T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GFP GENİ AKTARILMIŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE DAVRANIŞLARININ 4 BOYUTLU KÜLTÜRDE YAPAY ZEKA KULLANILARAK ANALİZİ

CEREN ÖZDEMİR

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ HAKAN DARICI

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

İSTANBUL-2021

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GFP GENİ AKTARILMIŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE DAVRANIŞLARININ 4 BOYUTLU KÜLTÜRDE YAPAY ZEKA KULLANILARAK ANALİZİ

CEREN ÖZDEMİR

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ HAKAN DARICI

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

İSTANBUL-2021

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum,“GFP Geni Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Davranışlarının 4 Boyutlu Kültürde Yapay Zeka Kullanılarak Analizi” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ceren Özdemir

Bu tezi aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e kariyerimde ve kişisel gelişimimde bana sağladığı katkıları ve desteği için minnettarım. En büyük isteklerimden biri benim çalışmalarımla her zaman gurur duymasıdır.

Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI'ya, mühendislik dehası ve yaratıcılığı ile tez danışmanlığının yanı sıra güler yüzü ve çözüm odaklı oluşu ile hayat danışmanlığıyla bana katkıları oldukça büyüktür.

Tez çalışmalarımda gerek teknik gerekse arkadaşlık açısından verdikleri desteklerden ötürü İSÜKÖK ailesine teşekkür ederim.

Seçtiğim meslek dalında önemli payı olan lisedeki biyoloji öğretmenim Kasım BARAN'a çok teşekkür ederim.

Şimdilerde beni gökyüzünden izleyen, yolumu tahmin ettiğinden daha çok açan manevi dedeme teşekkür ederim.

Hayatta ve kariyerimde iyisiyle kötüsüyle küçük büyük dokunuşlarıyla beni bugüne getiren ve bu tezi yapmamı sağlayan herkese ve hayatın getirdiği her şeye teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI ..... İ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT XV
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 4
1.1. Kök Hücreler 4
1.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler 6
1.2. 2B ve 3B Hücre Kültürü 7
1.3. Eklemeli Üretim ve 3B Baskı 8
1.3.1. Bilgisayar Destekli Tasarım (Computer Aided Design; CAD), Modelleme ve Baskı Süreci: 9
1.3.2. 3B Biyobaskı 11
1.3.3. 3B Biyoyazıcılarda Baskı Yöntemleri 20
1.4. 4B Hücre Kültürü 26
1.5. 3B Biyobaskının Kullanıldığı Alanlar ve Klinik Uygulamalar 27
1.6. Yapay Zeka 28
1.6.1. Makine Öğrenmesi 30
2. GEREÇ VE YÖNTEM 34
2.1. Kimyasal Malzemeler 34
2.2. Sarf Malzemeler 34
2.3. Hücre Hatları 35
2.4. Kullanılan Cihazlar 35
2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve Pasajlanması 35

2.5.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurulması....36
2.5.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözülmesi....37
2.5.3. Mikoplazma Testleri....37
2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Akış Sitometrisinde Karakterizasyonu....37
2.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin GFP Geni ile Viral Transdüksiyonu....38
2.7.1. GFP'li Hücrelerin Seleksiyonu ve Çoğaltılması....38
2.7.2. GFP'li Mezenkimal Kök Hücrelerin Akış Sitometrisinde Karakterizasyonu....38
2.8. Biyomürekkeplerin Hazırlanması....39
2.8.1. Çoğaltılan Hücrelerin Biyomürekkeplere Yüklenerek 3B Biyoyazıcılarda Basılması....39
2.9. Florasan Mikroskopta Time-Lapse Sistemi ile Görüntülenmeleri....40
2.9.1. Intellesis Programının Kullanımı....41
2.9.2. Hücre Canlılığı, Morfolojisi, Dağılımları ve Hareketleri ile ilgili Sayısal Bilgilerin Derlenmesi ve Analizi....43
2.10. Deney Grupları....44
2.10.1. 2B ve 3B Kültür Karşılaştırmaları....44
2.10.2. Farklı Fokus Karşılaştırmaları....44
2.10.3. Hücre Ölümü Analizleri....45
2.11. Hesaplamalar....45
3. BULGULAR....48
3.1. GFP Transfeksiyon Bulguları....48
3.2. Time Lapse Görüntülerde Yapay Zeka Analizleri....51
3.2.1. 2B ve 3B Kültür Karşılaştırmaları....54
3.2.2. Farklı Fokus Karşılaştırmaları (25122020 numaralı deney)....70
3.2.3. Hücre Ölümü Analizleri....75
3.2.4. Hücre Hareketi (Sismograf) Analizleri....80
4. TARTIŞMA....85
4.1.1. 2B ve 3B Hücre Kültürü....85
4.1.2. 3B Biyobaskı....85
4.1.3. 4B Hücre Kültürü....87
4.1.4. Görüntüleme Sistemi....87
4.1.5. Yapay Zeka....88
4.2. Deney Grupları....91

4.2.1. 2B ve 3B Kültür Karşılaştırmaları 92
4.2.2. Farklı Fokus Karşılaştırmaları 95
4.2.3. Hücre Ölümü Analizleri 96
4.2.4. Hücre Hareketi Analizleri 98
4.3. Limitasyonlar 99
4.3.1. Hücre hareketi 99
4.3.2. Jel hareketi 99
4.3.3. Odak değişimi 100
4.3.4. Fototoksisite 101
5. SONUÇ 104
KAYNAKÇA 105
İNTİHAL RAPORU 126

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Biyoyazıcı ve Parametreler (Irvine ve Venkatraman, 2016; Leberfinger vd., 2019; Liu vd., 2018). 25
Tablo 2: YZ eğitimlerinde hücrelerin parlaklık, şekil ve yapışma durumlarına göre yaptığımız sınıflandırmalar. Her sınıflandırma, Intellesis programında kullandığımız marker rengi ile de belirtilmiştir. 53
Tablo 3: A549 ilaç öncesi ve sonrası grafiğin ortalama datası. 82
Tablo 4: A549 numaralı deneyin Excel datası. 1191

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kök Hücrenin Sınıflandırılması. 5
Şekil 2: Laboratuvarımızda bulunan 3B yazıcı (sağda) ve 3B Biyoyazıcı (solda). 11
Şekil 3: Polimerlerin Sınıflandırılması. 15
Şekil 4: Aljinat Kimyasal yapısı (Liu vd., 2018). 17
Şekil 5: Jelatin Kimyasal Yapısı (Liu vd., 2018). 18
Şekil 6: 3B Biyoyazıcıların Sınıflandırılması. 21
Şekil 7: 3B Biyoyazıcıların Kullanıldığı Alanlar. 26
Şekil 8: 3B Biyoyazıcıda Kullanılan Hücreler. 26
Şekil 9: Makine Öğrenmesi Sınıflandırılması. 32
Şekil 10: Çalışmamızdaki Biyobaskı ve Time-Lapse Aşamaları. 41
Şekil 11: Görüntü işleme. 42
Şekil 12: Detaylı Yapay Zeka Yöntemi. 43
Şekil 13: Yapay Zeka Aşamaları. 44
Şekil 14: MKH Karakterizasyonu. 48
Şekil 15: GFP transfeksiyonu sonrası GFP ışıma miktarının flow sitometrik analizi. Hücrelerde transfektyon oranının % 71.88 olduğu tespit edildi. 49
Şekil 16: Mikoplazma Testi (5x). 50
Şekil 17: Blastisidin Seleksiyonu sonrası GFP'li MKH. 50
Şekil 18: Blastisidin Seleksiyonu sonrası GFP'li MKH. 50
Şekil 19: 10. gün seleksiyon sonrası GFP'li MKH. 51
Şekil 20: 28102020 2B sahne 4, yüksek ışıma veren (High-Bright) ve normal ışıma veren (Normal) hücreler. 52
Şekil 21: Segmentasyon Bilgisi. 53
Şekil 22: 02122020 deneyi, 2B, sahne 5 fotoğrafları. 57
Şekil 23: 02122020 sahne 5 - 2B grafikleri. 58
Şekil 24: 02122020 deneyi, 3B, sahne 18 fotoğrafları. 59
Şekil 25: 02122020 sahne 18 - 3B grafikleri. 59
Şekil 26: 26102020 deneyi, 2B, sahne 1 fotoğrafları. 60
Şekil 27: 26102020 sahne 1 - 2B grafikleri. 61
Şekil 28: 26102020 sahne 1 - 2B örneğinde, farlı hesaplama tekniklerinin görüntü elde edilen BF, GFP ve Merge kanallarındaki karşılaştırmaları. 61

