilde katman katman oluşturulabilmektedir [7, 8]. Böylece hücreler baskılı yapılarda immobilize edilir [8]. Fotosentetik malzemelerin üretimi için mikroalglerin belirli yapılara immobilizasyonuna yönelik katmanlı bir üretim tekniği olan 3B biyobaskı, son yıllarda birçok kez kullanılmaktadır [4, 9]. 3B biyobaskı yöntemi birçok farklı baskı yöntemini içermesine rağmen, kullanım kolaylığı, bulunabilirliği ve çeşitli biyomateryallerle uyumluluğu açısından çoğunlukla ekstrüzyon bazlı biyobaskı kullanılmaktadır [8].

Poli (ε-kaprolakton) (PCL) gibi sentetik polimerler, jelatin ve kollajen gibi doğal protein bazlı hidrojeller, agar ve aljinat gibi doğal polisakkarit hidrojeller gibi çok çeşitli biyomateryaller, 3B biyobaskı veya farklı hücre immobilizasyon teknikleri için birçok kez kullanılmıştır. [10, 11]. Son yıllarda en çok kullanılan aljinat / metilselüloz kombinasyonu [4, 7, 9], karboksimetil selüloz sodyum tuzu (NaCMC) / jelatin / aljinat / polivinil alkol (PVA) kombinasyonu [3] ve ipek bazlı [11] biyomateryaller mikroalg yüklü yapıların 3B biyobaskısında kullanılmıştır. Aljinat, 3B biyobaskıda en yaygın kullanılan biyopolimerlerden biridir çünkü 3B yapıları baskıdan sonra stabil ve dayanıklı hale getirmek için kolayca çapraz bağlanabilir. Ayrıca aljinatın jelleşme süreci çok hızlı ve ılımlı koşullar altında gerçekleştiğinden canlı hücrelere zarar vermemektedir [10]. Aljinatın yanı sıra, viskoziteyi arttırmak [10] ve 3B basılabilirlik sağlamak [4] için çoğunlukla metilselüloz kullanılmıştır. Ancak metil selülozun viskoziteyi artırıcı bir ajan olması dışında hücreler üzerinde olumlu bir etkisi yoktur [12].

Kolajen, hücre yapışmasını ve hücre farklılaşmasını sağladığından ve özellikle fibroblastların hücresel aktivitesini etkileyerek doku onarımında memeli hücreleri için vazgeçilmez bir doğal polimerdir. Hücre dışı matrisin ana bileşenlerinden biri olduğundan doğal biyouyumluluğa, düşük sitotoksisiteye ve yüksek su tutma kapasitesine sahiptir. Bu nedenle 3 boyutlu biyobaskıda kullanılan umut verici bir malzeme olarak dikkat çekmiştir. Ayrıca aljinat/kollajen karışımının kullanıldığı bir çalışmada kolajenin aljinata göre deformasyona karşı daha dirençli olduğu

bulunmuştur [13]. Kolajenin oda sıcaklığındaki viskozitesi ve sıcaklığa bağlı olarak viskozitesindeki değişimler göz önüne alındığında, oda sıcaklığında 3 boyutlu biyobaskı için oldukça uygundur ve artan sıcaklıklarda azalan viskozitesi sayesinde yüksek viskoziteli çözeltiler bile basılabilmektedir [15]. Bu özellikleri sayesinde metil selüloz yerine kolajen kullanılabilir.

1.2 Tezin Amacı

Deri yaralanmalarında da görülen ve tedavi sürecinin uzamasına sebep olan hipoksik etkinin giderilmesi için yara dokusundaki hücrelere sürekli olarak oksijen kaynağı olabilecek kutup mikroalgi içerikli aljinat ve kolajen temelli doku iskelelerinin 3B biyobaskı ile üretilmesidir.

1.3 Orjinal Katkı

Doku hasarı tedavisinde geçmişten günümüze tedavi amaçlı çok sayıda malzeme kullanılmıştır. Kullanılan bu malzemelerle nispeten iyi sonuçlar elde edilse de genellikle yeteri kadar hızlı tedavi gerçekleştirilememektedir. Tedavi sürecinin uzamasındaki en büyük etkenlerden biri ise oksijen yetersizliği olarak bilinen hipoksi etkisidir. Dokular hasar sonrası yeteri kadar oksijen ile buluşamazsa hipoksi görülmesi kaçınılmazdır. Bu etkiyi gidermek amacıyla denenen birçok çalışma vardır. Bunlardan en yenilikçi ve gelecek vadeden uygulamalardan birisi ise mikroalglerin doku onarımında sürekli oksijen kaynağı olarak kullanılmasıdır. Bu tezde de sürekli oksijen kaynağı olarak kutup mikroalgleri kullanılmıştır. Ayrıca alg hücrelerinin immobilizasyonu ve yara dokusunun kapatılması amacıyla kolajen ve aljinat temelli matris kullanılmıştır. Kolajen ve aljinat daha önce çok kez denenmiş ve hali hazırda yara örtüsü olarak kullanılmaktadır. Ancak kutup mikroalglerinin oksijen üretimi ve insan hücreleri üzerindeki etkilerini test etmek amacıyla kolajen ve aljinat temelli matriste kullanımı üzerine çalışma bulunmamakta olup, bu çalışmanın literature ve sağlık teknolojileri alanında endüstriye katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

2
MİKROALG YÜKLÜ YARA ÖRTÜSÜ

2.1 Yaranın Tanımı ve Türleri

Temelde yara fiziksel vb. bir hasar sonucu deri veya mukozadaki epitelyal tabakalarda görülen bozulma olarak tanımlanabilir. Yaralar genellikle akut ve kronik yaralar olarak sınıflandırılırlar [16, 17]. Akut yaralar kaza veya cerrahi müdahale sebebiyle aniden ortaya çıkan deri yaralanmalarıdır. Akut yaralar ciltteki epidermis ve dermis tabakasında oluşan hasarın alanına, derinliğine ve derecesine bağlı olarak yaklaşık 2-3 aylık bir zaman diliminde iyileşir [18, 19]. Kronik yaralar da ise durum farklıdır ve bu tip yaralar iyileşmenin normal adımlarını aşamaz. Böylece kronik yaralar düzenli bir şekilde ve zamanında onarılamaz [20, 21]. Yara iyileşmesi, dört tane adımdan oluşan dinamik ve karmaşık bir olaydır. İyileşme kısaca doku rejenerasyonu ve büyüme süreçlerinin bütünüdür. Bu adımlar sırasıyla, yaralanmadan hemen sonra olan pıhtılaşma ve hemostaz aşaması; bir süre sonra olan inflamatuar aşaması; yeni doku oluşumu ve vaskülarizasyonun olduğu proliferasyon aşaması ve oluşan yeni dokuların son halini aldığı olgunlaşma aşamasıdır [22-27]. Yara iyileşmesindeki bu aşamalar birbirleriyle uyumlu ve düzenli bir şekilde meydana gelir [28, 29]. Bu aşamaların düzgün bir şekilde olması çoğunlukla yaranın tipine [30], bununla ilişkili patolojik koşullara ve iyileşme sürecinde uygulanan pansumanda kullanılan ek malzemelerin tipine bağlıdır. Doku mühendisliğinin ilerlemesiyle birlikte günümüzde birçok yaraya yönelik farklı yara tedavi malzemeleri bulunmaktadır [31].

2.2 Yaranın İyileşmesi

Geçmişte yara tedavisi sadece yaranın üstünün kapatılmasına dayanmakta olup, yarayı kapatmak amacıyla kullanılan bu malzemeler nitelikli bir özelliğe sahip olmadığı için iyileşme sürecini kolaylaştıma ve hızlandırma konusunda oldukça etkisizlerdi. Ancak son yıllarda yara iyileşmesinde önemli rol oynayan moleküler ve hücresel süreçlerin daha iyi anlaşılması nedeniyle yara tedavi yöntemleri oldukça gelişmiştir. Buna bağlı olarak yara pansumanlarının tasarımı geliştirilmiş ve kullanılan malzemelerin fonksiyonu artmıştır [32].

Önceden de bahsedildiği gibi yaralar doğası ve özellikleri bakımından birbirine benzemez. Yaraların durumu kişinin sağlık durumu, ortam ve enfeksiyon olması gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu bağlamda sonuç olarak yara iyileşmesinde kullanılan pansuman malzeme ve yöntemleri büyük ölçüde yaranın türüne bağlıdır [33].

Bahsedilen özelliklerin çoğu, üretildikleri malzemelerin kendine özgü özelliklerine bağlıdır. Modern yara pansumanlarının kritik gereksinimleri arasında biyouyumluluk, sitotoksik etkinin olmaması, antijenik veya inflamatuar uyarının olmaması, yeni doku oluşum hızıyla doğrudan orantılı bir biyolojik parçalanabilirlik oranı, birleşik biyoaktif bileşenlerin (ilaçlar) salınması ve olası etkilerin kontrolü vb. etkenler yer alır [28, 34].

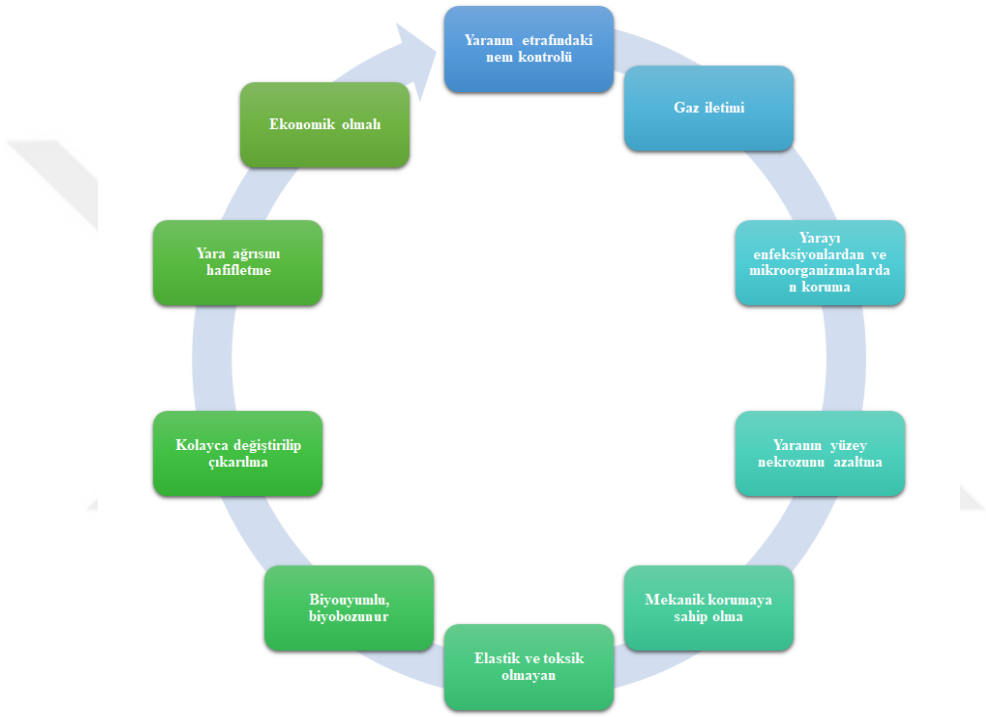
Özellikle yara pansumanları veya doku iskeleleri için gereken temel özelliklerden ikisi ise su içeriği ve su tutma özelliğidir. Kullanılan doku iskelelerinin fonksiyonları ise; yaranın hidrasyonunu korumak, eksudaları absorbe etmek ve hücresel dehidrasyonu önleyerek ve kollajen sentezini ve anjiyogenezi teşvik ederek iyileşme sürecini hızlandırmaktır [35]. İyileşme sürecinde nem kontrolünün olması iyileşme oranını arttırır, yarayı enfeksiyondan korur ve hastanın ağrısını azaltır [36].

2.3 Yara İyileşmesinde Yara Örtüsü

Günümüzde hala birçok insan farklı cilt yaralanmalarından sıkıntı çekmektedir. Bu da genellikle tedavi maliyetine ve hastalıklara bağlı olarak tedavide ölüme neden olmaktadır. Yara yoğunluğuna bakılmaksızın, profesyonel yara bakımı önerilerine göre derhal bakım yapılması çok önemlidir [37].

Yara üstünü fonksiyonsuz bir malzeme ile sadece örtmek ve yara örtüsü arasındaki fark önemsenmesi gereken bir faktır. Yara örtüleri, yaranın üzerine yerleştirilecek şekilde tasarlanmış olup bandajlar pansumanları doğru konumda tutmaktadır. 20. yüz yılda modern yara örtüleri üretilerek, yarayı nemlendirmek ve dolayısıyla onu korumak için tıkayıcı sargılar hazırlanmıştır. Oklüzif yara örtüleri, kolajen sentezine, daha hızlı reepitelizasyona, hipoksiye, yara yatağı pH'ını düşürmeye, bu da daha az enfeksiyona yol açmaya yardımcı olmuştur. Bilinen ilk modern yara örtüleri, nemli bir ortam sağlamak ve sıvıları emmek gibi temel özellikleri olan

malzemelerdi. Sentetik yara örtüleri hidrojeller, doku yapıştırıcıları, köpükler, buhar geçirgen filmler, aljinatlar ve silikon ağlar gibi farklı ürünlere genişletilmiştir. Pamuklu bandaj ve gazlı bez gibi klasik yara örtüleri yara üzerini oldukça kurutur. İyileşme oranının ve ağrının azalmasına neden olan nemin büyük bir bölümünü emer. Geleneksel bu malzemelere karşın, yara iyileşme sürecinde optimum koşulları sağlayabilen çoğunluğu polimer bazlı olan yenilikçi filmler, köpükler ve jeller üretilmiştir (Şekil 2.1) [38, 39].



Şekil 2.1 İdeal bir yara örtüsünde bulunması gereken özellikler [40].

2.3.1 Yara Örtülerinin Sınıflandırılması

Yara örtüleri geleneksel, biyomalzeme tabanlı, doku etkileşimli ve biyoaktif olarak dört başlık altında sınıflandırılabilir. Geleneksel yara örtüleri işlev olarak yarayı çevre ile temastan korumak ve kanamayı durdurmak gibi özelliklere sahiptir [38]. Geleneksel yara örtülerine örnek olarak tül ve tül-pamuk kompozitleri verilebilir. Bu malzemeler yüksek emme kapasitesine sahiptirler. Bunların yanı sıra bazı dezavantajları vardır. Düşük gaz geçişi sergilerler, çıkarılırken taze epitel dokuya zarar verebilirler ve dolayısıyla kanamaya neden olabilirler. Bu yara örtüsünde eksüda sızması da bakteriyel enfeksiyonlara neden olabilir [40, 41]. Biyomalzeme

bazlı yara örtüleri allogreftler, kesenograftler ve doku türevleri olarak sınıflandırılabilirler. Allogreftler, donörlerden elde edilirler ve bu yüzden kullanımları hastanın bağışıklığı ile sınırlıdır. Bu greftler vücut tarafından immün redde uğrayabilmektedir. Dahası enfeksiyon ve hastalık bulaşma riski de oldukça yüksektir. Doku türevleri olan biyomalzemeler kolajenden elde edilir. Ancak uzun süreli kullanımda enfeksiyon riskinin artması ihtimali nedeniyle kullanımları sınırlıdır [42].