Şekil 29: 28102020 deneyi, 2B, sahne 4 fotoğrafları. 63
Şekil 30: 28102020 sahne 4 - 2B grafikleri. 64
Şekil 31: t25 deneyi, 2B, sahne 2 fotoğrafları. 65
Şekil 32: t25 sahne 2 - 2B grafikleri. 66
Şekil 33: a) t25 sahne 2 2B örneğinden bir hücrenin deney başlangıcında, minimum (84) ve maksimum (235) yüzey alanına sahip olduğu karelerdeki görüntüsü. b) Tek bir hücrenin yüzey alanı ile GFP ışıması arasındaki ilişkiyi gösteren şekil. c) Örnek verilen hücrenin belirtilen zamanlarda kapladığı alan ve GFP düzeyi. 66
Şekil 34: Kitosan deneyi, 3B, sahne 18 fotoğrafları. 67
Şekil 35: Kitosan sahne 18 - 3B grafikleri. 68
Şekil 36: GelMA deneyi, 3B, sahne 3 fotoğrafları. 69
Şekil 37: GelMA sahne 3 - 3B grafikleri. 70
Şekil 38: 25122020 deneyi, 3B, sahne 10 fotoğrafları. 71
Şekil 39: 25122020 sahne 10 - 3B grafikleri. 72
Şekil 40: 25122020 deneyi, 3B, sahne 11 fotoğrafları. 73
Şekil 41: 25122020 sahne 11 - 3B grafikleri. 73
Şekil 42: 25122020 sahne 10 ve 11 - 3B grafikleri. 74
Şekil 43: H2O2 deneyi, 2B, sahne 1 (H2O2 uygulanan grup) fotoğrafları. 75
Şekil 44: H2O2 sahne 1 - 2B (H2O2 uygulanan grup) grafikleri. 76
Şekil 45: H2O2 deneyi, 2B, sahne 2 (H2O2 uygulanmayan kontrol grubu) fotoğrafları. 77
Şekil 46: H2O2 sahne 1 - 2B (H2O2 uygulanmayan kontrol grubu) grafikleri. 78
Şekil 47: A549 deneyi, 2B, sahne 1 ve 8 fotoğrafları. Sahne 1 H2O2 uygulanan, sahne 8 kontrol gruplarından seçilmiş birer örnektir. 79
Şekil 48: A549 sahne 1 ve 8 – 2B grafikleri. Sahne 1 H2O2 uygulanan, sahne 8 kontrol gruplarından seçilmiş birer örnektir. 80
Şekil 49: H_2O_2 sahne 1 ve 2 - 2B – GFP-MKH Sismograf grafikleri. 81
Şekil 50: A549 sahne 1 ve 8 - 2B Sismograf. 82
Şekil 51: 40X sahne 2 - 2B sismograf (GFP, Merge ve BF). 83
Şekil 52: 02122020 sahne 5 ve 18 - 2B/3B sismograf (GFP, Merge ve BF). 83
Şekil 53: 25122020 sahne 10 ve11 - 3B sismograf (GFP, Merge ve BF). 84

Şekil 54: Time-lapse görüntülemede yakalanmış ölmekte olan hücreler. Hücrenin çevresindeki küçük parlak noktacıklar apoptotik vezikülleri göstermektedir. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere kıyasla daha parlak olduğu da görülmektedir..... 96

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

2B (2D) : İki Boyutlu
3B (3D) : Üç Boyutlu
4B (4D) : Dört Boyutlu
AD : Adipoz Doku
Bio-CAM : Biyolojik - bilgisayar destekli üretim
Bioink : Biyomürekkep
BM : Kemik iliği
BT : Bilgisayarlı tomografi
CAD : Computer Aided Design; Bilgisayar Destekli Tasarım
CD : Cluster of Differentiation; Farklılaşma kümesi
c-MYC : MYC proto-oncogene
CT : Bilgisayarlı Tomografi
DCNN / CNN : Derin konvolüsyonel sinir ağları
DF : Dental Pulpa Folikülü
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : Dimetil sülfoksit
DOD : Drop on Demand; Talep üzerine damla
ECM : Ekstraselüler Matriks
EMA : Avrupa Tıp Ajansı
NEAA : Esansiyel olmayan amino asit
FDA : ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FDM : Fused Deposition Modeling; Erimiş Birikim Modelleme
FEM : Sonlu elemanlar yöntemi
FSS : Fetal Sığır Serumu
GelMA : Jelatin-metakrilamid
GFP : Green Fluorescent Protein
GMP : Good manufacturing practice; İyi üretim uygulamaları
HA : Hiyaluronik asit
HLA : İnsan lökosit antijeni
ISCT : Uluslararası Hücresel Terapi Derneği
KLF4 : Kruppel-like factor 4
LOM : Laminated Object Manufacturing; Laminalı Nesne İmalatı

MEMS : Mikro-elektro mekanik system
MKH : Mezenkimal Kök Hücre
ML : Machine Learning; Makine öğrenimi
MRI : Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRI : Manyetik Rezonans Görüntüleme
NANOG : Nanog homeobox
OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4
PET : Pozitron emisyon tomografisi
PBS : Fosfat tampon çözeltisi
PCL : Polikaprolakton
PEG : Polietilen glikol
PGA : Poli-glikolik asit
PGLA : Poli - dl-laktik asit-Ko-glikolik asit
PK : Periferik kan
PLL : Poli-L-lisin
SLA : Işık Aracılı Stereolitografi
SLM : Selective Laser Melting; Seçici Lazer Ergitme
SLS : Selective Laser Sintering; Seçici Lazer Ergitme
SOX2 : Sex determining region Y-box 2
STL : Stereolitografi
WJ : Wharton Jeli
WJ-MSC : Wharton Jel Mezenkimal Kök Hücre
YZ (AI) : Yapay Zeka (Artificial Intelligence)

ÖZET

Özdemir, C. (2021). GFP Geni Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücre Davranışlarının 4 Boyutlu Kültürde Yapay Zeka Kullanılarak Analizi. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, TÜRKİYE.

Hücrelerin moleküler mekanizmalarını ve davranışlarını incelemek için kullanılan iki boyutlu (2B) konvansiyonel hücre kültür sistemleri ucuz ve kolay uygulanabilir olmasına karşın hücrelerin vücut içindeki 3 boyutlu (3B) davranışlarını uygun şekilde taklit edememektedir. Bu eksikliği giderip hücrelerin vücut içerisindeki doğal ortamlarını taklit etmek amacıyla 3B kültür sistemleri geliştirilmiştir. Araştırmalar, 3B kültür ile gerçekleştirilen deneylerin, standart 2B kültüre göre daha doğru sonuçlar verdiğini işaret etmektedir.

Sferoid oluşturma ve 3B biyobaskı (3D bioprinting), 3B kültür ortamı oluşturmak için yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Ancak tüm bu 3B kültür tekniklerinde, özellikle mikroskobik analizlerde ulaşılması gereken bazı teknolojik ilerlemelere ve yeni yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Time-lapse görüntüleme yöntemi ile, hücrelerdeki zamana bağlı çoğalma, ölüm, hücre hareketi gibi değişiklikler izlenebilmektedir. Ancak bu yöntemdeki görüntülerin sayısallaştırılarak kantitatif analiz yapılması özellikle 3B kültürlerde çok zorludur. Ek olarak, deney gruplarının sayısı, elde edilen fotoğrafların adedi ve inceleme süresi arttıkça analiz edilecek datanın miktarı da katlanarak artmakta ve analiz yapmayı zorlaştırmaktadır.

Yapay Zeka (YZ), insan beyninin çalışma prensibini taklit edebilen ve çok sayıdaki veriyi işleyebilen donanım ve yazılımlar bütünüdür. Son yıllardaki YZ çalışmaları, tıbbi görüntülerin analizinde oldukça olumlu sonuçlar vermiştir.

Bu tez çalışmasında; 2B ve 3B kültürlerde, mezenkimal kök hücrelerin (MKH) davranışlarının yapay zeka yazılımları ile zamana bağlı incelenmesi amaçlandı. Hücreleri takip etmeyi kolaylaştırmak için ilk etapta MKH'lere viral transfeksiyonla yeşil florasan protein (GFP) geni aktarıldı. Ardından MKH'ler 3B biyoyazıcıda basıldı veya hidrojeller ya da 2B kültür kapları üzerine ekildi. Hücreler inverted florasan mikroskopta yer alan

inkübasyon düzeneği içerisinde, time-lapse kamera sistemi ile 24 saat boyunca görüntülendi. Bu şekilde X, Y, Z düzlemlerindeki analize ek olarak 4. boyut (4B) olan zamana bağlı görüntüler elde edildi. Seçme fotoğraflar ile eğitim verdiğimiz YZ destekli ZIESS ZEN Intellesis sistemi kullanılarak 200.000'den fazla fotoğraf segmente edildi. Segmentasyon datasındaki alanlar ölçülerek, hücrelerin konfluensi, hareketlilik, tutunma/yüzeyden kalkma, canlılık/hücre ölümü, GFP miktarında değişim gibi içinde bulundukları farklı durumlara dair sayısal verilerin eldesinde kullanılabilecek orijinal formüller geliştirildi.

Çalışmamızda, normal insan işgücü ile tamamlanamayacak kadar fazla sayıdaki analizin, geliştirdiğimiz YZ destekli analiz yöntemleri ve formülasyonlar sayesinde çok daha hassas şekilde ve düşük maliyetle yapılabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre (MKH), 3 boyutlu (3B) biyoyazıcı, Gen aktarımı, Yapay Zeka (YZ), Makine öğrenmesi.

ABSTRACT

Ozdemir, C. (2021). Analysis of GFP Gene Transduced Mesenchymal Stem Cell Behaviors Using Artificial Intelligence in 4D Cultures. Istinye University, Institute of Health Science, Stem Cell and Tissue Engineering. Master Thesis. Istanbul, TURKEY.

Two-dimensional (2D) conventional cell culture systems are used to study the molecular mechanisms and behavior of cells. Despite being cheap and easy to apply, 2D cultures are inadequate to mimic the 3D behavior of cells within the body. 3D culture systems have been developed to overcome this deficiency and to imitate the natural environment of cells in the body. Research indicates that experiments performed within 3D culture give more accurate results than standard 2D culture.