Doku etkileşimli yara örtüleri olarak da bilinen yapay pansumanlar, jeller, köpükler, filmler, sprey, kompozitler vb. olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.2). Bu malzemeler polimerik tabanlıdırlar. Kullanılan polimerik malzemeler canlı türevi ise biyopolimer, canlı olmayan bir kaynaktan elde edildiyse sentetik polimer olarak adlandırılır. Doku mühendisliğinde en çok kullanılan biyopolimerlere örnek olarak aljinat, kitosan, selüloz, hyaluronik asit, kolajen ve jelatin verilebilir. Biyoaktif yara örtüleri ise hızlandırılmış yara iyileşmesi için büyüme faktörleri ve antimikrobiyal ajanlar gibi bileşenlerden meydana gelir. Biyoaktif yara örtülerinin üretiminde kullanılan ana malzemelere ise aljinatlar, kolajenler, hidrofiberler ve hidrokolloidler örnek olarak verilebilir [43].



Şekil 2.2 Yara örtülerinin sınıflandırılması [44].

2.3.2 Yara Örtüsünde Kullanılan Malzemeler

Yara iyileşmesinde kullanılan biyomalzemeler kaynaklarına, kimyasal yapılarına, yara örtüsü tipine veya uygulamaya bağlı olarak farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Açıklama kolaylığı sağlamak için, sentetik ve doğal biyomalzemeler için genel bir sınıflandırma yapılmaktadır [45, 46]. Sentetik biyomalzemeler genellikle organik ve inorganik polimerleri içerir. Doğal biyomalzemeler ise sırasıyla hem polisakkaritleri hem de proteinleri birleştiren polisakkaritlere, proteinlere veya makromoleküllere bölünebilen biyolojik ürünleri içermektedir. Doğal

biyomalzemelerin elde edilmesi için kaynak olarak hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve bakteriler kullanılmaktadır. Bir örnek olarak, memeli bir hayvandan alınan karaciğer dokusu hücresizleştirildikten sonra doğal biyomalzeme olarak kullanılabilir [47]. Biyomalzemeler, özellikle bir konakçı reaksiyonu indükleme açısından çok farklı davranırlar, ancak bu moleküllerin bileşimi ve yapısının mühendisliği yoluyla, immünojenisite, esneklik, mekanik güç, elastikiyet gibi birçok özellik ve bozulma oranı kontrol edilebilmektedir. Yara örtüleri biyopolimerlerden, sentetik ve doğal biyomalzemelerden üretilebilmektedir (Tablo 2.1). Kitosan, aljinat, hyaluronik asit gibi biyopolimerler toksik ve immünojenik değildir, kolayca elde edilebilirler, biyobozunur ve biyouyumludurlar [45].

Deri doku mühendisliği iskeleleri özellik olarak hücrelerin çoğaldığı, göç ettiği, farklılaştığı matrislerdir. Bu iskeleler insan derisine benzer işlevlere sahip yeni doku oluşumuna yol açan malzemelerdir [48]. İdeal bir doku iskelesinin belirli tasarım kriterlerini karşılaması gerekir. Doku iskeleleri ekstrasellüler matris rejenerasyonu için bir alan sağlamak, besinlerin ve atıkların hücrelere ve hücrelerden difüzyonuna izin vermek gibi özelliklere sahip olmalıdır. Bu özelliklerin karşılanması için doku iskelelerinin yeterli miktarda gözenekliliğe sahip olması gerekir. Bu açıdan gözenek boyutu da oldukça önemlidir. Gözenek boyutu farklı dokular için farklılık göstermektedir. Ama genel bir tabirle gözenek boyutları hücre yapışmasına ve çoğalmasına izin verecek kadar büyük, hücrelerin etkili bağlanmasına izin verecek kadar yüzay alanı sağlaması için de yeteri kadar küçük olmalıdır. Doku iskeleleri beklenildiği üzere biyouyumlu olmalı ve biyodegredasyon sonucu ortaya çıkan ürünler hücreler için toksik etki yaratmamalıdır. Hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için ekstraselüler matriks gibi destek sağladıktan sonra bozunmalıdır ve yerini orjinal dokuya bırakmalıdır [49]. Hücre infiltrasyonuna ve vaskülarizasyona izin verecek şekilde mekanik bütünlüğe sahip olmalıdır. Gözenekliliği yüksek olan bir iskele bulunduğu yerde aşırı bir şekilde şişebilir ve zayıf mekanik özelliklere sahip olabilir. Ayrıca hücre-hücre temasına ve hücre göçüne izin vererek iyi bir arayüz uyumu sağlamalıdır [50].

Tablo 2.1 Yara örtüsünde kullanılan doğal polimerler [45].

Doğal Polimer	Kaynak	Özellikleri
Nişasta	Bitki (ör. Mısır, pirinç, patates ve buğday)	Nişasta biyopolimeri jel ve film oluşturabilir. Bu nedenle hemostatik ajan olarak kullanılabilir. Çapraz bağlanarak daha iyi mekanik özellikler sağlar.
Selüloz	Bitki materyalleri (pamuk, odun, saman vb.), Bakteriler (*Asetobakter ksilinyum*)	Selüloz farklı türevlere dönüştürülebilir (karboksi metil selüloz, selüloz nitrat, selüloz asetat, selüloz ksantat)
Aljinat	Kahverengi algler (Phaeophyceae, esas olarak Laminaria), mikrobiyal (bakteri, *Pseudomonas mendocina*)	Aljinat, iyi jel oluşturucu ve film oluşturucu özelliklere sahiptir. Kalsiyum aljinat esas olarak yara örtüsü üretiminde kullanılır.
Agar	Kırmızı algler Rhodophyceae (*Gelidium* ve *Gracilaria* spp)	Termal tersinirlik özelliğine sahip agaroz bazlı jeller üretilir.
Kitosan	Kabukluların dış iskeleti (yengeç, kerevit), mantar hücre duvarları	Kitosan, hafif asidik ortamda çözünebilen biyoaktif bir üründür. Fibroblast proliferasyonunu başlatan ve yara iyileşme sürecinde kollajen birikmesine yardımcı olur.
Dekstran	Mikrobiyal (bakteri *Leuconostoc mesenteroides*)	Hem suda hem de organik çözücülerde çözünür.
Jelatin	Bakteriler (*Sphingomonas elodea*)	Isıtıldığında erir ve tekrar soğutulduğunda katılaşır. Suda çözünür ve yarı kolloidal, yumuşak, elastik, şeffaf ve esnek bir jel oluşturur.
Arabinogalactan (karaçam sakızı)	Bitki (batı karaçam *Larix occidentalis*'ten elde edilir)	Bu polimer, suda oldukça çözünür olan, oldukça dallı bir polisakkarittir.
Kolajen	Cilt ve diğer kas-iskelet dokularının ana bileşeni (İnsan vücudunda bulunan en bol protein)	Kolajen, üçlü sarmal alanlara sahip 3 polipeptit zincirinden oluşur. Pıhtılaşma sürecinin birincil başlatıcılarından biridir ve yüksek trombojenisitesi, hemostatik bir ajan olarak yara pansumanında anahtar rol oynar.
Hyaluronik asit (Hyaluronan)	ECM'nin bağ dokularındaki ana parçası	Önemli bir ECM bileşenidir. Potansiyel olarak daha az antijeniktir ve bu önemli özellik, bir yara dolgu macunu olarak kullanılmasına izin verir. HA'nın iyileşme sürecinde hücre proliferasyonuna ve farklılaşmasına aktif olarak dahil olduğu bildirilmektedir.

2.3.2.1 Aljinat

Aljinat polimeri doğal kaynaklı, biyouyumlu ve toksik olmama gibi olumlu özellikleri sebebiyle çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılan bir biyopolimerdir. Geçmişten günümüze özellikle yara tedavisi uygulamalarında özellikle kullanılmıştır. Yara iyileşmesi için optimum özellikleri sağlayacak şekilde modifiye edilebilir [51, 52]. Aljinat, hidrojeller, filmler, köpükler, nano elyaflar gibi yara sargıları için ve topikal formülasyonlarda farklı formlarda malzemeler hazırlamak için kullanılmaktadır. Aljinat bazlı yara örtüleri fazla olan yara sıvısını emebilir, fizyolojik olarak nemli bir ortam sağlayabilir ve yara bölgesindeki bakteriyel enfeksiyon ihtimalini azaltabilir. Bu yara örtülerinin terapötik etkinliği, aljinatla kompozit halinde kullanılan diğer polimerlerin varlığından, kullanılan çapraz bağlayıcıların kimyasından, çapraz bağlayıcı muamele süresinden, kullanılan nanopartiküllerden ve antibakteriyel maddelerden etkilenir [53].

Aljinat bazlı hidrojel bileşenlerini yara enfeksiyonlarına karşı yapmak için bir strateji geliştirmek, bahsedilen yaraların iyileştirilmesi ve ardından biyofilm oluşturan bakteri kolonizasyonunun ortadan kaldırılması için umut verici niteliktedir [54]. Aljinat bazlı bir hidrojelin yapımı ve bahsedilen bileşenin yerel merhem olarak iyileştirici aktivitelerinin değerlendirilmesi, günümüzdeki mevcut çalışmaların ana hedeflerindendir [53].

Hemostatik etkiye sahip jel oluşturucu bir materyal olan aljinat, 1987'den beri jel oluşturucu ve dehidrasyonu önleyici özellikleri nedeniyle hızlı yara iyileştirici bir ajan olarak bilinmektedir [54]. Kalsiyum aljinat pansuman yara fazlalıklarını emecek ve yapışkan olmayan bir jel oluşturmaktadır. Bu madde nemli bir ortam sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırır, debridmanı kolaylaştırır, yara yatağına ve çevresindeki deriye travmanın önlenmesine yardımcı olur [55].

2.3.2.2 Kolajen

Son yıllarda kalsiyum aljinat, hidrokolloid membranlar ve ince gözenekli gazlı bez gibi farklı ve yeni yara tedavi malzemeleri geliştirilmiştir. Ancak bu malzemeler bakteri geçirgen olabilme gibi bir dezavantaja sahiptirler. Bu dezavantaja karşılık kolajen bazlı yara örtüleri ise yara yüzeyi ile çevresi arasında en fizyolojik arayüzü oluşturur ve bakteri geçirimsizdir [56]. Kolajen bazlı yara örtüleri uygulama kolaylığı ve doğal olması, immünojenik olmaması, pirojenik olmaması,

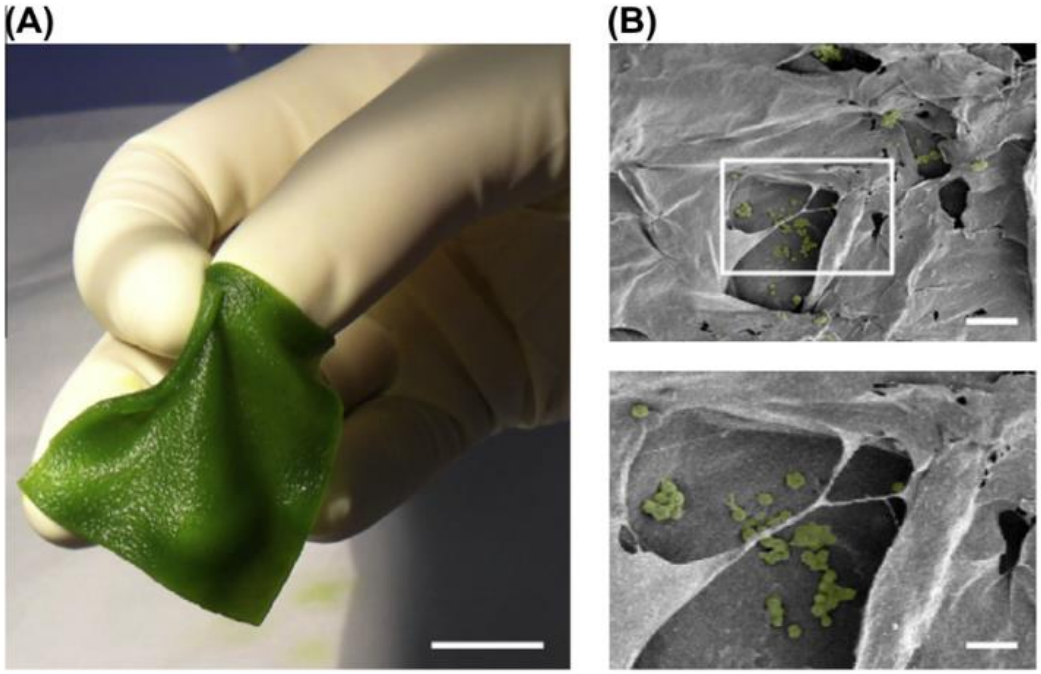
hipoalerjenik ve ağrısız olması gibi özelliklerinden dolayı diğer klasik yara örtülerine göre bir çok avantajı vardır [57,58].

Kolajen bazlı yara örtülerinin kullanımının metalloproteinazların etkisini inhibe ettiği bilinmektedir [59]. Kolajen, yaralı bölgede yeni oluşmuş liflerin ve granülasyon dokusunun birikmesi ve düzenlenmesi yoluyla yara iyileşmesini teşvik eden ve böylece yara iyileşmesi için iyi bir ortam oluşturan bir doğal biyomalzemedir [60]. Kolajen malzemesi bir yaraya uygulandığında anjiyogenezi teşvik eder ve aynı zamanda vücudun onarım mekanizmalarını da güçlendirir [56,57]. Bunlar, mekanik destek görevi görürken, kolaylaştırmanın yanı sıra yara bölgesinden ödem ve sıvı kaybını azaltır. Fibroblastların yaraya göç etmesini ve granülasyon dokusunun metabolik aktivitesini artırmasını sağlar [56,61,62]. Uygulaması kolaydır ve kanamayı durdurma özelliğine sahiptir [63].

2.3.3 Yara Tedavisinde Mikroalglerin Kullanımı

Mikroalgler biyoteknoloji alanında büyük ilgi görmektedir: Güneş enerjisinden yararlanarak karbondioksiti dönüştürürler ve biyoyakıtlar [64] gibi değerli metabolitler ve gıda, kozmetik ve farmasötik ürünlerde kullanıma yönelik maddeler üretebilirler; ikincisi antiinflamatuar, antimikrobiyal ve/veya antitümör özelliklere sahip bileşikleri içerir [65]. Fotoototrofik mikroalglerin bir diğer önemli uygulaması biyofiltrasyondur, yani besinlerin, ağır metallerin ve endüstriyel kirleticilerin atık sudan uzaklaştırılmasıdır [66, 67]. Ayrıca, mikroalgler çeşitli kirletici maddelere karşı duyarlı olduğundan, su ortamı kalitesinin değerlendirilmesi için biyosensörlerin tasarlanmasında kullanılmıştır [66, 68].

Tıpta, hücre nakline dayalı rejeneratif tedavilerin önemli bir sınırlaması, vaskülarizasyon eksikliğinden kaynaklanan yetersiz (veya eksik) oksijen tedariğidir. Bu sınırlamayı aşan yeni terapötik kavramların geliştirilmesi için mikroalglerin fotosentetik oksijen üretiminden yararlanmaya yönelik girişimler vardır (Şekil 2.3). Yapılan ilk çalışmalardan birinde aljinat tanecikleri içinde pankreatik adacıkların ve alglerin birlikte kapsüllenmesi sağlanmıştır. Böylece harici başka bir oksijen kaynağı olmadığında izole edilmiş insan hücrelerine mikroalg bazlı fotosentetik oksijen sağlanmasının insan hücreleri üzerinde olumlu etkileri olmuştur [69, 70].