Spheroid formation and 3D bioprinting are some of the methods frequently used to create 3D cultures. However, there is a need for some technological advances and the development of new methods in all 3D culture techniques, especially in microscopic analysis.

Time-lapse imaging method allows observation of changes in cells such as proliferation, death and cell movement, over time. However, quantitative analysis of the images especially in 3D cultures is quite difficult. Additionally, as the number of experimental groups, the number of photographs obtained and the observation period increase, the amount of data to be analyzed increases exponentially, rendering analysis more difficult.

Artificial Intelligence (AI) is a combination of hardware and software which can imitate the working principle of the human brain and can rapidly process huge amount of data. Recent studies on AI have yielded very promising results in the analysis of medical images.

In this thesis study; we examined the behavior of mesenchymal stem cells (MSCs) in 2D and 3D cultures over time, using artificial intelligence. For the purpose of cell tracking, the GFP gene was transferred to the MSCs by viral transfection. MSCs 3D bioprinted or seeded onto hydrogels or 2D culture plates. Cells were observed with time-lapse camera

system of an inverted fluorescent microscope for 24 hours. In this way, in addition to the analysis in the X, Y, Z planes, time-dependent images the 4th dimension (4D), were obtained. The AI-empowered ZIESS ZEN Intellesis system was first trained with selected examples and 200,000+ photos from all experiments were segmented with Intellesis software. By measuring the areas in the segmentation data, novel formulas were developed that can be used to obtain numerical data on different conditions such as confluency, cell mobility, attachment/detachment, viability/cell death, and change of GFP signal intensity.

In our study, we have showed that multiple analyzes that cannot be completed with a normal human labor can easily be done with AI more precisely and at lower cost.

Key Words: Mesenchymal Stem Cell, 3D Bioprinting, Gene transfer, Artificial intelligence, Machine learning.

GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler 2B kültür ortamında kültüre edilirler. 3B ortamda hücrelerin kültüre edilmesi, hücrelerin biyolojik ortamlarına uygun 3B hücre iskeleti ile hücrelerin hücre dışı matrisi taklit edilerek sağlamaktadır. Hücreler 2B ortamda tek bir düzlemde hücre ve çevre ilişkisi sınırlı ortamda çoğaltılmaktadır. Günümüze kadar yapılan *in vitro* deneylerin de neredeyse tamamı bu konvansiyonel yöntemle gerçekleştirilmiştir. Ancak 3B hücre teknolojileri ile hücre hareketi, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimleri çok yönlü ve canlı dokulara daha benzer gerçekleşmektedir. Günümüz teknolojilerinde popüler olan 3B biyobaskı ve doku mühendisliği yöntemleri sayesinde hücrelerin biyolojik ortamlarına uygun kültüre etme imkanı bulmaktayız.

Önceki çalışmalar göstermektedir ki canlı hücre işaretlemesinde kullanılan ve organelleri florasan olarak işaretleyen Mitotracker™, Lysotracker™ gibi ticari boyalar ile yapılan işaretlemelerde hücreleri canlılığında kayıp yaşanmaktadır. Bu boyaların 24 saatten uzun sürelerde kullanıldığında da hücrelerde toksik etki oluşturmaktadır. Bu nedenle mevcut yöntemler hem maliyetli hem de yetersiz kalmakta ve uzun süreli time-lapse görüntüler elde edilememektedir. Bunun dışında vital boya kullanımlarında deney sırasında hücre çoğalması gerçekleştiğinde dışarıdan eklenen boyaların konsantrasyonunda azalma ve ışıma miktarında düşme olduğu gözlemlenmiştir. 2B kültür ortamında işaretlenen hücrelerin takibi kolayca sağlanabilmekle birlikte 3B kültür ortamında hücrelerin takibi problem teşkil etmektedir. Bu bağlamda GFP geninin hücre genomuna entegre edilerek oluşturulabilecek hücre hatlarında çalışarak 3B kültür ortamında hücrelerin takibini kolaylaştırmayı ve analiz etmeyi amaçlayan bir çalışmadır.

Mezenkimal kök hücrelere GFP geninin aktarımı viral transdüksiyon ile gerçekleştirildikten sonra işaretlenmiş hücrelerin seleksiyonu ve çoğaltılması yapıldı. Ardından hücreler çeşitli hidrojeller içerisine alınarak 3B biyoyazıcılarda basıldı. Baskının ardından 3B kültür ortamına alınacak ve hücre davranışları incelendi. Örnekler florasan mikroskopta time-lapse sistemi ile görüntülendi ve hareket, şekil

gibi parametreler açısından incelendi. Elde edilen ardışık fotoğraflarda takip edilen hücrelerin, ortalama hareket mesafesi, hücre sayısındaki artış/azalma, canlılık ve ölüm oranlarındaki değişimler gibi hücrelerin 3B ortamdaki davranışlarına ilişkin kıymetli veriler elde edildi.

Standart iki boyutlu (2B) tek tabakalı (monolayer) hücre kültürü, *in vitro* araştırmalar için standart yaklaşımdır. Ancak hücreler doğal 3 boyutlu (3B) ortamlarının aksine 2B ortamda kültüre edildiklerinde davranışlarında ve morfolojilerinde doğal ortama kıyasla farklılık ortaya çıkmaktadır. Bu sınırlamaları gidermek için, 3B kültür yöntemleri geliştirilmiştir (Biggs vd., 2009). 3 boyutlu matrisler, temel araştırma, rejeneratif tıp veya hücre bazlı ilaç testlerinde hücre büyüme destekleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Sapet vd., 2013). Hücreler karmaşık biyokimyasal ve mekanik ipuçları yoluyla ECM ile etkileşime girip ve biyolojik dokuların özgüllüğünü ve homeostazını koruyan bir 3B ağ kurmaktadır. 3 boyutlu matrisler hücre bağlanma ve büyüme için mekanik platformlar olarak çalışmak ve rejeneratif tıp, kök hücre araştırma ve hücre tabanlı ilaç deneyleri artan ilgi kazanmıştır (Griffith ve Swartz, 2006).

Çalışmada 2 boyutlu ve 3 boyutlu ortamda hücrelerin davranışını, morfolojisini ve proliferasyonunu analiz etmek için Yeşil floresan protein (GFP) proteini işaretçi olarak kullanıldı. GFP, ultraviyole altında yeşil renkte ışık yayan 238 amino asitten (26.9 kDa) oluşan bir proteindir. Hücrelere GFP geni viral yöntemle aktarıldı. DNA genoma entegre olduktan sonra ribozomlardan sentezlenen GFP proteinleri hücrelerin başka bir boyama yapılmaksızın floresan mikroskopta görüntülemesine olanak sağlamaktadır. Hücrelerdeki GFP ekspresyonu ayrıca akış sitometrisi kullanılarak da sayısal olarak ölçülebilmektedir. GFP ile işaretlenmiş hücreler daha sonra çeşitli hidrojeller içerisine aktarılarak, bilgisayarda belirlenen şekillerde 3B olarak biyoyazıcıda basıldı. Baskı sonrasında hücreler time-lapse görüntüleme teknikleri ile 3B olarak görüntülendi.

Böylelikle mezenkimal kök hücrelerin 3 boyutlu ortamdaki takibi yapılarak jelin şişme ve biyobozunma miktarı, hücrelerin ortalama hareket mesafesi, hücre sayısındaki artış/azalma, canlılık ve ölüm oranlarındaki değişimler gibi hücrelerin 3B ortamdaki

davranışlarına ilişkin kıymetli veriler elde edildi. Canlı 3 boyutlu yapıları *in vitro* olarak üretmek için çok sayıda yaklaşım uygulanmış olsa da birçok durumda *in vivo* işlevselliğin gösterilmesi sağlanmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, 3 boyutlu baskılı implante edilebilir doku ikameleri için tam biyolojik potansiyel belirsizliğini korurken, gelecekte insanlara implante edilebilir yapay doku ve organların oluşturulması ve rejeneratif tıp alanında kullanılabilmesi için hücrelerin 3B ortamdaki özelliklerinin daha iyi öğrenilmesi gerekliliktir (Cidonio vd., 2019). Çalışmamız bu konudaki önemli bir açığı kapatmayı amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, hücre ölümü, dejenerasyon, yaralanma gibi hasarlarla ortaya çıkan kardiyovasküler hastalık, otoimmün hastalık, nörolojik hastalık gibi birçok hastalık için potansiyel bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Hücre tedavisi, rejeneratif tıp, doku mühendisliği ile birlikte farmasötik ve biyoteknolojik uygulamalar için kök hücreler önemli bir yere sahiptir ve bu alanlarda kök hücreler araştırma ve klinik olarak kullanılmaktadır (Dai vd., 2018; Karaoz vd., 2009; Öksüz vd., 2015; Yilmaz vd., 2013).

Kök hücreler üç temel fonksiyonel özelliğe sahiptir. Kök hücreler, kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptir, olgun olmayan hücrelerdir ve izolasyon kaynaklarına göre kendi kendini yenileme kapasitelerine bağlı olarak kalp, sinir, kan ve kıkırdak gibi birçok özel hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir (Karaoz vd., 2009).

Totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere kök hücreler farklı kapasitelere göre sınıflandırılmaktadır. Totipotent kök hücreler, sınırsız çoğalma özelliğine sahiptir. Programlanmış kök hücreler, plasenta hariç ektoderm, endoderm ve mezoderm karakteri ile tüm germ hücrelerine dönüşerek tüm organları ve dokuları oluşturabilir. Multipotent kök hücreler, tek bir germ tabakasında farklılaşmak için programlanmış yetişkin kök hücrelerdir ve kendi kendini yenileme özelliğine sahiptir. Oligopotent kök hücreler, belirli bir doku veya organda iki veya daha fazla hücre tipine farklılaşabilen kendi kendini yenileme özelliklerine sahiptir. Unipotent kök hücreler, sadece tek bir hücre serisine dönüşebilen kendi kendini yenileme kapasitesine sahiptir (Kolios ve Moodley, 2012).

Embriyonik kök hücreler, Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), Sex determining region Y-box 2 (SOX2), ve Nanog homeobox (NANOG) gibi transkripsiyon faktörlerinin kontrol ağı ile oluşmakta ve implantasyon öncesi erken gelişim döneminde embriyonik blastositlerin iç hücre kütlesine yerleşen hücrelerden türetilmiştir. Bunlar sınırsız olarak yenilenebilen ve çok sayıda farklı hücreye dönüşme pluripotent yeteneğine

sahip hücrelerdir. İnsan embriyonik kök hücrelerinin çalıCşılması, etik, politik ve dini sorunlar nedeniyle dünya çapında bilimsel araştırmalarda kullanımının sınırlandırılması olmuştur (Yamanaka, 2020).

Dört transkripsiyon faktörünün ektopik ekspresyonu ile indüklenen pluripotent kök hücreler, OCT4, SOX2, Kruppel-like factor 4 (KLF4), and MYC proto-oncogene (c-MYC faktörlerinin ekspresyonları türetilir ve yükseltilir. Japon araştırmacı Yamanaka ve ark. 2006 yılında, kök hücre araştırmalarına yeni bir soluk getiren dört transkripsiyon faktörü kullanarak farelerden ve insanlardan türetilen fibroblast hücrelerini yeniden programlayarak indüklenmiş pluripotent kök hücreleri (iPSC) elde etmişlerdir (Yamanaka, 2012).



Şekil 1: Kök Hücrenin Sınıflandırılması.

1.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), ilk kez kemik iliğinden izole edildi (Karaöz vd., 2017). Daha sonraki çalışmalarda farklı kaynaklardan izole edilmiştir. MKH'ler, kemik iliği (BM), adipoz doku (AD), Wharton jeli (WJ), periferik kan (PK), kordon kanı, plasenta, diş hamuru diş folikülü (DF), süpernümerary diş kaynaklı kök hücrelerden ve periodontal ligamentten üretilebilmektedir (Karaoz vd., 2010; Karaöz vd., 2010, 2017). Bağ dokuda bulunan ve farklılaşma özelliğine sahip olan erişkin kök hücreler mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılır. Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT) tarafından MKH özelliklerini tanımlayan liste yayınlanmıştır. MKH, plastik-yapışık hücreler olarak *in vitro* olarak çoğalan heterojen bir hücre popülasyonu olarak karakterize edilir. MKH, hücre yüzey belirteçleri CD11b, CD14, CD34, CD45 ve insan lökosit antijeni (HLA)-DR için negatif olmakla birlikte CD73, CD90 ve CD105 pozitifliği ile ayırt edilir (Frausin vd., 2015; Karaoz vd., 2009). En önemlisi, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik yönde farklılaşma özelliğine sahiptirler. Alizerin Red, Alkalin Blue ve Oil Red O ile immunohistokimyasal boyamaları yapılarak hücrelerin farklılaşma özellikleri gösterilir. Bu özelliklere sahip hücrelere MKH denilebilir. MKH'ler yaralanma ve ihtiyaç durumlarında gerekli bölgeye giderek ve çözülebilir faktörler salgılayarak onarım gerçekleştirebilirler. Farklılaşma yeteneklerinin fazla olması ve stromal destek sağlayarak doku hücrelerinin fonksiyonlarına katkı gösterebilmeleri nedeniyle klinik olarak da sıklıkla kullanılmaktadırlar. Çeşitli çalışmalar MKH'lerın osteositler, adipositler ve kondrositler ve kardiyomiyositler, retina progenitörleri, fotoreseptörler, hepatosit benzeri hücreler, kanal bezi adacıkları ve sinir hücrelerine farklılaştığını göstermiştir. Bir diğer avantaj ise immunsupresif ve non-immunojenik özellikte olmalarıdır. Mezenkimal kök hücreler diyabet, kalp rahatsızlıkları, yaralanma gibi birçok hastalık için potansiyel tedavi yöntemi kabul edilmiştir (Aras vd., 2016). MKH'ler, omurilik yaralanmaları, otoimmun hastalıklar, nörolojik hastalıklar, Graft-versus-host hastalığı (GVHD) gibi hastalıklarda tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Allojenik ve göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücre tedavisi yaygın olarak yapılmaktadır (Kabataş vd., 2018; Karaöz vd., 2017; Okur vd., 2018). MKH'ler, doku mühendisliğinde de büyük role sahiptir (Korurer vd., 2014).

1.2. 2B ve 3B Hücre Kültürü

Mezenkimal kök hücreler klasik yöntem olarak 2B kültür ortamında kültüre edilirler. Mezenkimal kök hücreler, iki boyutlu (2B) plastik kültür plakalarında tek tabakalı olarak yayılır. Mezenkimal kök hücrelerin adherent yani kültür plakalarına yapışma özelliği ile kültür yapılır. Hücreler, substratlar, sitokinler, büyüme faktörleri, serum ile birlikte hücre besi yerinde (medyum) kültüre edilir. İki boyutlu ortam hücrenin şeklini ve geometrisini değiştirir, hücrelerin düz bir şekilde kültür tabakasına yapışmasına ve iç hücre iskeleti ve moleküler düzeydeki değişikliklere yol açar, bu da gen ve protein ekspresyonunu değiştirmesine neden olur. Tek tabakalı kültür, hücrelerin büyük ölçekli genişlemesi, hücrenin şeklini ve geometrisinin aynı kalması ve hücrelerin kendini yenilemesini korumak için 3 boyutlu kültüre kıyasla daha verimsizdir. Farklı hücre türlerinde kültür koşullarını optimize etme ihtiyacı bulunmaktadır (Chandrasekaran vd., 2017; Souza vd., 2018).

Klinik uygulamalar için yüksek kalite ve hücre miktarı kullanılmalıdır. MKH'ler tedavi için GMP (Good manufacturing practice; İyi üretim uygulamaları) laboratuvarlarında üretilir (Dai vd., 2018). İyi üretim uygulamaları kapsamında, hücrelerin bakımı ve çoğaltılması için plastik kültür plakaları ve zenojenik ortam kullanan GMP laboratuvarlarında iki boyutlu (2B) kültür teknikleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler, proliferasyonun uzun vadeli aşamasında çoğalma ve farklılaşma kapasitesinin kaybı riskini taşır. Bununla birlikte, son zamanlarda kültür ortamında yeni yaklaşımlar uygulanmaktadır. Üç boyutlu (3 boyutlu) kültür ortamı bu yeni yaklaşımlardan biridir. MKH'ler *ex vivo* ortamda özelliklerini kaybetmekte ve terapötik potansiyeli azalmaktadır. Bu nedenle başvurulan kültür optimizasyonu ve hücrelerin vücut içine benzer 3B ortamda kültüre edilmesi ile bu engeller aşılabilir (Hamann vd., 2019).

Kök hücre tedavileri, kemirgenler gibi küçük hayvan modellerinde hastalıklı veya yaralı dokulara uygulandığında başarılı olmuştur. Büyük hayvan modellerinde ve insanlarda yapılan klinik çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. En iyi sonuçlar çoğunlukla rejeneratif olmayan ve parakrin etkileri ile sınırlı olarak kabul edilen sadece küçük faydaları desteklemektedir. Bu durum, geliştirilmiş hücre–hücre etkileşimleri ve koruyucu kendi kendine salgılanan hücre dışı matris (ECM) katmanı ile 3B hücresel

agregatların kullanımı ile önemli ölçüde iyileştirilmemiştir. Son zamanlarda, kültürlü pluripotent kök hücrelerin organa özgü hücrelere farklılaşabileceğini ve bağırsak veya böbrek organoidleri gibi küçük 3B organ benzeri yapılara daha fazla kendi kendini organize edebileceğini gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu stratejilerin veya *in vitro* organ gelişim yaklaşımlarının hiçbiri, biyolojik yapıları fonksiyonel zenginlik, çok ölçekli yapı ve canlı bir dokunun büyüklüğü ile yeniden yaratma yeteneğini henüz göstermemiştir. Hasarlı dokuları ve organları onarabilecek rejeneratif tıp stratejilerine büyük çaba sarf edilmiştir. 1960'ların başlarında ilk ortaya çıkmasından bu yana, rejeneratif stratejiler, ilk kök hücre transplantasyonundan günümüzün yapay doku benzeri yapılarının 3B biyofabrikasyonuna uzun bir yol kat etmiştir (Castilho vd., 2020).

Üç boyutlu (3B) kültür metodunda hücrenin *in vivo* mikroçevresini (niş) taklit ederek yeni yaklaşımlar uygulanmaktadır. 3B hücre kültürü stratejileri, klasik 2 boyutlu kültürlere kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir ve biyolojik çevrede hücre dışı matrisi (ECM) ve yakın hücreleri taklit etmek ve böylece hücrelerin çok doğal bir yöntemle *in vitro* büyümesine olanak sağlamak için tasarlanmıştır. Hücreler 2B ortamda tek bir düzlemde hücre ve çevre ilişkisi sınırlı olmaktadır. 3B hücre teknolojisinde hücre hareketi, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimi çok yönlü ve biyolojik doku benzeri olmaktadır. Günümüz teknolojisinde popüler olan 3B biyobaskı ve doku mühendisliği sayesinde hücrelerin biyolojik ortamlarına uygun kültüre etme imkanı bulmaktadır.