Şekil 2.3 a)Mikroalglerin kolajen bir iskeleye ekilmesi. b)SEM analizi ile ekilen hücrelerin homojen dağılımının görüntülenmesi [1].

2.3.3.1 Mikroalgler ve Özellikleri

Mikroalgler gözle görülemeyen mikroorganizmalardır. Genelde tatlı su ve denizlerde yaşarlar. Tek hücrelidirler, tek tek, zincirler halinde veya gruplar halinde bulunurlar. Türlere bağlı olarak boyutları birkaç mikrometre (μm) ile birkaç yüz mikrometre arasında değişebilir. Fotosentez yapabilen mikroalgler yeryüzündeki yaşam dögüsü için oldukça önemlidir. Atmosferik oksijenin yaklaşık yarısını üretirler ve aynı anda sera gazı karbondioksiti kullanarak fotootrofik olarak büyürler. Mikroalgler, bakterilerle birlikte besin ağının temelini oluşturur ve bütün üst seviyeler için enerji sağlarlar [71].

Mikroalglerin biyolojik çeşitliliği çok geniştir. Yaklaşık 50.000 türün tanımlandığı birçok farklı cins içinde yaklaşık 200.000-800.000 türün bulunduğu tahmin edilmektedir. Dahası, mikroalg biyokütlesinden elde edilen 15.000'den fazla yeni bileşik belirlenmiştir. Bu bileşikler arasında karotenoidler, antioksidanlar, yağ asitleri, enzimler, polimerler, peptidler, toksinler ve steroller bulunmaktadır [71, 72].

Mikroalg türleri büyüme hızı, üretkenlik, besin, ışık gereksinimi ve olumsuz koşullara uyum sağlama yeteneği açısından büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle genellikle mikroalglerin toplu üretilmesinin ilk adımı, belirli amaçlar ve üretme sistemleri için doğru türleri ve suşları bulmaktır. Tipik türler arasında *Chlamydomonas reinhardtii, Dunaliella salina* ve çeşitli *Chlorella* türleri ile *Botryococcus braunii* bulunur. Diğer önemli alg grupları arasında *Phaeodactylum tricornutum, Thalassiosira pseudonana, Nannochloropsis ve Isochrysis spp.* yer almaktadır [73].

Mikroalgler proteinler, polisakkaritler, lipitler, çoklu doymamış yağ asitleri, vitaminler, pigmentler, fikobiliproteinler, enzimler vb. gibi bol miktarda biyoaktif bileşikler üreten fotosentetik mikroorganizmalardır. Mikroalgal biyokütle, potansiyel ve sürdürülebilir bir biyoürün tedariki üretmek için biyoaktif bileşikleri kullanarak farklı kullanım alanlarında birçok fayda sağlar. Bu nedenle biyoteknoloji ilerledikçe mikroalglerle ilgili araştırmalar da sürekli artmaktadır [74]. Doğal, güvenli ve yenilenebilir bir kaynak olan mikroalgal biyoaktif bileşikler, potansiyel terapötik özelliklerinden dolayı ilaç üretim ham maddesi olarak kullanılması araştırma konusu olmuştur [75, 76]. Bu biyoaktif bileşikler anti-mikrobiyal, antioksidan, anti-inflamatuar, nöroprotektif ve anti-kanser özellilkler gösterir [77, 78, 79] ve ayrıca yük taşıma, yara iyileştirme ve diğer özelliklere de sahiptirler [80].

2.3.3.2 Kutup Mikroalgleri

Dünya'daki biyokütlenin büyük çoğunluğu, büyük ölçüde deniz olmak üzere düşük ılıman ortamlarda bulunur [81]. Büyük ölçüde aşağıdan yukarıya doğru kontrol edilen kutupsal besin ağının temelini oluşturan kutupsal mikroalgler, aşırı ve salınımlı kutupsal çevre değişimlerine başarılı bir şekilde uyum sağlamıştır. Dondurucu sıcaklıklara ek olarak bu soğuk ortamlar güneş enerjisi, ozmotik, oksidatif ve besin stresi dahil olmak üzere bir dizi başka çevresel zorluğu barındırmaktadır [82, 83, 84]. Kutupsal mikroalglerin ana nişlerinden biri olan deniz buzunun geçici doğası, onu dünyadaki aşırı ortamların en dinamiklerinden biri haline getiriyor. Yarı kapalı deniz buzu habitatı içerisinde çok küçük ölçekte birbiriyle etkileşime giren, sürekli olarak güçlü ve değişken çevre koşullarına uyum sağlayan çok çeşitli organizmalar topluluğunu barındırır [85]. Kutupsal mikroalglerin metabolizmasını ve topluluk yapısını yönlendiren moleküler

mekanizmalar hakkındaki anlayışımızdaki ilerlemeler sayesinde bilim insanları kutupsal mikroalglerin mevcut ve gelecekteki biyojeokimyasal girdilerini ve niş uyarlanabilirliğini daha iyi tahmin edebilecektir [86].

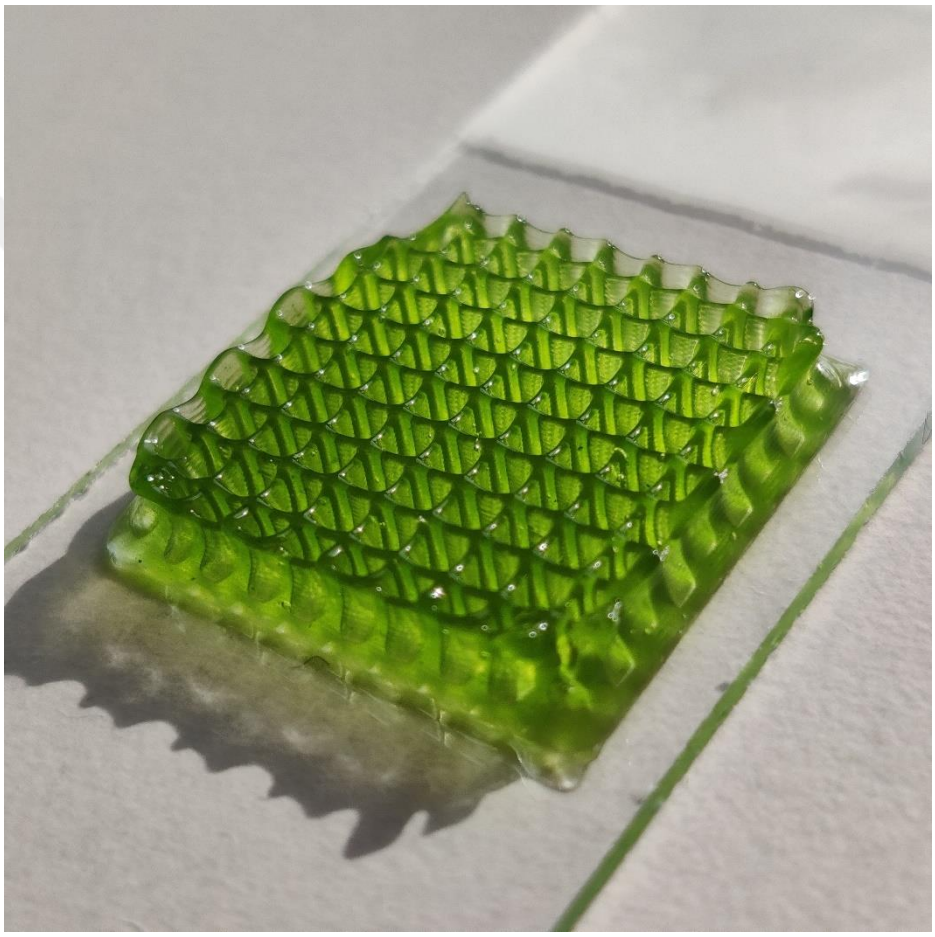
Polar mikroorganizmalar zorlu çevre koşullarına uyum sağlamak için hücre zarının yapısını ve fonksiyonunu değiştirir, çeşitli modifikasyonlar yapmalarına izin verir ve fizyolojik olarak aktif maddeler üretirler. Kutup mikroalgleri, diğer bölgelerdeki mikroalglere nazaran daha fazla biyoaktif molekül üretebilme yeteneğine sahiptir. Ürettikleri bu biyoaktif moleküller doku mühendisliği alanında tedavi amaçlı kullanılabilir. Bu özellikler sayesinde kutup mikroalgleri yara iyileşmesinde kullanılacak yara örtüleri için potansiyel canlılar olabilirler [87].

2.4 Mikroalg Yüklü Yara Örtülerinin 3B Yazıcı ile Üretimi

Tıpta hücre transplantasyonuna dayalı rejeneratif tedavilerin önemli bir sorunu vaskülarizasyon eksikliğinden kaynaklanan hücrelere yeterli oksijen sağlanamamasıdır. Bu sorunun üstesinden gelmek amacıyla mikroalglerin fotosentetik oksijen üretiminden yararlanılmıştır. Bu alanda ilk girişimler aljinat boncuklarda pankreas adacıklarının ve alglerin birlikte kapsüllenmesi üzerine deneyler olmuş ve başarı elde edilmiştir [4]. Daha yakın zamanlarda, Hopfner ve arkadaşları in vitro doku mühendisliği için alg yüklü ve memeli hücrelerinden oluşan yapı iskelelerinden kültür oluşturmuşlardır. Ayrıca yine benzer bir çalışmada bir fare üzerinde yapılan in vivo deneylerde, implante edilen alg yüklü doku iskelesinin bölgede vaskülarizasyonu artırdığı gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada bir mikroalg olan *Chlamydomonas reinhardtii* ile dermal onarım için ticari kolajen bazlı bir membran kullanılmıştır [1].

Son zamanlarda, biyomedikal uygulamalar için yeni ortak kültür yapıları geliştirmek için mikroalg ve memeli hücrelerinin kombinasyonu içeren yapıların üretimi için 3B biyobaskı yöntemi kullanılmıştır (Şekil 2.4). Burada memeli hücrelerinin yakınında yetiştirilen mikroalgler, yerinde oksijen tedarikini artırarak hücrelerin büyümelerini ve işlevlerini destekleyebileceklerdir [88]. Doku mühendisliği uygulamalarında hücreler uygun bir jel matrisinde düşük yoğunluklarda basılabilir ve daha sonra daha yüksek yoğunluklara çoğalmalarına ve muhtemelen ilk matrisin yerini almalarına izin verilebilir. Bu durumda, oksijen, glikoz ve diğer besinler için hücre gereksinimleri, ince bir jel tabakası içinden

difüzyon ile sağlanabilir. Hücreler 100 mikrometre ile 1 mm arasındaki derinliklerde yaşayabilir. Alternatif olarak hücreler, dokudaki hücre sayısıyla karşılaştırılabilir oranda yüksek yoğunluklarda basılabilir, ancak bu durumda hücreleri beslemek için bir tür vasküler sistemin hızla gelişmesi gerekir [89]. Yakın çevrede kültürlenen memeli dokularına oksijen sağlamak için mikroalg yüklü hidrojel yapılarının üretilmesi için yakın zamanda 3B baskı yöntemi kullanılmıştır [11].

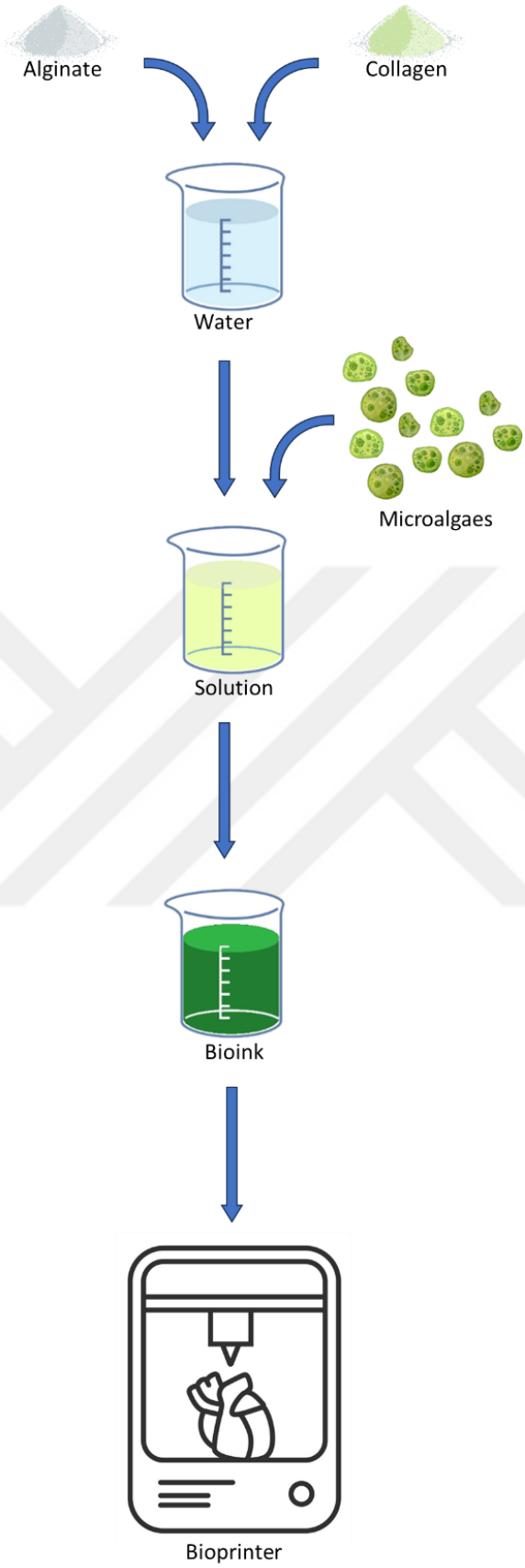


Şekil 2.4 3B Biyobaskı sonrası mikroalg yüklü doku iskelesi.

Biyolojik baskı teknikleri arasında ekstrüzyon tabanlı biyo baskı, mürekkep püskürtmeli baskı ve farklı birçok baskı teknikleri bulunmaktadır. Ekstrüzyon temelli biyo-baskının kullanım kolaylığı, kullanılabilirlik ve çok çeşitli biyomateryaller ile uyumluluk gibi birçok avantajı vardır. Pnömatik ekstrüzyon tabanlı biyo-baskıda, biyomürekkep (çoğunlukla canlı hücre içerikli hidrojel tabanlı malzeme) ilk olarak ekstrüzyon şırıngasına yüklenir. Bir yapıyı yazdırmak için

biyomürekkep, itici güç olarak sıkıştırılmış hava kullanılarak iğneden ekstrüde edilir. Oluşturulacak yapı baskı platformuna yerleştirilen bir hücre kültürü tabağına basılır [8]. 3B baskı için hidrojel tabanlı biyomürekkep geliştirme zorlu bir görevdir. 3B baskı için uygun bir biyo mürekkebin; (1) basılan hatların 3B şekillerini korumak için yeterli viskoziteye, (2) basılı malzemenin katı yüzeye yayılmasını veya sıvı içinde difüzyonunu en aza indirmek için hızlı jelleşmeye, (3) jelleşme sonrası basılı yapının çökmesini önlemek için yeterli mekanik sertliğe sahip olması gerekir [11].