1.3. Eklemeli Üretim ve 3B Baskı

Konvansiyonel üretim teknolojileri, döküm, enjeksiyon veya kalıplama gibi sistemlerle plastik, cam, seramik, metal gibi malzemelerin kullanımına dayanır. En çok kullanılan tekniklerden eksiltmeli üretim yöntemi, büyük bir kalıptan yontma, kesme gibi işlemlerle daha küçük malzemeler üretilmesi sürecidir. Eklemeli üretim (additive manufacturing) ise malzemenin tabakalar halinde üst üste eklenmesiyle ürün elde edilmesine dayanır. 3B baskı (3D printing) yöntemi de eklemeli üretim yöntemlerinin başında gelmektedir.

Farklı malzeme formlarının eklemeli üretimine olanak tanıyan geniş bir teknoloji yelpazesine sahip 3B yazıcıların gelişmesi ile klinik olarak da kullanılabilecek

hassasiyete sahip ürünler elde edilebilmiştir. Günümüzde, medikal kullanımlar için tıbbi sınıf seramik, metal ve polimerleri basabilen özel yazıcılar bulunmaktadır. 3B baskılı implantların, çoğunlukla sınırlı serilerde olmasına rağmen, klinik olarak kullanıldığı birçok durum vardır. Aynı teknoloji, 3B baskılı yapıların cerrahi simülasyon gibi amaçlarla kullanımına da uygundur (Nagarajan vd., 2018).

3B baskı teknolojileri, 1980'li yılllarda icat edilen Stereolitografi baskı tekniğinden kaynaklanmaktadır (Li vd., 2017). 3B baskı, katman katman oluşturma işlemi ile karmaşık mimariyi yüksek hassasiyetle imal etmek için kullanılan hızlı prototipleme ve katkı üretim tekniğidir. Bu otomatik, katkı işlemi, yüksek tekrarlanabilirlik sağlar ve tekrarlanabilirlik ile dış şekil, iç gözenek geometrisi ve ara bağlantı gibi hassas kontrollü mimariye sahip 3B ürünlerin üretimini kolaylaştırır. 3D baskı, ışık aracılı Stereolitografi (SLA), Erimiş Birikim Modelleme (Fused Deposition Modeling; FDM), Seçici Lazer Sinterleme (Selective Laser Sintering; SLS), Seçici Lazer Ergitme (Selective Laser Melting; SLM), laminalı nesne imalatı (Laminated Object Manufacturing; LOM), Mürekkep Püskürtmeli Baskı (Inkjet Bioprinting) ve Ekstrüzyon Biyobaskı (Extrusion-based Bioprinting) gibi birçok işlemi içerir. 3B baskı, özellikle yapısal tasarım, malzeme seçimi ve mühendislik üretimi için mühendislik teknolojisine odaklanmaktadır (Li vd., 2017). 3B biyobaskı, gelişim biyolojisi, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp kavramlarına katkı sağlamaktadır. 3B biyobaskı birden fazla karmaşık kompozisyon üzerinde tam kontrol ve mekansal dağılımlar açısından mimari doğruluk sağlar. 3B biyobaskı, hastaya özgü tedavi için doku oluşumunu daha iyi yönlendirmek için hücrelerin, proteinlerin, DNA'nın, ilaçların, büyüme faktörlerinin ve diğer biyoaktif maddelerin yerleştirilmesi üzerinde hassas kontrol de sunmaktadır (Li vd., 2017).

1.3.1. Bilgisayar Destekli Tasarım (Computer Aided Design; CAD), Modelleme ve Baskı Süreci:

Biyobaskı dokuları başarılı bir şekilde oluşturmak için, baskı yollarını belirlemek, uygun biyomalzemeleri seçmek, biyobaskı kontrol etmek ve baskıdan sonra kalite kontrolü yapmak gerekir (Li vd., 2017; Murphy ve Atala, 2014; Zhuang vd., 2018). Klasik biyobaskı sürecinde: (1) baskı geometrisini çizilir ve fizibilitesi manuel olarak doğrulanır; (2) uygun hücre tipleri ve hidrojeller seçilir (protokoller belirlenir); (3) biyobaskı sisteminde biyomalzeme yükleme, dizayn yolları; (4) biyobaskı bir bilgisayar kontrolü

altında biyomalzeme ile yapılar oluşturur; (5) biyobaskı yapılan doku biyobaskıdan sonra mikroskop ile kontrol edilir. Biyobaskı işleminden sonra, başarılı bir şekilde basılmış yapılar kültür için bir inkübatöre aktarılır.

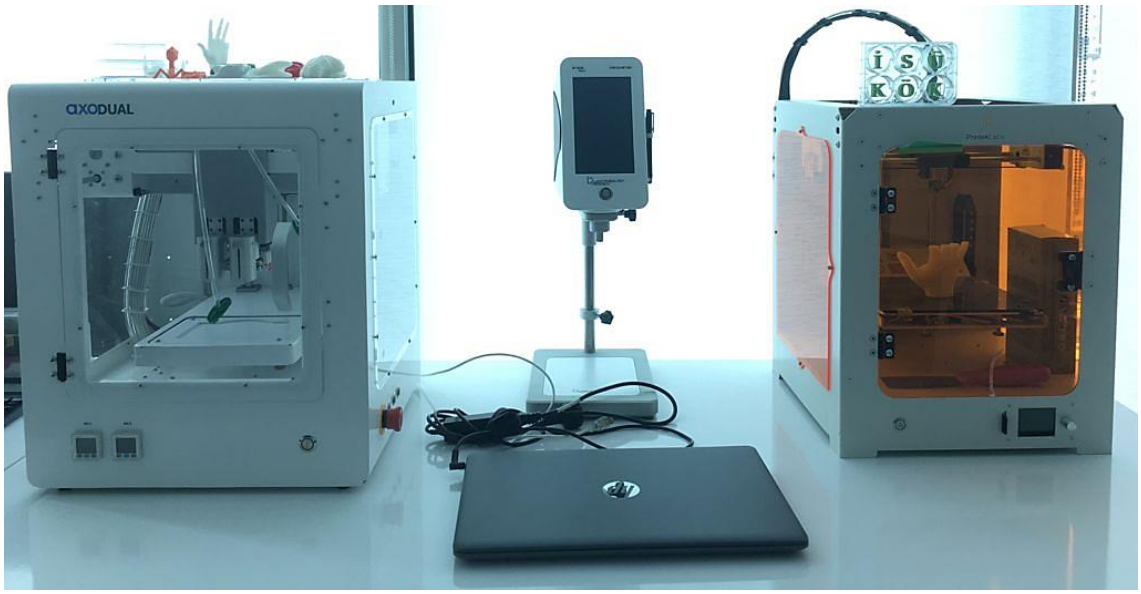
Biyobaskı işlemi şu anda tamamen otomatik değildir ve çeşitli aşamalardaki birçok manuel aşama, yavaş işleme hızlarına neden olabilir ve hata olasılığını artırabilir. Baskı kalitesini sağlamak ve baskı sürecini iyileştirmek için birçok araştırmacı, Bilgisayar Destekli Tasarım (Computer Aided Design; CAD) ve biyobaskı için modelleme teknolojisini araştırmıştır. Bu CAD teknikleri, tasarım sürecine yardımcı olmak ve hızlandırmak için bilgisayar otomasyon sistemlerini kullanabilir.

3B yazılımları, histolojik kesit alımına benzer şekilde, CAD sistemleri ile oluşturulmuş 3B modelini, yazıcının basabileceği kalınlıklarda dilimleyip her bir dilimin baskısında cihazın takip edeceği baskı yolları oluşturur. Bu tabakaların kalınlığı genellikle belirli bir yazıcının çözünürlüğü olarak adlandırılır ve genellikle kullanılan makineye ve malzemeye bağlı olarak 100-500 μm aralığındadır. Bu araç yolları, her katman için biyobaskı tarafından okunan ve yürütülen talimatlardır ve malzeme seçimlerini içerebilir. Katmanlar sırayla oluşturulur ve model, 2B katmanlardan oluşan bir koleksiyondan bir 3D nesne oluşturan bir katkı işleminde oluşur.

Manyetik rezonans (MR), bilgisayarlı tomografi (BT) gibi klinik görüntüleme teknikleri, hastaların *in vivo* doku dağılımı hakkında bilgi verebilir ve görüntü işleme ile anatomik olarak gerçekçi doku geometrileri belirlenebilir. 3B biyoyazıcılarla basılabilecek bu yapılar gelecekte isteğe bağlı doku üretimi için başlangıç noktası olma potansiyeline sahiptir (Mandrycky vd., 2016; Zhuang vd., 2018). Biyo-bilgisayar destekli üretim (Bio-CAM) tekniğinin tanıtımı, biyo-baskı yolu üretiminin otomasyonunu önemli ölçüde geliştirdi. Yapay Zeka (YZ) (Artificial Intelligence; AI) teknolojilerinin ilerlemesi sayesinde YZ yazılımları kullanılarak MR ve BT görüntüleri daha kolay ve hızlı şekilde tanımlanabilir hale gelmektedir. Bu bağlamda YZ ile entegre edilmiş bir 3B tasarım atölyesi, hastalara ait görüntülerden kısa sürede 3B modeller oluşturabilecektir (Mandrycky vd., 2016; Zhuang vd., 2018).