Mikroalglerin 3B baskı ile immobilizasyonu için konakçı matrisler olarak çeşitli materyaller incelenmiştir (Şekil 2.5). Doğal protein bazlı hidrojel malzemeler (örneğin jelatin, kolajen) biyo uyumludur, zayıf mekanik özelliklere sahiptir ve maliyetlidir ancak in vivo uygulamalar için en uygun malzemeler arasında yazılabilirler. Şu anda en yaygın kullanılan substratlar olan doğal polisakkarit hidrojeller (örneğin, agar / agaroz, karragenan, aljinat), düşük maliyet ve görece sağlam mekanik özellikler dahil olmak üzere önemli avantajlar sergilemektedir [11]. Krujatz ve arkadaşları tarafından yapılan son çalışmalarda, 3B baskılı aljinat hidrojel matrislerinde immobilize mikroalgler için farklı kültür koşulları (sıcaklık ve aydınlatma) incelenmiş ve optimum olmayan koşullar altında bile yüksek alg canlılığı ve büyüme oranı elde edilmiştir [9].

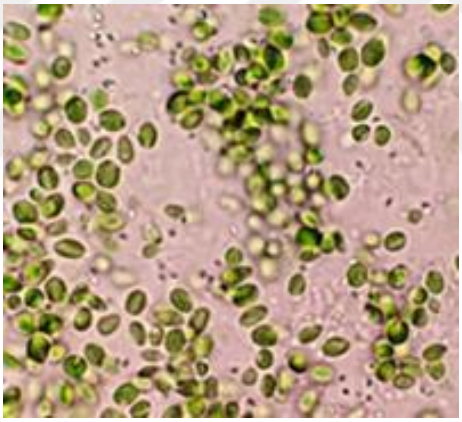


Şekil 2.5 Mikroalg yüklü doku iskelesi üretiminin şematik gösterimi.

3
DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Mikroalg

Tez çalışmasında kullanılan kutup mikroalgi, III. Ulusal Antarktika Bilim Seferi ile getirilen örneklerden YTÜ Biyomühendislik Bölümü-Algal Biyoteknoloji ve Biyoproses Laboratuvarında izole edilip, tanımlanan ve isimlendirilen *Chlorella variabilis* YTU.ANTARCTIC.001 mikroalgidir (Şekil 3.1) [90-91]. Kalsiyum klorür, sodyum aljinat ve asetik asit, Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Tip I kolajen, sığır derisinden elde edilmiş ve gıdada kullanılabilir kolajen üreten Kazlıçeşme Ar-Ge Merkezi ve Test Laboratuvarı'ndan alınmıştır. Mikroalg kültürlerinin inkübasyonunda BG-11 ortamı kullanılmıştır.



Şekil 3.1 *Chlorella variabilis* YTU.ANTARCTIC. 001 optik mikroskop görüntüsü (x100).

3.2 Malzemelerin Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda temel olarak biyomürekkep denilen polimer çözeltisi ve hücre karışımları kullanılmıştır. Bu çalışmada aljinat ve kolajen polimer çözeltileri kullanılmıştır. Ayrıca baskı sonrasında oluşturulan aljinat ve kolajen kompoziti yapıların çapraz bağlanarak jelleştirilmesi için de aljinat polimeri için çapraz bağlayıcı ajan olan Kalsiyum Klorür Dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) çözeltisi

kullanılmıştır. Malzeme hazırlanışı, biyomürekkep hazırlanışı ve kalsiyum klorür çözeltisi hazırlanması olarak iki aşamadan oluşmaktadır.

3.2.1 Biyomürekkebin Hazırlanması

3B baskıya yönelik kompozit bir hidrojel formülasyonu hazırlamak için farklı polimer oranları incelenmiştir (Tablo 3.1). Öncelikle 0.35 g aljinatın 10 mL distile su içerisinde çözülmesiyle %3.5 (ağırlık/hacim oranında) konsantrasyonunda aljinat çözeltisi hazırlandı ve buna göre değişen miktarlarda kollajen (Col %5, %10 ve %15) eklendi. Her numune, tam çözünmeyi sağlamak için 50 °C'de 2 saat boyunca 800 rpm'de karıştırıldı.

Tablo 3.1 Farklı içerikteki biyomürekkeplerin konsantrasyon değerleri.

No	Aljinat (% w/v)	Kolajen (% w/v)
1	3,5	5
2	3,5	10
3	3,5	15

Basılabilirlik testi için farklı konsantrasyondaki çözeltiler kullanıldı ve ardından 3B biyobaskı için en iyi basılan çözelti seçildi. Son olarak en iyi çözelti, sterilizasyonun sağlanması için 15 dakika boyunca UV ışığına maruz bırakıldı. Sterilizasyondan sonra BG11-alg çözeltisindeki alg hücreleri, aljinat-kollajen çözeltisine ilave edildi. Alg hücrelerinin eklenmesi bir mikropipet yardımıyla gerçekleştirildi. Ekleme biyogüvenlik kabininde yapıldı. Biyomürekkepteki alg hücresi konsantrasyonu, mililitre biyomürekkep başına 150.000 hücre olacak şekilde ayarlandı.

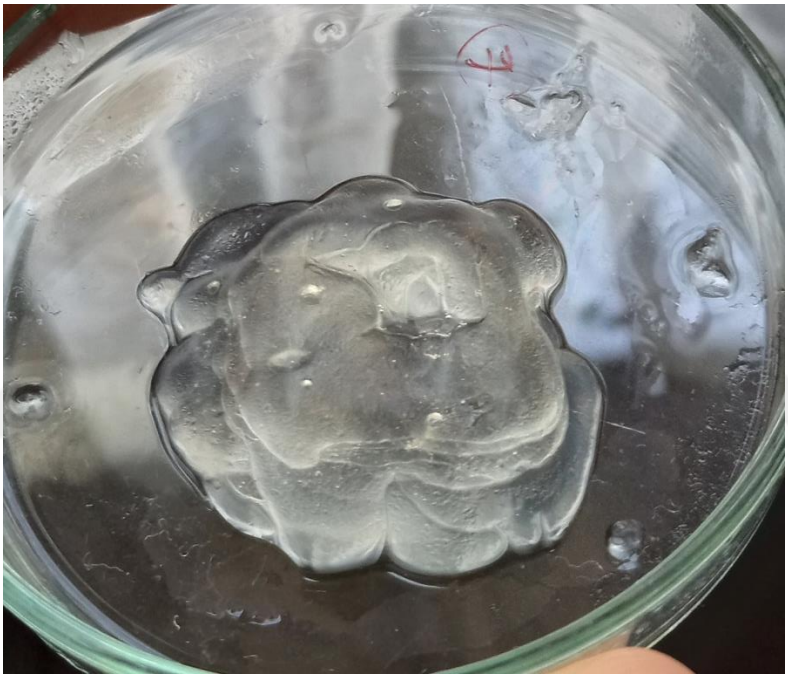
3.2.2 Kalsiyum Klorür Çözeltisinin Hazırlanması

Hidrojel oluşturmak için aljinatın çapraz bağlayıcısı olan Kalsiyum Klorür Dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) çözeltisi kullanıldı. % 2 ’lik (ağırlık/hacim) çözelti hazırlanması için 4 g toz $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ tartıldı ve 200 ml suda 10 dakika boyunca çözüldü ve kullanıma

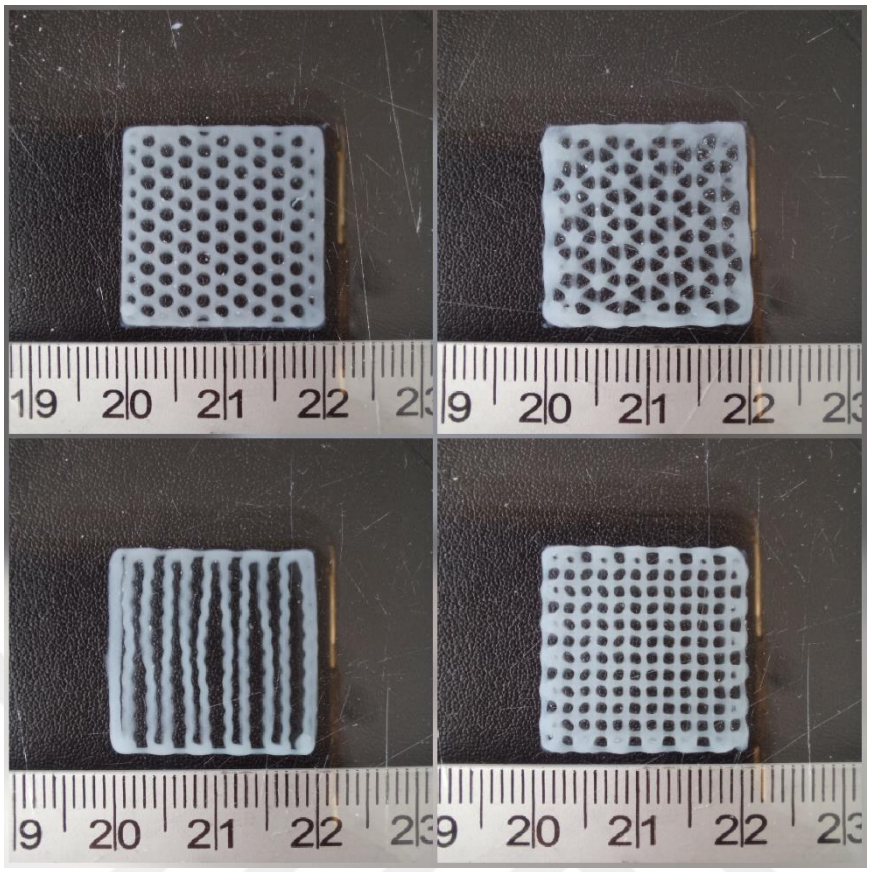
hazır hale getirildi. Sonrasında hazırlanan çözelti soğutucuda 4°C'de kullanıma kadar saklandı.

3.3 3B Yazıcı ile Basılabilirlik Testi

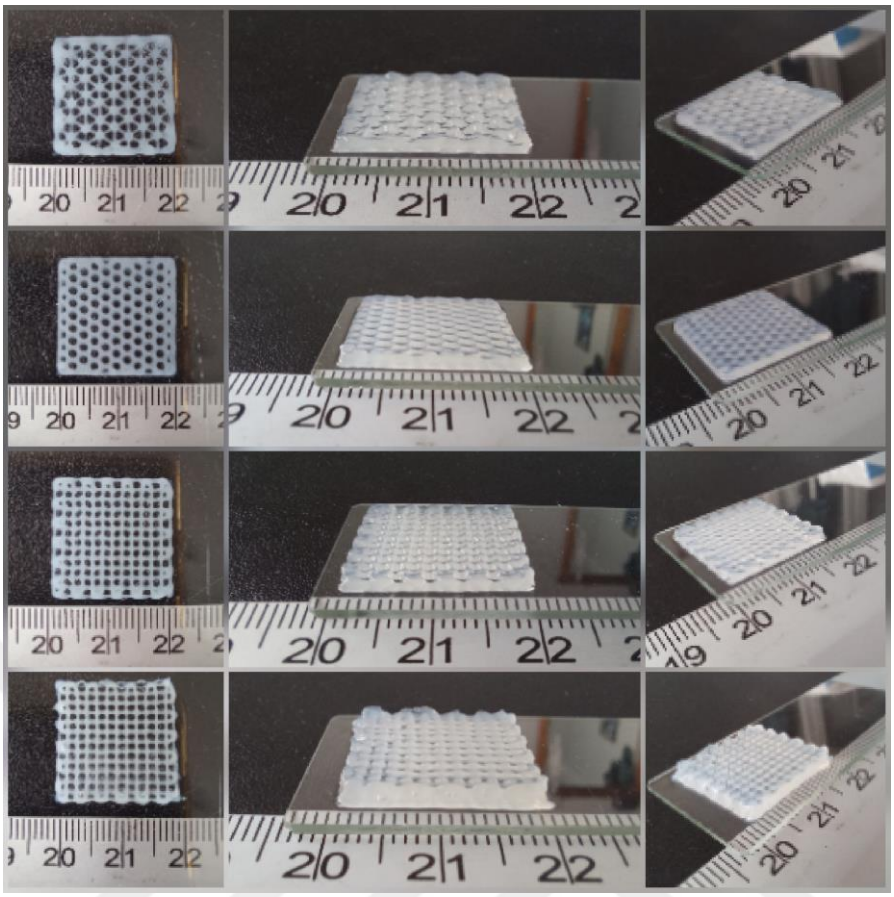
En iyi basılabilir biyomürekkepleri bulmak için farklı aljinat-kollajen çözeltileri 3B biyoyazıcıda basıldı ve görsel olarak analiz edildi. Baskı sonrasında iskeleler 100 mM kalsiyum klorür çözeltisi ile 10 dakika boyunca çapraz bağlandı ve bu sonuçlar incelenerek fotoğraflandı.



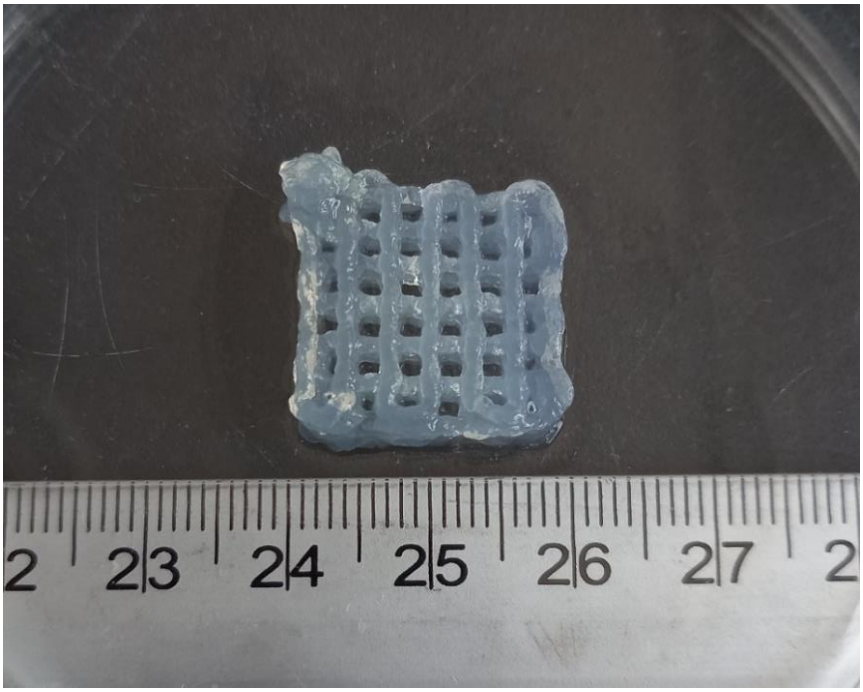
Şekil 3.2 Col %5 malzemesinin basılabilirlik testi.



Şekil 3.3 Farklı dolgu tipine sahip Col %10 malzemesinin basılabilirlik testi.



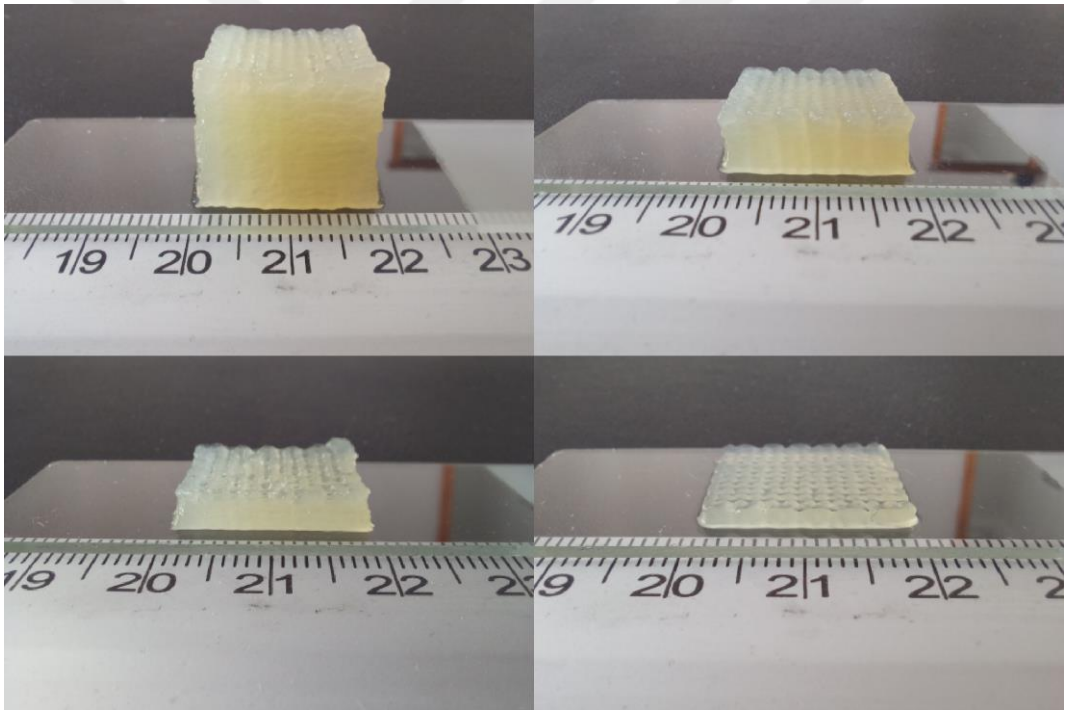
Şekil 3.4 Farklı dolgu tipi ve katman sayısına sahip Col %10 malzemesinin basılabilirlik testi.



Şekil 3.5 Col %15 malzemesinin basılabilirlik testi.

3.4 Mikroalg Yüklü Yara Örtülerinin 3B Biyobaskı ile Üretilmesi

İskelelerin 3 boyutlu biyobaskıları Cellink BIOX 3B biyoyazıcı ile gerçekleştirildi. Hazırlanan biyomürekkep 3 ml'lik bir kartuşa yüklendi. Baskı için ise 24G metal iğne (veya plastik nozül) kullanıldı. 3B baskılı iskeleler 20mmx20mmx2mm boyutlarında basit yapılardı (Şekil 3.6). Baskı katmanı yüksekliği 0,2 mm idi ve iskeleler 10 katman sayısına sahipti. Ortam sıcaklığı 25 °C'idi. Yazdırma hızı 10 mm/s ve basınç 50 kPa idi. Her numune 0.6-0.7 ml hacimde ve 6-7x10^5 hücreye içeriğindeydi. 3B biyobaskı işleminin ardından iskeleler 100 mM kalsiyum klorür ile 10 dakika boyunca çapraz bağlanarak inkübe edildi ve ileri testler yapıldı.



Şekil 3.6 Çapraz bağlanma sonrası farklı katman sayısına sahip mikroalg yüklü doku iskeleleri.

3.5 Doku İskelelerinin İnkübasyonu ve Yapılan Ölçümler

Biyobaskılı mikroalg yüklü iskeleler, LED ampullerle aydınlatma altında (ışık yoğunluğu 8000 lux.) 25 ℃ sıcaklıkta BG11 ortamında inkübe edildi. Her numune BG11 ortamıyla dolu 50 ml'lik beherde inkübe edildi ve her beher parafilm ile

kaplandı ve parafilmin üst kısmı gaz transferi için delindi. İnkübasyon süresi boyunca ortam üç günde bir taze ortamla değiştirildi. Ortamı değiştirmeden önce kontrol amacıyla her numune için pH ölçüldü.

3.5.1 Mikroalg Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Mikroalglerin büyümesi, farklı zaman noktalarında bir UV-Vis Spektrofotometresi (PG 60 Instrument) ile 680 nm'de OD ölçülerek değerlendirildi. Absorbans ölçümü yapılmadan önce alg yüklü iskeleler yeni bir behere aktarılarak üzerlerine %1.5 NaCl çözeltisi döküldü ve parçalanması için karıştırıldı. İskelelerin bozulmasından sonra, algleri aljinat, kollajen ve tuz gibi diğer çözünmüş bileşenlerden ayırmak için numuneler soğutmalı santrifüj kullanılarak 5000 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra alg peleti, 10 ml damıtılmış su ile yeniden süspanse edildi ve alg hücre yoğunluğu UV-Vis Spektrofotometresi ile ölçüldü.

3.5.2 Suda Çözünmüş Oksijen Konsantrasyonunun Ölçülmesi

İnkübasyon süresi boyunca mikroalglerin fotosentez sayesinde ürettiği suda çözünmüş oksijen konsantrasyonu, çözünmüş oksijen probu kullanılarak ölçüldü. Beher içerisinde sulu ortamda inkübe edilen iskeleler için oksijen ölçümü 1, 4, 7, 10, 14 ve 16. günlerde prob kullanılarak ölçüldü. Oksijen miktarı mg/L şeklinde tayin edildi. Her ölçüm sonrası prob saf su ile yıkandı ve ölçümler üçlü tekrarlar halinde gerçekleştirildi.

3.5.3 β-Karoten ve Klorofil-α Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Mikroalg türlerinin pigment konsantrasyonları belirlemek için tüp içerisine 5 mL sıvı mikroalg süspansiyonu alınarak soğutmalı santrifüj kullanılarak 8000 rpm'de çöktürüldü. Daha sonra üstteki süpernatan faz boşaltıldı ve alttaki pellete 5 mL aseton çözeltisi ilave edildi. Tüpler, 60°C'ye ayarlanmış Alex Machine Ultrasonic Cleaner marka ultrasonik destekli su banyosunda 10 dakika boyunca homojenleştirildi. Daha sonra çözelti homojen bir kıvam elde etmek için bir vorteks kullanılarak 15 saniye karıştırıldı. Daha sonra tekrar soğutmalı santrifüj cihazı kullanılarak 4°C'de 8000 rpm'de 10 dakika süreyle çöktürüldü ve bu durum kloroplast parçalanmasına neden olarak mikroalglerdeki pigmentler solvente aktarıldı. PG 60 Instrument UV-Vis Spektrofotometresi, 475 nm ve 666 nm dalga boylarında santrifüjleme sonrasında üst sıvı süpernatan fazının absorbansını ölçmek için kullanıldı.

4
DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 3B Yazıcı ile Basılabilirlik Testi

Bu çalışmada kullanılan mikroekstrüzyon temelli 3B biyobaskı işleminde hücre yüklü hidrojel çözeltilerinin veya biyomürekkeplerin, bir nozülden katman katman ekstrüde edilmesi ve böylece önceden tasarlanmış gözenekli yapılara sahip iskelelerin oluşturulması temel amaçlardandı. Oluşturulan gözenekli iskeleler, hücrelere beslenme ve oksijen transferini kolaylaştırmanın yanı sıra iskele içindeki hücrelerin metabolik atıklarının uzaklaştırılmasını kolaylaştıran birbirine bağlı gözenekler nedeniyle hücrelerin hayatta kalmasının ve fonksiyonlarının iyileştirilmesine ortam sağlar [91]. Bu tür gözenekli iskelelerin üretilmesi için baskı işleminde yüksek bir doğruluk ve baskı sonrasında şekil bozulmasının önlenmesi gereklidir. Basılabilirliği değerlendirmeye yönelik sayısız niteliksel ve niceliksel yöntemler kullanılmıştır. Örneğin ekstrüde edilen hatların şeklinin ve katman istifleme kalitesinin görsel olarak değerlendirilmesinin yanı sıra basılan hatların sapması ve çökme derecesinin ölçülmesi gibi yöntemler uygulanmıştır [7].

Basılabilirlik testi için Col %5, Col %10 ve Col %15 olarak üç farklı çözelti denendi. Bu test sırasında sonuçlar gözlemle yapılarak en iyi malzeme seçilmeye çalışıldı. Yapılan denemelerde Col %5 çözeltisinin viskoziteli çok düşük olduğundan çok akışkan ve basılan iskelelerin şekil stabilitesinin olmadığı görülmüştür. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi basılan hatlar birbirine karışmış halde olup, vizkozitesi düzgün bir şekil oluşturacak kadar yeterli değildi. Oluşturulan iskelelerin boyutsal doğruluğu da olmadığından uygun malzeme olarak değerlendirilmedi.

Col %10 ve Col %15 kolaylıkla basıldı ve iskeleleri şekil stabilitesine sahipti. Ancak Col %15'in viskozitesi çok yüksekti ve 3B yazıcının yazdırmak için çok yüksek basınç kullanması gerekiyordu. Ayrıca Col %15 iskeleleri Col %10'a göre düzenli bir şekle sahip değildi. Basılan yapılar şeklini koruyabildi ancak yüksek viskoziteden dolayı oluşturulan yapılarda kalıntılar ve fazlalıklar bulunuyordu (Şekil 3.5). Bu kadar katı halde olması baskı hızını da oldukça düşürdü ve Col

%10'a göre nispeten daha yavaş baskı hızına sahipti. Bu özelliklerinden dolayı Col %15 malzemesi de biyomürekkep olarak seçilmedi.

Uygun viskoziteye sahip olması ve çok kolay basılabilmesi nedeniyle en iyi basılabilirlik sonuçları Col %10 çözeltisinde elde edildi. Baskı sonrasında iskeleler şekil stabilitesine kavuştu ve yüzeyleri oldukça pürüzsüz hale geldi. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te görüldüğü gibi, basılabilirlik testi hakkında daha detaylı bilgi için farklı dolgu tipleri ve farklı katman sayılarına sahip iskeleler basılmış ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Col %10 hidrojellerin baskı testlerinde petek, üçgen ve ızgara dolgu tipleri ve 5, 10, 20 katman sayısı kullanılmıştır. Neredeyse bütün dolgu tiplerinde basılan hatlar oldukça düzgün şekildeydi. Farklı katman kalınlıklarında bile basılan yapıların gözenekliliği korunmuş haldeydi. Ayrıca çapraz bağlama sonrasında da yapılarda herhangi bir bozulma gözlenmedi.

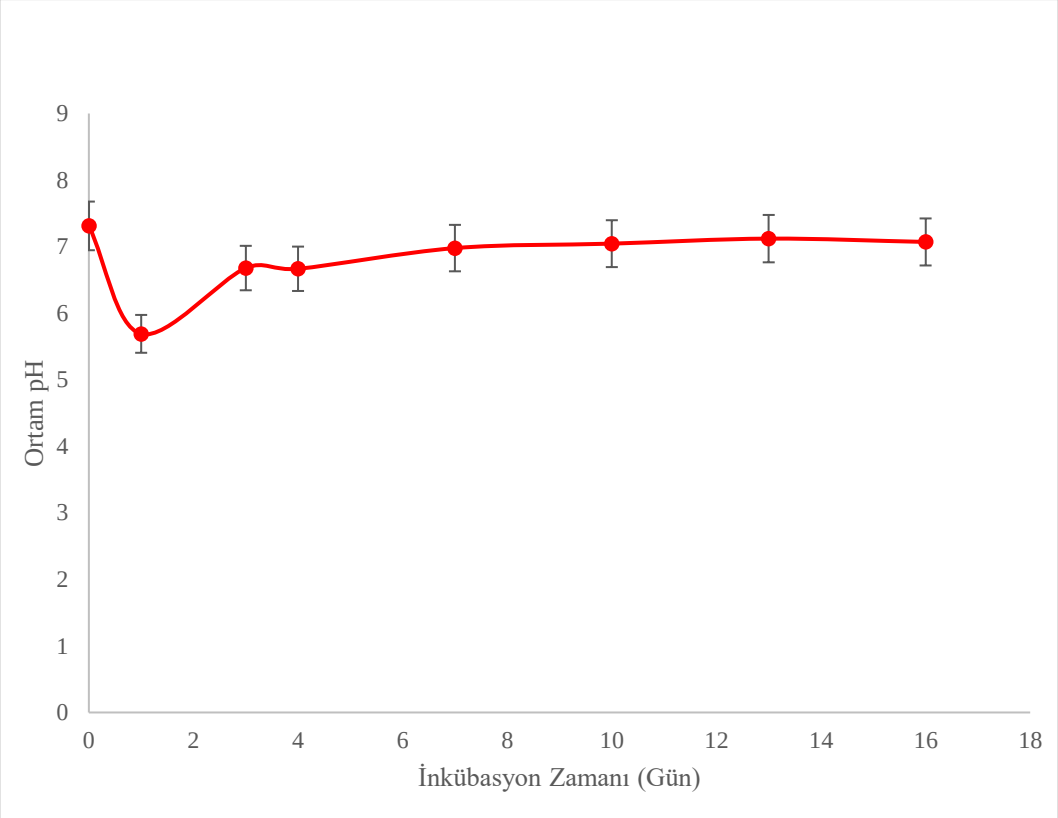
Elde edilen bu sonuçlara bakıldığında Col %10 malzemesi ile hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirmesi için gereken maddeler, biribirine bağlı gözenekler sayesinde taşınabilecek, hücreler çoğalıp göç edebilecek ve canlılıklarını koruyabileceklerdir. Optimize edilen bu malzeme ile hücreler için uygun olan farklı gözenekliliğe ve gözenek şekline sahip yapılar üretilebilmiştir. Bu yüzden Col %10 malzemesi biyomürekkep olarak kullanılmıştır.

4.2 Ortam pH'ı ve Mikroalg Büyüme Eğrisi

Çeşitli çalışmalar, mikroalglerin maksimum büyümesi için en uygun pH'ın 7.0-7.6 civarında olduğunu göstermiştir [92, 93]. Bazı çalışmalar nötralin (7.0) altındaki pH değerlerinde fotosentez için CO_2 kullanımının daha verimli olduğunu göstermiştir [94]. 3B biyobaskı ile üretilen mikroalg yüklü doku iskelelerinin sıvı ortamda inkübasyonu boyunca ortamın pH'ı 16 gün boyunca ölçülmüştür.