1.3.2. 3B Biyobaskı

3B biyobaskı (3D Bioprinting), canlı hücreler yüklenmiş hidrojelleri (biyomürekkep) biyoyazıcılar aracılığıyla katman katman yerleştirmeyi amaçlayan bir sistemdir. 3B Biyoyazıcılar, insan doku oluşumu ve onarımı için doku ve organ rejenerasyonunu çalışmalarında bir mühendislik teknolojisi olarak büyük önem taşımaktadır (Kang vd., 2016). 3B doku mühendisliği ile çeşitli hastalık ve yaralanmalarda tedavi amacıyla kullanılabilecek, kolayca implante edilebilir 3 boyutlu yapılar oluşturulabilmektedir (Murphy ve Atala, 2014). Biyobaskı, rejeneratif tıp için yenilikçi bir mühendislik stratejisi olarak ön plana çıkmıştır. 3B baskılı hücre implantları, insan dokularının üç boyutlu mikro çevresini taklit ederken, insan doku mimarisini yeniden yapılandırmayı da amaçlamaktadır (Cidonio vd., 2019). Bu yenilikçi doku mühendisliği teknolojisi, doku üretimi için sunduğu avantajların yanında birtakım zorluklara da sahiptir. Hücre baskısında kullanılan biyomalzemelerin, ekstraselüler matriksin (ECM) fiziksel ve kimyasal özelliklerini taklit etmesi ve baskı sırasında uygun akışkanlığa izin vermesi gerekmektedir. Ek olarak yeniden modelleme ve rejenerasyon tamamlanana kadar baskı sırasında gömülü hücrelerin canlılığını koruma becerisi doku mühendisliğindeki sorunlardandır (Cidonio vd., 2019; Hu vd., 2016).



Şekil 2: Laboratuvarımızda bulunan 3B yazıcı (sağda) ve 3B Biyoyazıcı (solda).

Günümüze dek biyobaskı araştırmalarında, mühendislik kısımlarının yanı sıra hücre şeklini ve işlevselliğini etkileyen faktörlere de odaklanılmıştır (Blaeser vd., 2016; Cidonio vd., 2019; Ribeiro vd., 2018). 3 boyutlu biyobaskı yapıları, uzun süreli hücre sağ-kalımı, fenotipi ve fonksiyonu için de değerlendirilmelidir (Cidonio vd., 2019; Cui vd., 2010; Nair vd., 2009). Büyük hücre yüklü implantların üretimine izin vermek amacıyla maksimum canlılık ve işlev için optimal bir hücre yoğunluğuna ulaşmanın zorluğunu ve implante edilmiş yapıların hızlı vaskülarizasyonu gereksinimi bulunmaktadır (Cidonio vd., 2019; Daly vd., 2018; Kolesky vd., 2014). Büyük boyutlu yapıları *in vitro* olarak üretmek için çok sayıda yaklaşım uygulanmış olsa da birçok durumda mekanik bileşenler incelenmiş, hücrelerin morfolojik yapısı ve davranışları üzerinde yine çok durulmamıştır (Cidonio vd., 2019). Bu alanda kök hücrelerle yapılan çalışmalar ise daha da sınırlıdır.

1.3.2.1. Çapraz Bağlama

Biyomürekkep ve substrat arasındaki ilişki ile belirlenen polimerlerin mükemmel basılabilirliği, doğru ve yüksek kaliteli biyobaskı malzemeleri sağlar (Liu vd., 2018). Polimerlerin basılabilirliği büyük ölçüde belirli uygulamalara dayalı polimer çözeltisinin hidrofilik ve hidrofobik özelliklerine bağlıdır. Ayrıca, büyük ölçüde yüzey gerilimine, iki yüzey veya ortam bileşenleri arasındaki temasın ölçülmesine bağlıdır. Bu, hücre yapışmasının, proliferasyonunun ve suların veya iskelelerin oluşumunun, destekleyici malzemenin yüzey geriliminden büyük ölçüde etkilendiğini göstermektedir. 3B iskele üretimi sırasında, hidrojel ön polimer çözeltisinin yüzey gerilimi dikey yönde tutulmalı ve substrat ile geniş temas açıları korunmalıdır, ancak substrat üzerinde tamamen düz olmamalıdır. Bu, hidrojel ön polimer çözeltilerinin biyobaskı üzerine yüksek mukavemetli yapılar oluşturduğu petri kapları kullanılarak elde edilebilir. Biyobaskı, polimerik malzemelerin çapraz bağlanma kabiliyeti ile de büyük ölçüde sınırlıdır. Genel olarak, tüm biyomürekkepler, biyobaskıdan sonra hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını desteklemesi gereken yarı-iskele yapıları oluşturmalıdır. Bu koşullar, foto, kimyasal veya çapraz bağlayıcı polimerler olan hidrojel ön polimer çözeltileri kullanılarak yerine getirilebilir (Aljohani vd., 2018). Biyomalzemeler sıcaklık, UV, ısı, ışık veya kimyasallarla çapraz bağlanır. GelMA UV ile, aljinat $CaCl_2$ ile aljinat-jelatin bileşimi $CaCl_2$ ile çapraz

bağlanmaktadır. Agoroz $CaCl_2$ ile çapraz bağlanmaktadır. (Liu vd., 2018; Zhang ve Wang, 2019).

Tek bir malzemeden oluşan biyomalzeme, basılabilirlik, çapraz bağlantı yeteneği, mekanik özellikler ve hücrelerle etkileşim açısından doku ve organ 3B baskısının gereksinimlerini karşılamak için genellikle zordur. Bu nedenle, daha fazla gereksinimi karşılamak için, kompozit biyomürekkep yapımı, 3B biyobaskının önemli görevlerinden biridir.

1.3.2.2. 3B Biyobaskıda Kullanılan Malzemeler

Biyomalzemeler, doğal malzemeler, sentetik malzemeler, seramikler, metaller ve kompozitler olarak sınıflandırılır. Biyomalzemeler, bozunmaya dayalı olarak, doku ile etkileşimlerine göre biyoinert, biyoaktif ve biyobozunur malzemeler olmak üzere sınıflandırılır. Biyoinert malzemelerin doku ile etkileşimleri mekanik bağ şeklindedir, yani malzemen in dokuyu değiştirmeden doku ile bir arada bulunması anlamına gelmektedir. Biyoaktif malzemeler, kemikle ya da canlı organizmanın yumuşak dokusu ile kimyasal bağ yaparak etkileşirler. Biyobozunur malzemeler ise biyolojik olarak bozunarak zamanla canlı dokular ile yer değiştirir (Datta vd., 2020).

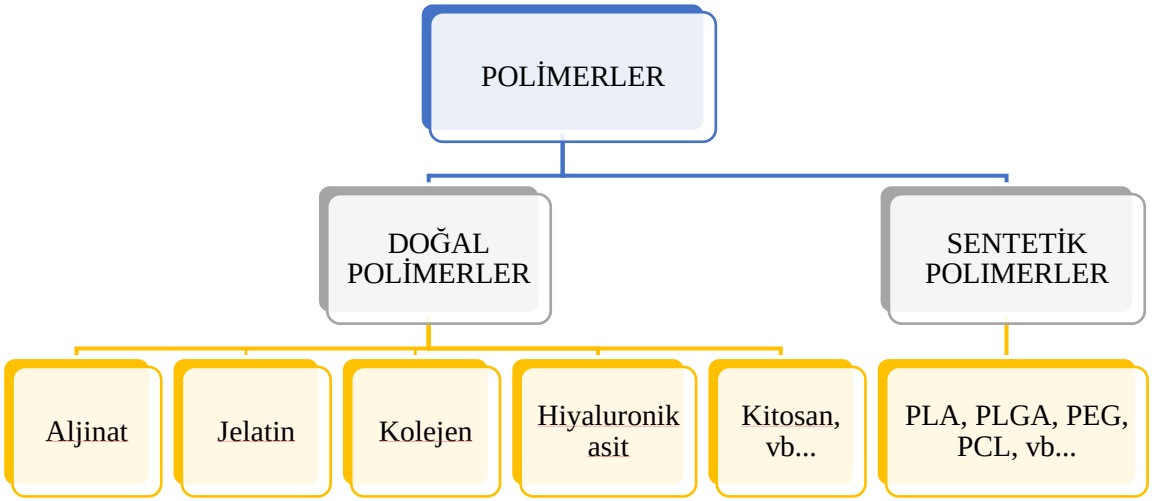
Baskı hızı, baskı basıncı ve hareket mesafesi, 3B biyobaskı sırasında hücre canlılığını doğrudan etkiler. Biyomalzemenin ana rolü, hücreleri kartuşa yüklemek ve baskı sırasında hücre dışı matrise benzer bir dış destek ortamı sağlamaktır. Biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumlu özelliklere sahip, biyobaskı için uygun biyomalzeme seçmek önemlidir. Viskozite, yüzey gerilimi ve çapraz bağlama özellikleri olmak üzere biyomalzemenin üç parametresi vardır. Bu parametrelerin baskı doğruluğu ve hücre yükleme kapasitesi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Örneğin, polimer çözeltisi zayıf akışkanlığa sahip daha yüksek bir viskoziteye sahiptir, böylece şekil yapısı baskıdan sonra uzun süre muhafaza edilebilir. Bununla birlikte, yüksek viskoziteli çözeltiler de daha yüksek basınç gerektirir, dolayısıyla da hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir (McKee ve Chaudhry, 2017).

Hücreler, karmaşık biyokimyasal ve mekanik yollarla ECM ile etkileşime girer ve biyolojik dokuların özgüllüğünü ve homeostazını koruyan 3B bir ağ kurar. Bu ağı taklit etmek için biyomalzemeler kullanılmaktadır. 3B biyoyazıcılarda kullanılan malzemelere

de biyomürekkep (bioink) adı verilmektedir (Griffith ve Swartz, 2006). 3B hücre kültürü için çok sayıda biyomalzeme incelenmiştir. Doğal ve sentetik biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen biyomalzemeler, çeşitli biyolojik sinyaller ve farklı derecelerde mekanik mukavemet sağlayabilir. Biyomalzemeler hücrelerin yenilenmesine veya doğrudan spesifik soylara farklılaşmasına yardımcı olmak için kök hücre mikroçevresinin biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerini taklit etmek için *in vitro* kültürde kullanılır (Bratt-Leal vd., 2011).

Ayarlanabilir mekanik özelliklere sahip iskeleler, hücre canlılığı, proliferasyon ve farklılaşmanın modülasyonuna izin verir. İskele yapıları, süspansiyon kültüründe kök hücre canlılığını ve büyümesini olumsuz yönde etkileyen hücre agregasyonunu hafifletebilir. İskeleler ECM çevresinde kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma için gerekli olan sitokinler veya büyüme faktörleri gibi çözünür faktörleri de içerebilir (Kraehenbuehl vd., 2011). Kök hücrelerin 3 boyutlu kültürlenmesi için iki tip iskele kullanılır. Sert iskeleler hücre ekimi veya hücrelerin iskeleye göç etmesini gerektirir. Bu iskeleler, farklılaşma protokolleri için sıklıkla kullanılır, çünkü substrat sertliği ve mekanik ve biyomateryal sinyalizasyon kök hücrelerin farklılaşması için önemlidir. İkinci tip ise iskelelerde hücrelerin çevresi, enkapsülasyon adı verilen işlemle, biyomalzeme ile kaplanmaktadır. Biyomalzemelerin birbirleri ile etkileşerek 3B stabil iskeleler oluşturmaları genellikle çeşitli çapraz bağlama yöntemleri ile sağlanmaktadır.

Fiziksel çapraz bağlı iskelelere genellikle tersinir jeller denir ve mekanik olarak zayıf iskelelerde, pH veya sıcaklıktaki tersinir değişiklikler yoluyla elde edilebilir (Wang ve Heilshorn, 2015). Biyomalzemelerden yapılmış hidrofilik hidrojel iskeleler, doğal dokunun tamamen hidratlı ekstraselüler matriksini taklit ettikleri için genellikle kök hücre kültürü için kullanılır (Fisher vd., 2010). Hidrojellerin bileşenleri, *in vitro* hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını ve *in vivo* hücrelerin entegrasyonunu desteklemek için ilaçlar, sitokinler ve büyüme faktörleri ile de değiştirilebilir (Benoit vd., 2006; Van Tomme vd., 2008).



Şekil 3: Polimerlerin Sınıflandırılması.

Bioink olarak kullanılabilecek malzemeler arasında doğal malzemeler ve sentetik malzemeler bulunur.

A. Doğal Polimerler

Doğal malzemeler arasında sodyum aljinat, ipek fibroin, kitosan, kollajen, jelatin, fibrin ve polisakaritler (hiyaluronik asit, nişasta, kitosan ve aljinat) gibi malzemeler sayılabilir.

Kollajen ECM'nin ana bileşeni olup bağ dokulara sağlamlık vermektedir (Zhang ve Wang, 2019). Kollajen Tip 1, kollajenin en zengin formudur ve biyomedikal araştırmalarda en çok araştırılan polimerdir (Fernandes vd., 2009; Newland vd., 2013). Jelatin, kolajenin asidik veya bazik işlenmesiyle elde edilen denature bir proteindir. Kullanılan izolasyon prosedürüne bağlı olarak pozitif veya negatif yük kazanmaktadır (Young vd., 2005).

Matrijel, Engelbreth-Holm-Swarm fare sarkomu hücrelerinin bazal membranından yeniden oluşturulan proteinler (Tip 4 kollajen, laminin), büyüme faktörleri, proteazlar ve diğer çeşitli bileşenlerin bir karışımdır. Hücre kültürüne destek olarak pasif rollerinin yanı sıra, 3B matriksler ile çeşitli terapotik uygulamalarda da kullanılmaktadır (Sapet vd., 2013).

Aljinat, MKH'lerin kök hücre özelliğini koruyarak biyobasılmasını sağlayan bir biyoinert hidrojeldir. Baskı işlemi sırasında katlanılan (~5 kPa'lık) kayma-gerilme kuvvetlerinin, baskı sonrası canlılık ve proliferasyon oranı üzerinde büyük bir etkisi olduğu, ancak aljinat kullanımının MKH fenotipi üzerinde saptanabilir bir etkisi olmadığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Blaeser vd., 2016). Aljinat ve jelatin, suda çözünmeyen, şişebilen çapraz bağlı hidrojeller oluşturduğundan 3B biyobaskıda biyomürekkep hammaddesi olarak sıklıkla kullanılan polimerlerdir (Aroguz vd., 2014).

Hiyaluronik asit (hiyaluronan) kök hücre nişlerinin ECM' sinin önemli ve bol bulunan bir bileşenidir. Aljinattan farklı olarak, hiyaluronik asit, CD44 gibi reseptörler aracılığıyla kök hücre bağlanmasını destekler. Ayrıca farklılaşmamış ve proliferatif durumlarda kök hücre özelliklerinin korunması etkisine de sahiptir.

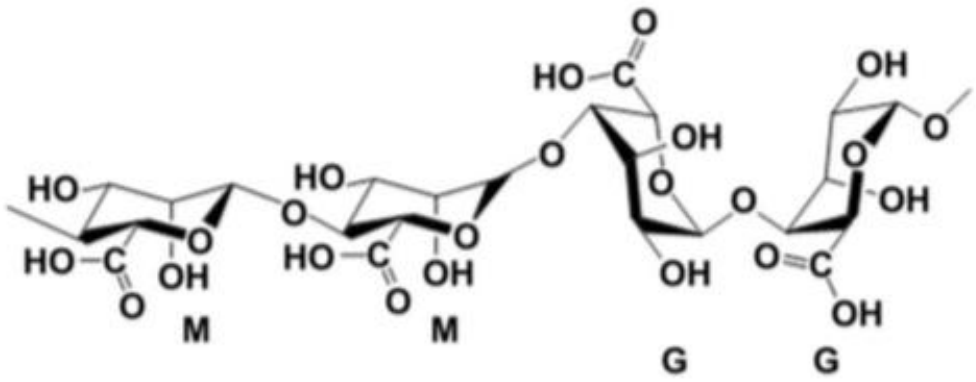
Örneğin bir çalışmada, rekombinant örümcek ipek proteinlerinin yeni bir biyomürekkep sistemi olarak potansiyeli değerlendirildi. Sonuçlar, bu tür örümcek ipek iskelelerinde hücrelerin en az bir hafta boyunca iyi bir canlılıkla yapışabildiğini ve çoğaldığını göstermiştir. Örümcek ipek proteinine bir hücre bağlama motifinin tanıtılması, hücre-malzeme etkileşimleri üzerinde ince ayarlı kontrol sağladığı gözlemlenmiştir (Li vd., 2017; Liu vd., 2018; S. Zhang ve Wang, 2019; Zhuang vd., 2018).

Agaroz, fibronektin, kollajen Tip 1, hiyaluronik asit, kitosan ve aljinat dahil olmak üzere doğal biyomateryaller işlevselleştirilebilir, ancak genellikle biyolojik sinyalleri hücrelere aktardıkları için in vitro olarak kontrol edilmesi daha zordur (Kraehenbuehl vd., 2011).

i. Aljinat:

Deniz yosunundan izole edilen bir polisakkarit olan aljinat, kalsiyum gibi iki değerlikli iyonların varlığında yumuşak jelleşme özellikleri nedeniyle 3B biyobaskıda yaygın olarak kullanılmakta ve hidrojelleri dayanıklılık sağlamaktadır. Aljinat biyouyumlu bir malzemedir ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yara pansuman malzemesi olarak insan kullanımı için onaylanmıştır (Nair vd., 2009). Bir çalışmada, endotel hücreleri ve aljinat kullanılarak 3B biyobaskı yoluyla doku iskeleleri oluşturmuş, enkapsüle edilmiş hücreler üzerinde hücre canlılığı çalışmaları yapılmış, canlılık %83'ün üzerinde bulunmuştur (Dolati vd., 2014). Bir başka