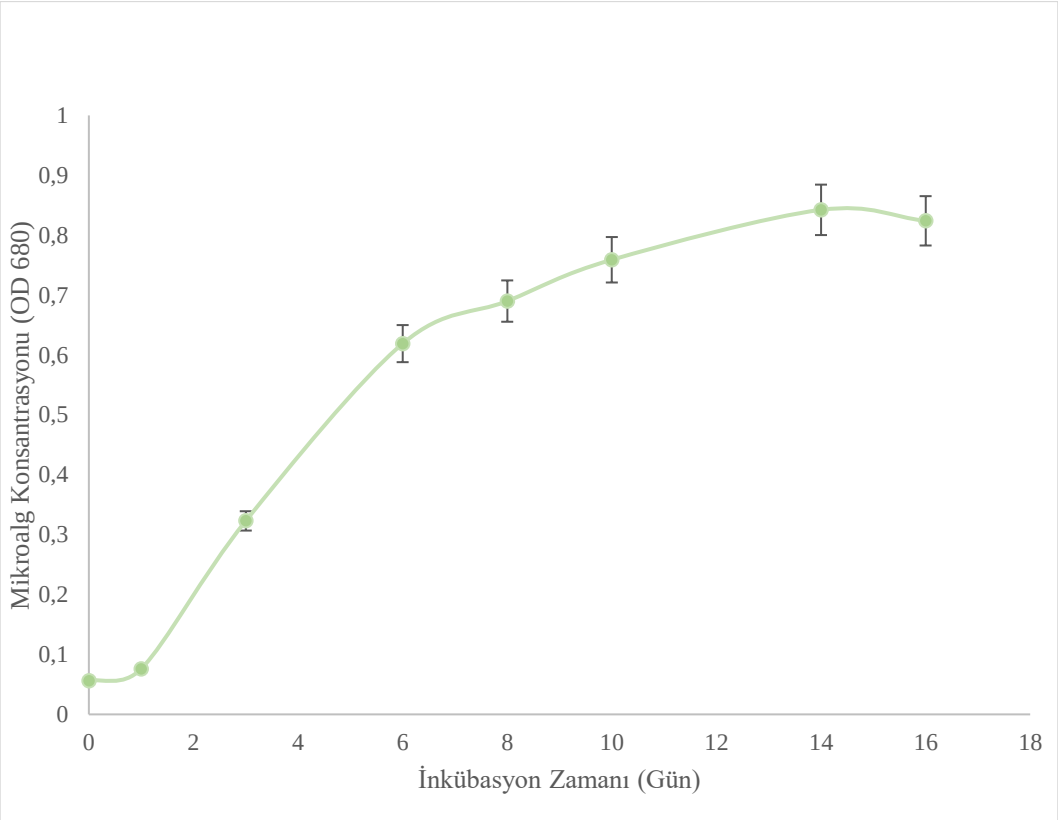
İlk gün pH 7.5 civarında iken inkübasyonun 1. gününde pH 6'nın altına düşmüştür (Şekil 4.1). Mikroalg kültürlerinde bir çok çalışmada inkübasyonun ilk günlerinde pH değeri düşüş göstermektedir [95]. Heterotrofik koşullar altında, açığa çıkan CO_2, fotosentez için bir karbon kaynağı olarak kullanılamaz, bu da yayılan CO_2 nedeniyle karbonik asit varlığında kültürün pH'ının düşmesine yol açar. Mikrolalgler CO_2 dışında birçok asidik metabolit salgılayarak su ortamı pH'ında bir düşüşe neden olur. Bu metabolitler N–H, O–H, C–H, C=O, ve C–OH'den oluşan

hümik asitlerdir [96]. Bu moleküller yüzünden 1. günde ortam pH'ı normal seviyelerden düşük seyretmiştir. 3. ve sonrası günlerde ise pH 6.8 ve 7 civarında ölçülmüştür. Bu pH değerleri mikroalglerin yaşaması açısından optimum değerlere yakındır.



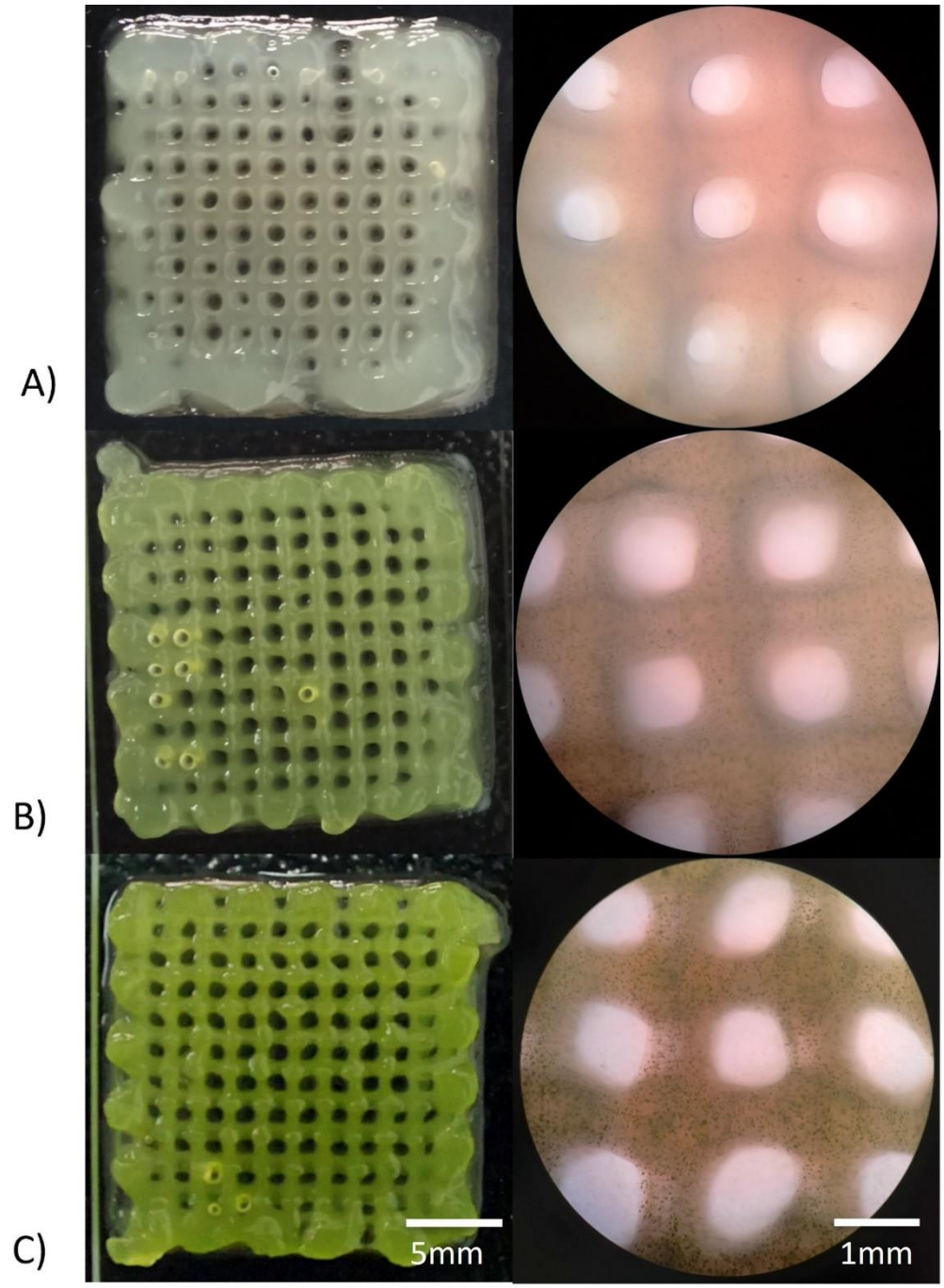
Şekil 4.1 16 günlük inkübasyon boyunca ortam pH değerleri.

Mikroalglerin 16 günlük inkübasyonu boyunca büyüme eğrisi oluşturmak için mikroalg konsantrasyonları da değerlendirilmiştir. 0. günden 16. güne kadar ölçülen değerler sayesinde eğri oluşturulduğunda, oluşturulan eğrinin mikroorganizmaların büyüme eğrisine uygun olduğu görülmüştür. Mikroorganizma büyüme eğrilerinde lag, log, stasyoner ve ölüm fazları bulunur. Mikroalgler için oluşturulan bu eğride de 0-1 gün aralığında lag fazı, 1-8 gün aralığında log fazı, 8-14 gün aralığında stasyoner faz ve 14-16 gün aralığında ölüm fazı görülmektedir (Şekil 4.2). Yapılan bir çok çalışmada da mikroalgler için büyüme eğrisi bu şekilde olmuştur [97].

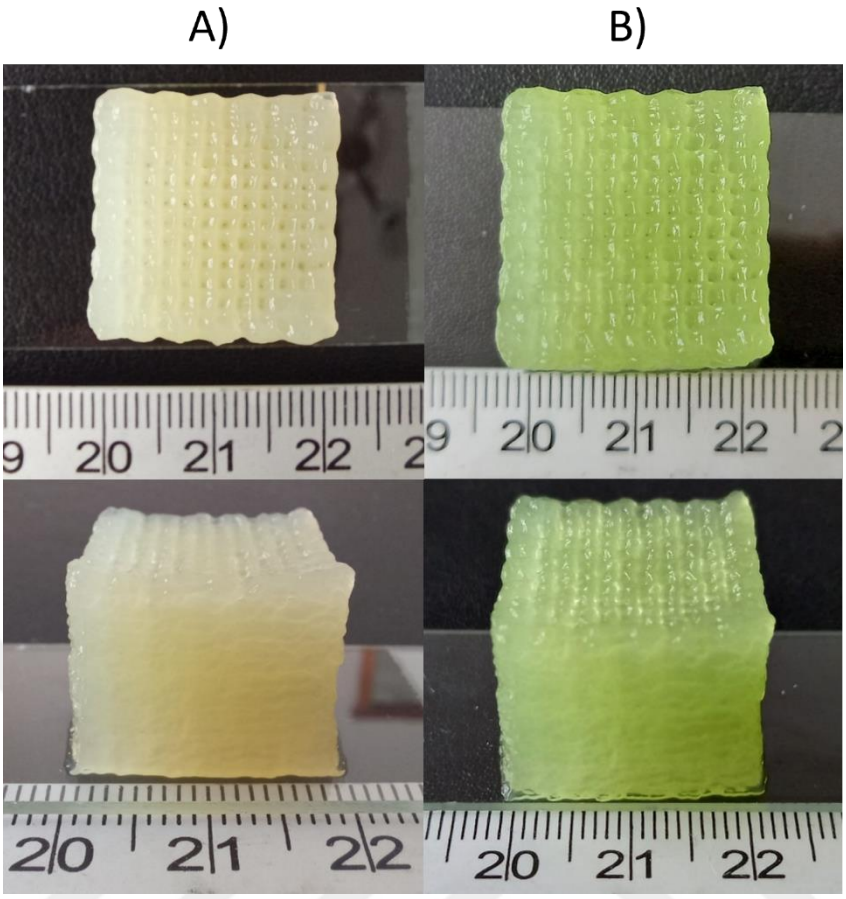


Şekil 4.2 16 günlük inkübasyon boyunca mikroalglerin büyüme eğrisi.

Şekil 4.3 ve 4.4' te 1., 3. ve 7. günlerde 3B biyobaskılı doku iskelelerinin fotoğrafları ve optik mikroskop görüntüleri sunulmaktadır.



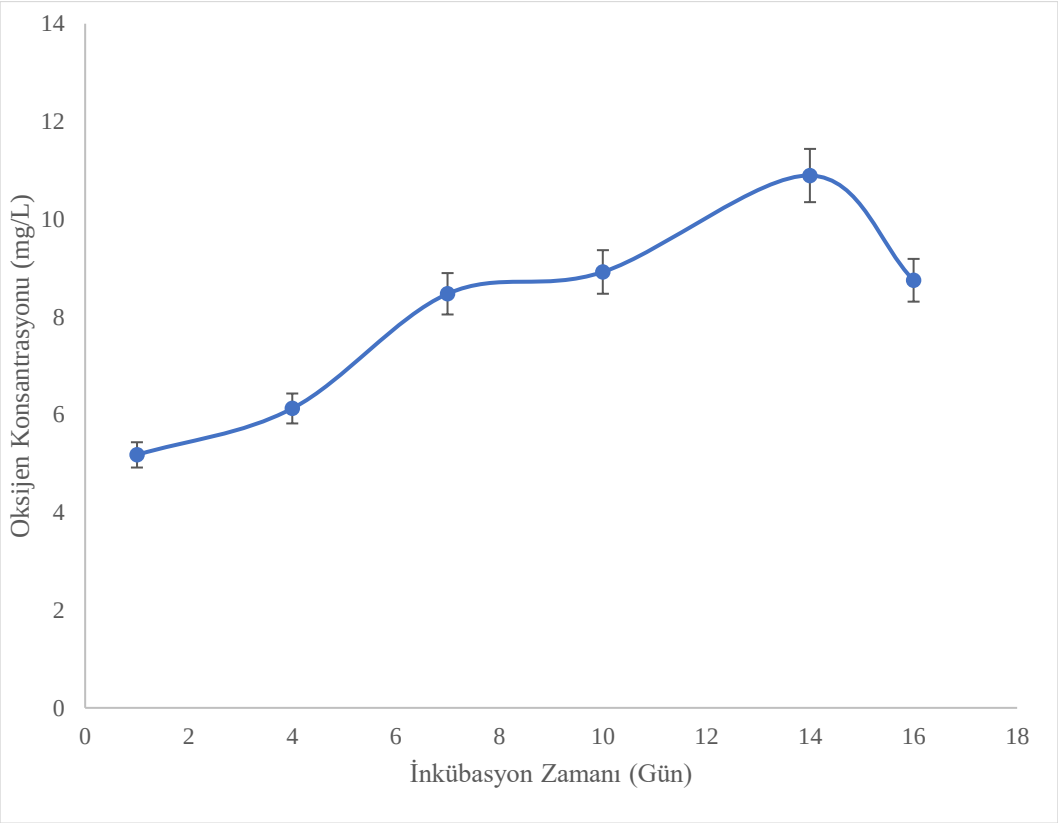
Şekil 4.3 A, B ve C sırasıyla 1,3 ve 7. günlerde 3B biyobaskılı doku iskelelerinin fotoğrafları ve optik mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.4 A ve B sırasıyla 1 ve 7. Günlerde 3B biyobaskılı 40 katmanlı doku iskelesinin fotoğrafları.

4.3 Oksijen Konsantrasyonu

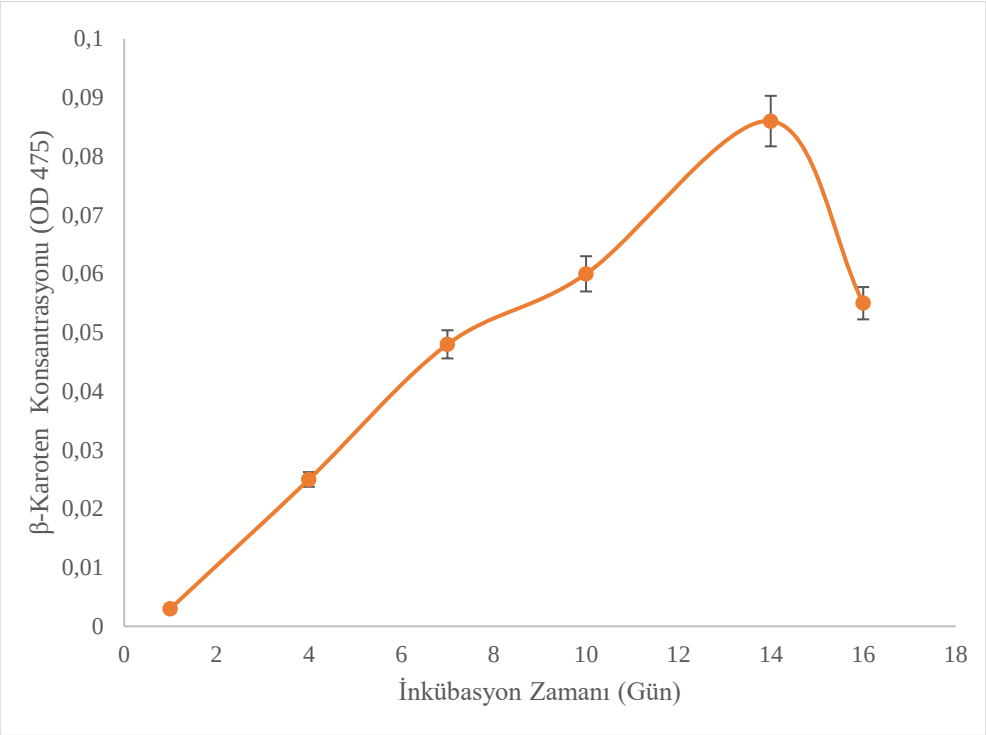
16 günlük inkübasyon boyunca ölçülen oksijen konsantrayonu için de eğri oluşturulmuştur (Şekil 4.5). Normal besi yeri oksijen konsantrasyonu 8 mg/L civarındadır. Mikroalgler inkübasyon ortamına alınınca 1. günde oksijen konsantrasyonu 5,1 mg/L seviyelerine kadar düşmüştür. Sonrasında 7. güne kadar 8,4 mg/L seviyelerine tekrar yükselmiştir. 7. günden sonra ise 14. güne kadar 11 mg/L seviyelerine kadar yükselmiştir. Oksijen miktarında bu yükselme oldukça dikkat çekicidir. Mikroalglerin bu seviyede oksijen üretebilmesi sayesinde doku iskelesinde kullanılmasıyla dokulardaki hipoksik etkinin giderilmesi amaçlanmaktadır.



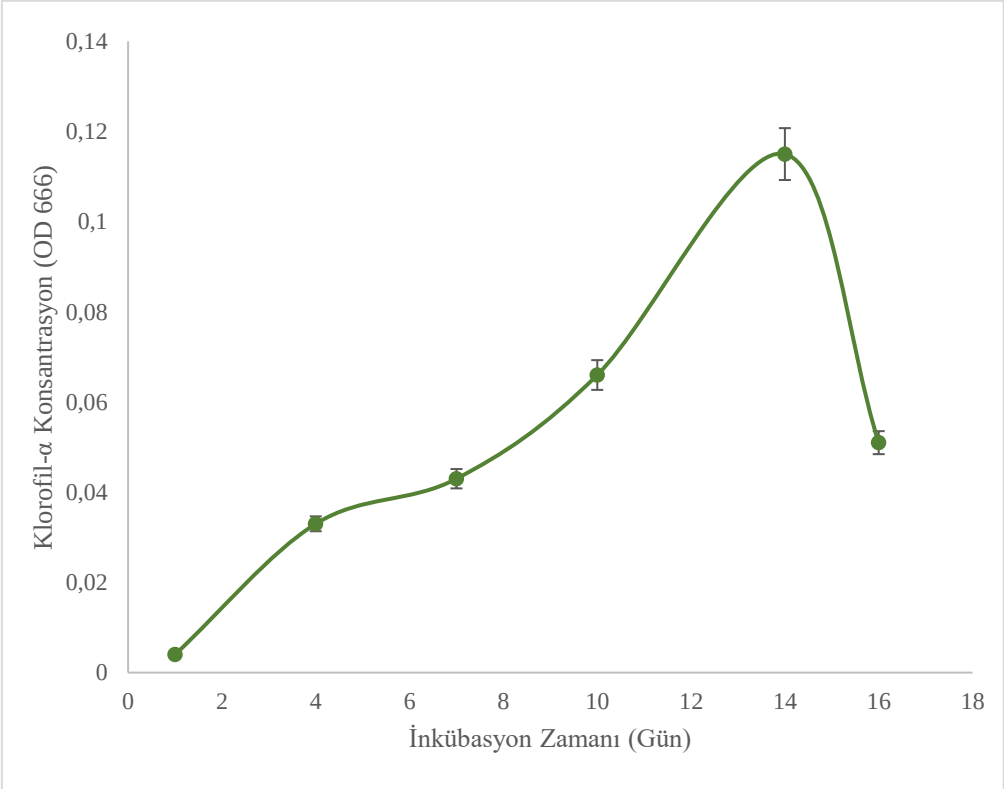
Şekil 4.5 16 günlük inkübasyon boyunca çözünmüş oksijen değerleri.

4.4 β-Karoten ve Klorofil-α Konsantrasyonu

İnkübasyon boyunca mikroalglerin pigment analizi de yapılmıştır. Pigmentler, genellikle çeşitli önemli özellikler içeren, mikroalglerin önemli ikincil metabolitleridir. Bu tez için yapılan çalışmalara göre β-karoten ve klorofil-α içerikleri analiz edilmiştir (Şekil 4.6 ve 4.7). Mikroalgler için pigment analizi sonuçlarına bakıldığında mikroalglerin büyüme eğrisi ile paralel bir eğri göstermişlerdir. 16 günlük inkübasyon süresi boyunca 14. güne kadar pigment konsantrasyonu da artmıştır. Ölüm fazına bağlı olarak ise 14-16 günleri arasında pigment konsantrasyonları sert bir şekilde düşüş göstermiştir. Bu sonuçlara bakıldığında ilk 14 günlük periyot için mikroalg yüklü doku iskeleleri kullanım amacına uygun olarak canlılığını ve metabolik aktivitesini sürdürebilmiştir. Bu özellikler de bu yapıların yara tedavisinde kullanılabilecek potansiyel malzemeler olmasını sağlayabilecektir.



Şekil 4.6 16 günlük inkübasyon boyunca β-karoten konsantrasyonu.



Şekil 4.7 16 günlük inkübasyon boyunca klorofil-α konsantrasyonu.

5
SONUÇ

Bu tez doğrultusunda 3B biyoyazıcıda kullanılmak üzere temelde aljinat ve kolajen biyopolimerlerinden oluşan ve kutup mikroalglerini içeren biyomürekkep geliştirilmesi, geliştirilen biyomürekkep ile 3B biyoyazıcıda doku iskelesi basılması ve üretilen bu doku iskelelerinde inkübasyon süresi boyunca oksijen üretimi incelenmiştir. Ancak tezin asıl amacı kutup mikroalgi yüklü yara örtülerinin geliştirilmesi ve bunun sayesinde yara tedavisinde karşılaşılan hipoksi sorununun önüne geçilmesidir. Bu doğrultuda bu tez çalışmasından elde edilen genel bulgular aşağıda özetlenmiştir:

- Basılabilirlik çalışmalarına göre Col %5, Col %10 ve Col %15 olarak üretilen 3 farklı biyomürekkep arasında Col %10 en basılabilir olan biyomürekkep olarak bulumuştur. Ayrıca Col %10 ile basılan 3 boyutlu yapılar farklı gözeneklilik, farklı gözenek şekli ve farklı katman kalınlıklarında başarılı bir şekilde kendi yapılarını koruyabilmiştir.

- Mikroalg yüklü doku iskeleleri inkübasyonu boyunca besi ortamının pH değeri 2. gününde 5.7 seviyesine kadar inmiştir. Ancak 3. gün ve sonrasında pH değerinin mikroalgler için normal seviyeler olan 7 ve üstüne çıktığı bulunmuştur.

- Mikroalgler için oluşturulan büyüme eğrisinde 0-1 gün aralığında lag fazı, 1-8 gün aralığında log fazı, 8-14 gün aralığında stasyoner faz ve 14-16 gün aralığında ölüm fazı görülmüştür. Bu bulgular mikroalgler için literatürdeki diğer sonuçlarla örtüşmektedir.

- Basılan 3B yapılarrın farklı günlerdeki fotoğraflarına bakıldığında yapıların rengi artan hücre yoğunluğuna bağlı olarak giderek koyulaşmıştır. Mikroalglerin çoğalması gözle görülür şekilde de olmuştur. Ayrıca optik

mikroskop görüntülerinde de mikroalg yoğunluğunun günden güne artışı gözlenmiştir.

- Farklı katman sayısına sahip 3B iskeleler de inkübasyon sonucunda oldukça yoğun mikroalg hücresi barındırabilmiştir. 40 katlı olarak basılan yüksek ve hacimli yapılarda da mikroalglerin yaşayabildiği ve çoğalabildiği görülmüştür.

- 3B basılan yapılardaki mikroalglerin ürettiği fotosentetik oksijen konsantrasyonu 16 gün boyunca ölçülmüştür. Normal besi yeri oksijen konsantrasyonu 8 mg/L civarında bulunmuştur. 1. günde oksijen konsantrasyonu 5.1 mg/L seviyelerine kadar düştüğü, sonrasında 7. güne kadar 8.4 mg/L seviyelerine tekrar yükseldiği ve 7. günden 14. güne kadar 11 mg/L seviyelerine kadar yükseldiği bulunmuştur.

- β-karoten pigment analizi sonuçlarına bakıldığında mikroalglerin büyüme eğrisi ile paralel bir eğri göstermiştir. 16 günlük inkübasyon süresi boyunca 14. güne kadar β-karoten konsantrasyonu da artmıştır. Ölüm fazına bağlı olarak ise 14-16 günleri arasında β-karoten konsantrasyonunun sert bir şekilde düşüş gösterdiği bulunmuştur.

- Klorofil-*a* pigment analizi sonuçlarına bakıldığında mikroalglerin büyüme eğrisi ve β-Karoten sonuçları ile paralel bir eğri göstermiştir. 16 günlük inkübasyon süresi boyunca 14. güne kadar klorofil-*a* konsantrasyonu da artmıştır. Ölüm fazına bağlı olarak ise 14-16 günleri arasında Klorofil-*a* konsantrasyonunun sert bir şekilde düşüş gösterdiği bulunmuştur.

Gelecekteki çalışmalar için, kutup mikroalgi yüklü yara örtülerinin insan hücreleriyle inkübasyonu ve insan hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultuda sonraki çalışmalarda mikroalg yüklü yara örtülerinin inkübasyonunun farklı koşullar altında optimizasyonuna ihtiyaç duyulabilir. Ayrıca farklı biyomürekkep formülasyonlarının geliştirilebilmesi için daha fazla malzeme araştırılması

gerekmektedir. Bu sayede yara iyileşmesinde karşılaşılan hipoksiye karşı potansiyel alternatif fotosentetik bir yara örtüsü üretilebilecektir.

KAYNAKÇA

[1] Hopfner, U., Schenck, T. L., Chávez, M. N., Machens, H. G., Bohne, A. V., Nickelsen, J., ... & Egaña, J. T., "Developmedeğiştirnt of photosynthetic biomaterials for in vitro tissue engineering," *Acta biomaterialia*, cilt 10, no. 6, pp. 2712-2717, 2014.

[2] Agarwal, T., Kazemi, S., Costantini, M., Perfeito, F., Correia, C. R., Gaspar, V., ... & Maiti, T. K., "Oxygen releasing materials: towards addressing the hypoxia-related issues in tissue engineering," *Materials Science and Engineering: C*, 2021.

[3] Maharjan, S., Alva, J., Cámara, C., Rubio, A. G., Hernández, D., Delavaux, C., ... & Zhang, Y. S., "Symbiotic photosynthetic oxygenation within 3D-bioprinted vascularized tissues," *Matter*, cilt 4, no. 1, pp. 217-240, 2021.

[4] Lode, A., Krujatz, F., Brüggemeier, S., Quade, M., Schütz, K., Knaack, S., ... & Gelinsky, M., "Green bioprinting: Fabrication of photosynthetic algae-laden hydrogel scaffolds for biotechnological and medical applications," *Engineering in Life Sciences*, cilt 15, no. 2, pp. 177-183, 2015.

[5] Schenck, T. L., Hopfner, U., Chávez, M. N., Machens, H. G., Somlai-Schweiger, I., Giunta, R. E., ... & Egaña, J. T., "Photosynthetic biomaterials: a pathway towards autotrophic tissue engineering.," *Acta biomaterialia*, cilt 15, pp. 39-47, 2015.

[6] He, Y., Zheng, Z., An, M., Chen, H., Qu, C., Liu, F., ... & Hou, X., "Molecular cloning and functional analysis of a Δ 12-fatty acid desaturase from the Antarctic microalga Chlamydomonas sp. ICE-L," *3 Biotech*, cilt 9, pp. 1-9, 2019.

[7] Malik, S., Hagopian, J., Mohite, S., Lintong, C., Stoffels, L., Giannakopoulos, S., ... & Parker, B., "Robotic Extrusion of Algae-Laden Hydrogels for Large-Scale Applications," *Global Challenges*, cilt 4, no. 1, 2020.

[8] Thakare, K., Jerpseth, L., Qin, H., & Pei, Z., "Bioprinting Using Algae: Effects of Extrusion Pressure and Needle Diameter on Cell Quantity in Printed Samples," *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, cilt 143, no. 1, 2021.

[9] Krujatz, F., Lode, A., Brüggemeier, S., Schütz, K., Kramer, J., Bley, T., ... & Weber, J., "Green bioprinting: Viability and growth analysis of microalgae immobilized in 3D-plotted hydrogels versus suspension cultures," *Engineering in Life Sciences*, cilt 15, no. 7, pp. 678-688, 2015.

[10] Schütz, K., Placht, A. M., Paul, B., Brüggemeier, S., Gelinsky, M., & Lode, A., "Three-dimensional plotting of a cell-laden alginate/methylcellulose blend: towards biofabrication of tissue engineering constructs with clinically relevant dimensions," *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, cilt 11, no. 5, pp. 1574-1587, 2017.

[11] Zhao, S., Guo, C., Kumarasena, A., Omenetto, F. G., & Kaplan, D. L., "3D printing of functional microalgal silk structures for environmental applications," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, cilt 5, no. 9, pp. 4808-4816, 2019.

[12] Payne, C., Dolan, E. B., O'Sullivan, J., Cryan, S. A., & Kelly, H. M., "A methylcellulose and collagen-based temperature responsive hydrogel promotes encapsulated stem cell viability and proliferation in vitro," *Drug delivery and translational research*, cilt 7, no. 1, pp. 132-146, 2017.

[13] Yang, X., Lu, Z., Wu, H., Li, W., Zheng, L., & Zhao, J., "Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering," *Materials Science and Engineering*: C, cilt 83, pp. 195-201, 2018.

[14] Xu, J., Zheng, S., Hu, X., Li, L., Li, W., Parungao, R., ... & Song, K., "Advances in the research of bioinks based on natural collagen, polysaccharide and their derivatives for skin 3D bioprinting," *Polymers*, cilt 12, no. 6, p. 1237, 2020.

[15] Lai, G., Li, Y., & Li, G., "Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution," *International journal of biological macromolecules*, cilt 42, no. 3, pp. 285-291, 2008.

[16] MC, R., "Wound healing; biologic features and approaches to maximize healing trajectories," *Curr Problems Surg*, cilt 38, pp. 61-140, 2001.

[17] Szycher, M., & Lee, S. J., "Modern wound dressings: a systematic approach to wound healing," *Journal of biomaterials applications*, cilt 7, no. 2, pp. 142-213, 1992.

[18] Schreml, S., Szeimies, R. M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M., & Babilas, P., "Oxygen in acute and chronic wound healing," *British Journal of Dermatology*, cilt 163, no. 2, pp. 257-268, 2010.

[19] S. &. A. S. C. Rajendran, Hi-tech textiles for interactive wound therapies, *Woodhead Publishing*, 2011, pp. 38-79.

[20] Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G., & Robson, M. C., "Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing," *Wound repair and regeneration*, cilt 2, no. 3, pp. 165-170, 1994.

[21] Bischoff, M., Kinzl, L., & Schmelz, A., "The complicated wound," *Der Unfallchirurg*, cilt 102, no. 10, pp. 797-804, 1999.

[22] Tarnuzzer, R. W., & Schultz, G. S., "Biochemical analysis of acute and chronic wound environments," *Wound Repair and Regeneration*, cilt 4, no. 3, pp. 321-325, 1996.

[23] Clark, R. A., "Wound repair: overview and general considerations," *The molecular and cellular biology of wound repair*, pp. 3-50, 1996.

[24] Dowsett, C., & Newton, H., "Wound bed preparation: TIME in practice," *Wounds Uk*, cilt 1, no. 3, p. 58, 2005.

[25] Périco, L. L., "Investigação do papel dos hormônios sexuais na atividade cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de Eugenia punicifolia na doença ulcerosa péptica experimental," 2018.

[26] Degreef, H. J., "How to heal a wound fast," *Dermatologic clinics*, cilt 16, no. 2, pp. 365-375, 1998.

[27] Hunt, T. K., Hopf, H., & Hussain, Z., "Physiology of wound healing," *Advances in skin & wound care*, cilt 13, p. 6, 2000.

[28] Rivera, A. E., & Spencer, J. M., "Clinical aspects of full-thickness wound healing," *Clinics in dermatology*, cilt 25, no. 1, pp. 39-48, 2007.

[29] Strecker-McGraw, M. K., Jones, T. R., & Baer, D. G., "Soft tissue wounds and principles of healing," *Emergency medicine clinics of North America*, cilt 25, no. 1, pp. 1-22, 2007.

[30] Kwee, E., Borgdorff, M., Schepers, T., Halm, J. A., Winters, H. A., Weenink, R. P., ... & Giannakópoulos, G. F., "Adjunctive hyperbaric oxygen therapy in the management of severe lower limb soft tissue injuries: a systematic review," *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, pp. 1-8, 2024.

[31] Baxter Jr, E., Complete crime scene investigation handbook, CRC press, 2015.

[32] Talikowska, M., Fu, X., & Lisak, G., "Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review," *Biosensors and Bioelectronics*, cilt 135, pp. 50-63, 2019.

[33] Parrish, W. R., & Roides, B., "Physiology of blood components in wound healing: an appreciation of cellular co-operativity in platelet rich plasma action," *J. Exerc. Sports Orthop*, cilt 4, pp. 1-14, 2017.

[34] Jannesari, M., Varshosaz, J., Morshed, M., & Zamani, M., "Composite poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs," *International journal of nanomedicine*, pp. 993-1003, 2011.

[35] R. M. Day, Functional requirements of wound repair biomaterials, *Woodhead Publishing*, 2011, pp. 155-173.

[36] Field, C. K., & Kerstein, M. D., "Overview of wound healing in a moist environment," *The American journal of surgery*, cilt 167, no. 1, pp. 2-6, 1994.

[37] Daunton, C., Kothari, S., Smith, L., & Steele, D., "A history of materials and practices for wound management," *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, cilt 20, no. 4, 2012.

[38] Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S., & Chen, X., "A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings," *Journal of advanced research*, cilt 8, no. 3, pp. 217-233, 2017.

[39] C. Dealey, The care of wounds: A guide for nurses, *John Wiley & Sons*, 2008.

[40] Domb, A. J., & Khan, W. (Eds.), "Focal controlled drug delivery," *Springer Science & Business Media*, 2014.

[41] Sezer, A. D., & Cevher, E., "Biopolymers as wound healing materials: challenges and new strategies," *Biomaterials applications for nanomedicine*, pp. 383-414, 2011.

[42] Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B., "Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration," *Pharmaceutics*, cilt 12, no. 8, p. 735, 2020.

[43] Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S. O., Jafari, S. H., & Supaphol, P., "A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages," *Polymers for Advanced Technologies*, cilt 21, no. 2, pp. 77-95, 2010.

[44] Aderibigbe, B. A., & Buyana, B., "Alginate in wound dressings," *Pharmaceutics*, cilt 10, no. 2, p. 42, 2018.

[45] Agrawal, P., Soni, S., Mittal, G., & Bhatnagar, A., "Role of polymeric biomaterials as wound healing agents," *The international journal of lower extremity wounds*, cilt 13, no. 3, pp. 180-190, 2014.

[46] Basu, P., Kumar, U. N., & Manjubala, I., "Wound healing materials–a perspective for skin tissue engineering," *Current Science*, pp. 2392-2404, 2017.

[47] Ghanavati, Z., Neisi, N., Bayati, V., & Makvandi, M., "The influence of substrate topography and biomaterial substance on skin wound healing," *Anatomy & cell biology*, cilt 48, no. 4, pp. 251-257, 2015.

[48] Rnjak-Kovacina, J., Wise, S. G., Li, Z., Maitz, P. K., Young, C. J., Wang, Y., & Weiss, A. S., "Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering," *Biomaterials*, cilt 32, no. 28, pp. 6729-6736, 2011.

[49] Blackwood, K. A., McKean, R., Canton, I., Freeman, C. O., Franklin, K. L., Cole, D., ... & MacNeil, S., "Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement," *Biomaterials*, cilt 29, no. 21, pp. 3091-3104, 2008.

[50] Farshidfar, N., Iravani, S., & Varma, R. S., "Alginate-Based Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine," *Marine Drugs*, cilt 21, no. 3, p. 189, 2023.

[51] B. E. Christensen, "Alginates as biomaterials in tissue engineering," *Carbohydrate chemistry: chemical and biological approaches*, cilt 37, pp. 227-258, 2011.

[52] Aderibigbe, B. A., & Buyana, B., "Alginate in wound dressings," *Pharmaceutics*, cilt 10, no. 2, p. 42, 2018.

[53] Pereira, R., Carvalho, A., Vaz, D. C., Gil, M. H., Mendes, A., & Bártolo, P., "Development of novel alginate-based hydrogel films for wound healing applications," *International journal of biological macromolecules*, cilt 52, pp. 221-230, 2013.

[54] Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Kanikireddy, V., Toro, C., & Sadiku, E. R., "Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review," *Carbohydrate polymers*, cilt 236, 2020.

[55] Park, S. N., Lee, H. J., Lee, K. H., & Suh, H., "Biological characterization of EDC-crosslinked collagen–hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration," *Biomaterials,* cilt 24, no. 9, pp. 1631-1641, 2003.

[56] Lazovic, G., Colic, M., Grubor, M., & Jovanovic, M., "The application of collagen sheet in open wound healing," *Annals of burns and fire disasters,* cilt 18, no. 3, p. 151, 2005.

[57] Horch, R. E., & Stark, G. B., "Comparison of the effect of a collagen dressing and a polyurethane dressing on the healing of split thickness skin graft (STSG) donor sites," *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery,* cilt 32, no. 4, pp. 407-414, 1998.

[58] Veves, A., Sheehan, P., & Pham, H. T., "A randomized, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers," *Archives of surgery,* cilt 137, no. 7, pp. 822-827, 2002.

[59] Nataraj, C., Ritter, G., Dumas, S., Helfer, F. D., Brunelle, J., & Sander, T. W., "Extracellular wound matrices: novel stabilization and sterilization method for collagen-based biologic wound dressings," *Wounds: a compendium of clinical research,* cilt 19, no. 6, pp. 148-156, 2007.

[60] Nagata, H., Ueki, H., & Moriguchi, T., "Fibronectin: Localization in normal human skin, granulation tissue, hypertrophic scar, mature scar, progressive systemic sclerotic skin, and other fibrosing dermatoses," *Archives of dermatology*, cilt 121, no. 8, pp. 995-999, 1985.

[61] Motta, G., Ratto, G. B., De Barbieri, A., Corte, G., Zardi, L., Sacco, A., & Castagnola, M., "Can heterologous collagen enhance the granulation tissue growth? An experimental study," *The Italian Journal of Surgical Sciences,* cilt 13, no. 2, pp. 101-108, 1983.

[62] Chung, J., Wang, X. Q., Lindberg, F. P., & Frazier, W. A., "Thrombospondin-1 Acts Via IAP/CD47 to Synergize with Collagen in□ 2β1-Mediated Platelet Activation. Blood," *The Journal of the American Society of Hematology,* cilt 94, no. 2, pp. 642-648, 1999.

[63] Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., & Madamwar, D., "Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels," *Bioresource technology,* cilt 102, no. 22, pp. 10163-10172, 2011.

[64] Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X., "Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work," *Biotechnology progress*, cilt 27, no. 3, pp. 597-613, 2011.

[65] I. Moreno-Garrido, "Microalgae immobilization: current techniques and uses," *Bioresource technology*, cilt 99, no. 10, pp. 3949-3964, 2008.

[66] De-Bashan, L. E., & Bashan, Y., "Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects," *Bioresource technology*, cilt 101, no. 6, pp. 1611-1627, 2010.

[67] Ferro, Y., Perullini, M., Jobbagy, M., Bilmes, S. A., & Durrieu, C., "Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels," *Sensors*, cilt 12, no. 12, pp. 16879-16891, 2012.

[68] Landers, R., Hübner, U., Schmelzeisen, R., & Mülhaupt, R., "Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering," *Biomaterials*, cilt 23, no. 23, pp. 4437-4447, 2002.

[69] Bloch, K., Papismedov, E., Yavriyants, K., Vorobeychik, M., Beer, S., & Vardi, P., "Photosynthetic oxygen generator for bioartificial pancreas," *Tissue engineering*, cilt 12, no. 2, pp. 337-344, 2006.

[70] Duygu, D. Y., Udoh, A. U., Özer, T., & Erkaya, İ. A., "The characteristics and importance of microalgae culture collections," cilt 13, no. 1, pp. 80-87, 2017.

[71] Mobin, S., & Alam, F., "Some promising microalgal species for commercial applications: A review," *Energy Procedia*, cilt 110, pp. 510-517, 2017.

[72] Geada, P., Vasconcelos, V., Vicente, A., & Fernandes, B., "Microalgal biomass cultivation," *Algal green chemistry*, pp. 257-284, 2017.

[73] Tang, D. Y. Y., Khoo, K. S., Chew, K. W., Tao, Y., Ho, S. H., & Show, P. L., "Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products," *Bioresource technology*, cilt 304, 2020.

[74] Parameswari, R. P., & Lakshmi, T., "Microalgae as a potential therapeutic drug candidate for neurodegenerative diseases," *Journal of Biotechnology*, cilt 358, pp. 128-139, 2022.

[75] Saadaoui, I., Rasheed, R., Abdulrahman, N., Bounnit, T., Cherif, M., Al Jabri, H., & Mraiche, F., "Algae-derived bioactive compounds with anti-lung cancer potential," *Marine drugs*, cilt 18, no. 4, p. 197, 2020.

[76] Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., ... & Sukhikh, S., "Microalgae: A promising source of valuable bioproducts," *Biomolecules*, cilt 10, no. 8, p. 1153, 2020.

[77] Calijuri, M. L., Silva, T. A., Magalhães, I. B., de Paula Pereira, A. S. A., Marangon, B. B., de Assis, L. R., & Lorentz, J. F., "Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities," *Chemosphere*, cilt 358, pp. 128-139, 2022.

[78] İnan, B., & Özçimen, D., "Preparation and characterization of microalgal oil loaded alginate/poly (vinyl alcohol) electrosprayed nanoparticles," *Food and Bioproducts Processing*, cilt 129, pp. 105-114, 2021.

[79] Cui, H., Su, Y., Wei, W., Xu, F., Gao, J., & Zhang, W., "How microalgae is effective in oxygen deficiency aggravated diseases? A comprehensive review of literature," *International Journal of Nanomedicine*, pp. 3101-3122, 2022.

[80] Smith, W. O., & Lancelot, C., "Bottom-up versus top-down control in phytoplankton of the Southern Ocean," *Antarctic Science*, cilt 16, no. 4, pp. 531-539, 2004.

[81] Kirst, G. O., & Wiencke, C., "Ecophysiology of polar algae," *Oceanographic Literature Review*, cilt 12, no. 42, p. 1094, 1995.

[82] Thomas, D. N., & Dieckmann, G. S., "Antarctic Sea ice--a habitat for extremophiles," *Science*, cilt 295, no. 5555, pp. 641-644, 2002.

[83] Mock, T., & Thomas, D. N., "Microalgae in polar regions: linking functional genomics and physiology with environmental conditions," *In Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*, pp. 285-312, 2008.

[84] K. R. Arrigo, "Primary production in sea ice," *Sea ice: an introduction to its physics, chemistry, biology and geology*, pp. 143-183, 2003.

[85] Mock, T., & Thomas, D. N., "Recent advances in sea-ice microbiology," *Environmental Microbiology*, cilt 7, no. 5, pp. 605-619, 2005.

[86] İnan, B., Mutlu, B., Karaca, G. A., Koç, R. Ç., & Özçimen, D., "Bioprospecting Antarctic microalgae as anticancer agent against PC-3 and AGS cell lines," *Biochemical Engineering Journal*, cilt 195, 2023.

[87] Trampe, E., Koren, K., Akkineni, A. R., Senwitz, C., Krujatz, F., Lode, A., ... & Kühl, M., "Functionalized bioink with optical sensor nanoparticles for O2 imaging in 3D-bioprinted constructs," *Advanced Functional Materials*, cilt 28, no. 45, 2018.

[88] P. Calvert, “3D printing of gels with living photosynthetic algae,” *Mrs Advances*, cilt 1, no. 36, pp. 2569-2572, 2016.

[89] Ghorbani, F., Kim, M., Monavari, M., Ghalandari, B., & Boccaccini, A. R., “Mussel-inspired polydopamine decorated alginate dialdehyde-gelatin 3D printed scaffolds for bone tissue engineering application,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, cilt 10, 2022.

[90] İnan, B., Akın, B., Ünlü, İ. D., Koçer, A. T., Çelik, A., Vehapi, M., ... & Özçimen, D., “Interactive effects of cold and temperate conditions on growth and biochemical content of Antarctic microalga Chlorella variabilis YTU. ANTARCTIC. 001,” *Journal of Applied Phycology*, cilt 35, no. 2, pp. 625-637, 2023.

[91] Özçimen D., Kaya Y., Aksoy H. M., İnan B., Çelik A., Edbeib M., et al., “Isolation, characterization and identification of Chlorella variabilis isolated from Horseshoe Island, Skua Lake, Antarctica, YTU.ANTARCTIC.001, MN372092, NCBI GenBank,” 2019.

[92] Chen, C. Y., & Durbin, E. G., “Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton,” *Marine Ecology-Progress Series*, cilt 109, pp. 83-83, 1994.

[93] Visviki, I., & Santikul, D., “The pH tolerance of Chlamydomonas applanata (Volvocales, Chlorophyta),” *Archives of environmental contamination and toxicology*, cilt 38, pp. 147-151, 2000.

[94] Moroney, J. V., & Tolbert, N. E., “Inorganic carbon uptake by Chlamydomonas reinhardtii,” *Plant physiology*, cilt 77, no. 2, pp. 253-258, 1985.

[95] Guedes, A. C., Amaro, H. M., Pereira, R. D., & Malcata, F. X., “Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga Scenedesmus obliquus,” *Biotechnology progress*, cilt 27, no. 5, pp. 1218-1224, 2011.

[96] Wu, M., Wu, G., Lu, F., Wang, H., Lei, A., & Wang, J., “Microalgal photoautotrophic growth induces pH decrease in the aquatic environment by acidic metabolites secretion,” *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, cilt 15, no. 1, pp. 1-13, 2022.

[97] Hossain, S. Z., Al-Bastaki, N., Alnoaimi, A. M. A., Ezuber, H., Razzak, S. A., & Hossain, M. M., “Mathematical modeling of temperature effect on algal

growth for biodiesel application," *Renewable Energy and Environmental Sustainability*, pp. 517-528, 2020.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Yerlikaya, D., Balkanlı, D., “Polar Microalgae For The Oxygenation Of 3D Bioprinted Scaffolds,” 7th National Polar Sciences Symposium and 3rd Polar Festival, İstanbul, 2023.