çalışmada, mikrovasküler kanalların doğrudan basıldığı vasküler sistem üretimi için yeni bir pratik teknik gösterilmiştir ve aljinat bazlı vasküler kanallar, mekanik özellikleri iyileştirmek için karbon nanotüpler kullanılmıştır. Birçok çalışmada aljinat bazlı hidrojeller kullanılmıştır fakat aljinatta hücre canlılığı ile ilgili dezavantajlar mevcuttur (Li vd., 2017; Xiong vd., 2013; Zhang ve Wang, 2019; Zhuang vd., 2018). Saf sodyum aljinat iskeleleri iyi hidrofilik özelliklere sahip olmadığından hücrelerin malzeme içinde etkileşime girmesi, çoğalması ve hatta ayırt edilmesi zor olmaktadır. Sodyum aljinat düşük konsantrasyonda kullanıldığında hücrelerin hayatta kalma oranını korumakta yükselen dozla birlikte canlılık azalmaktadır. Ancak aljinat oranı azaldığında hidrojelin mekanik mukavemeti de zayıf olmaktadır. Bu nedenle, sodyum aljinatın oksidasyonu veya RGD peptidleri veya kollajen ile modifikasyonu, sodyum aljinat iskelelerinde hücre yapışmasını ve proliferasyonunu iyileştirmek için 3B biyobaskıda kullanım seçenekleri olmuştur. Daha yakın zamanlarda, sinir dokusu mühendisliği uygulamaları için aljinat, fibrin, hiyaluronik asit ve/veya RGD peptidinin kompozit hidrojellerini kullanarak farklı hücre tipleri ile kapsüllenmiş iskelelerin biyobasılması üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur. Veriler, basılı iskelelerin içindeki hücrelerinin hizalanmasını sağladığını ve sinir dokusu mühendisliğinde uygulamalar için büyük potansiyelleri olduğunu göstermiştir (Li vd., 2017; Zhang ve Wang, 2019; Zhuang vd., 2018).

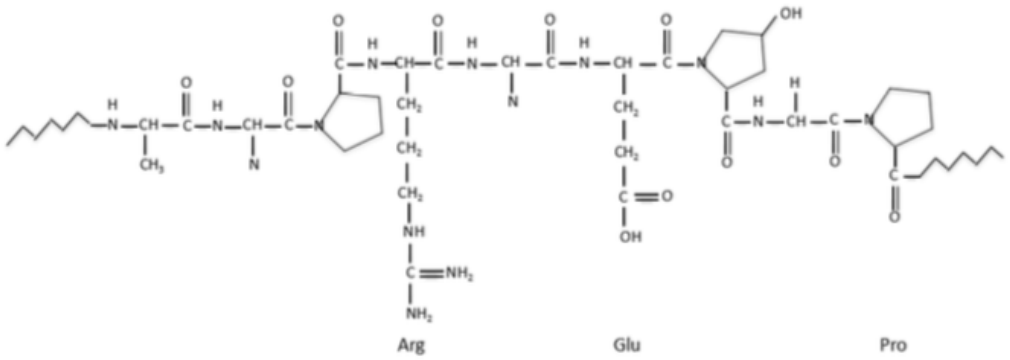


Şekil 4: Aljinat kimyasal yapısı (Liu vd., 2018).

ii. Jelatin:

Kolajenin kısmi hidrolizi ile üretilen peptidlerin ve proteinlerin bir karışımı olarak, jelatin iyi biyouyumluluk, yüksek su emme ve düşük immünojenite özelliklerine sahiptir (Li vd., 2017; Zhang ve Wang, 2019; Zhuang vd., 2018). Bir çalışmada, kök hücreleri karaciğer hücrelerine farklılaştırmak için bir jelatin ve kitosan kompozit sistemi kullanılmış 3B biyobaskı ile basılmış ve glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Jelatin ve kitosandan oluşan hidrojelin düşük mekanik mukavemete sahip olduğunu ve parçalanmasının kolay olduğunu gösterilmiştir. Hidrojel sisteminin şekli glutaraldehit ile çapraz bağlandıktan sonra önemli ölçüde iyileştirilmiş olsa da ve iskelenin morfolojisi ve gözenekliliği bozulmadan kalsa da glutaraldehit kullanımı sistemin biyouyumluluğunu azaltmaktadır. Bu nedenle, aljinat ile kompozit oluşturulduğunda $CaCl_2$ ile çapraz bağlama tercih edilmektedir.

Saf jelatin, 3B biyobaskı işleminde biyomalzemesi olarak yaygın olarak kullanılır. Jelatin, yavaş yavaş ortamda çözülür ve oksijen ve besin maddelerinin iletimini kolaylaştırmak için kültür sırasında 3B iskelede bir kanal oluşturur, böylece hücre sağ kalımını, çoğalmasını ve hatta farklılaşmayı indüklemektedir. Aynı araştırmacılar, jelatinin biyouyumluluğunu korumak ve mekanik mukavemeti arttırmak için UV-çapraz bağlantı gibi çeşitli deneyler yapmışlardır (Li vd., 2017; Schuurman vd., 2011). Başka bir çalışmada, jelatin modifikasyonu sonrasında jelatin-metakrilamid (GelMA) oluşturulmuş, hidrojellerinin kondrosit farklılaşmasını desteklediği ve çeşitli çapraz bağlama parametrelerine bağlı olarak çeşitli mekanik özellikleri desteklediği gösterilmiştir. Polimer konsantrasyonu, UV maruziyetinden önce UV maruz kalma süresi ve termal jelleşme, hidrojel sertliği ve şişme özellikleri üzerinde kontrol sağlamaktadır (Li vd., 2017; Skardal vd., 2010).



Şekil 5: Jelatinin kimyasal yapısı (Liu vd., 2018).

iii. Kitosan:

Kitosan, alkalin poli-sakkarit yapıda bir biyomateryalidir. Biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve antimikrobiyal özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, kitosan yavaş jelleşme ve düşük mekanik mukavemet özelliklerine sahiptir. Aljinat hidrojellerle karşılaştırıldığında, kitosanın osteojenik hücre proliferasyonu ve farklılaşması açısından tek başına aljinattan daha iyi olduğu bulunmuştur. Kitosan pozitif yüklü olduğundan, polielektrolit kompleksi oluşturmak için pH 6.5'te negatif yüklü jelatin ile karıştırılabilir ve hibrit hidrojel oda sıcaklığında iyi basılabilirliğe, yüksek 3B yapı şekli doğruluğuna ve iyi biyouyumluluğa sahiptir (Ashammakhi vd., 2019).

B. Sentetik Polimerler

3B biyobaskıda uygulanan diğer doğal polimerlerin yanında destekleyici nitelikte birçok sentetik biyomateryal de bulunmaktadır (Murphy ve Atala, 2014). Sentetik malzemeler arasında; polietilen glikol (PEG), poli-l-lisin (PLL), poli-laktik asit (PLA), poli-glikolik asit (PGA), polikaprolakton (PCL) ve poli-d,l-laktik-ko-glikolik asit (PGLA) gibi sentetik polimerler kullanılmaktadır. Bu polimerler genellikle çapraz bağlayıcı bileşenlerle birlikte kullanılır (S. J. Lee vd., 2018).

Biyobaskıda kullanılan malzemelerin seçimi önemli bir karardır, çünkü malzemeler genellikle karmaşık ve antagonisttir. Biyobaskı teknolojisi, polimer çözeltisi, canlı hücreler ve 3B baskı olmak üzere üç ana bileşen gerektirir. Polimer çözeltisi ve canlı hücreler biyomürekkebi oluşturur. Bu bileşenlerin seçimi sırasında çeşitli faktörler göz önünde bulundurulur. Örneğin, seçilen polimer çözeltisi düşük viskozite, düşük sertlik ve düşük çapraz bağlanma göstermelidir, çünkü bu özellikler hücre göçünü, besin maddelerini ve oksijen difüzyonunu ve yeni doku oluşumunu sağlar. Öte yandan, seçilen polimerler, daha viskoz, sert ve hızlı bir şekilde jelatinleşen malzemeler gerektiren yüksek mekanik özellikler, boyutsal doğruluk ve daha iyi yapısal özellikler göstermelidir.

Bir biyomalzeme yüzeyindeki hücrelerin topografik yapının, kök hücrelerin fenotipini ve hücresel davranışını etkilediği bilinmektedir. Paralel yüzey olukları/kanalları, kök hücrelerin nöronal ve kardiyomiyositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine doğru farklılaşmasını teşvik ettiği tespit edilen uzun bir morfoloji sunarken hücreleri hizalayabilir. Hücre ayırt edici yüzey özelliklerinin belirlenip ardından kök hücrelerin kontrollü şekilde yerleştirilmesi üzerine farklı bakış açılarıyla yapılacak optimizasyonların 3B biyobaskının verimliliğini arttıracağı gösterilmiştir (Lane vd., 2014; Madl ve Heilshorn, 2018).

1.3.3. 3B Biyoyazıcılarda Baskı Yöntemleri

Üç boyutlu kültür yöntemleri ile doğal mikro ortamları taklit edilmektedir. Bu yöntemler statik ve dinamik olarak iki bölüme ayrılır. Statik yöntemler, sferoidler, sentetik ve doğal biyometaryellerdir. Dinamik yöntemeler ise mikrotaşıyıcılar, mikrokapsülleme, mikroakışkanlardır (Irvine ve Venkatraman, 2016; Vijayavenkataraman vd., 2018; Zhuang vd., 2018).

A. Statik Yöntemler:

Sferoidler, yüksek proliferatif, proliferatif olmayan ve apoptotik hücreler olmak üzere çok çeşitli yapışık hücre tiplerinin bir arada bulunmasıyla oluşmaktadır. Heterojen özelliği sayesinde, homojen hücre proliferasyonu ile karşılaştırıldığında karmaşık 3 boyutlu hücre yapıları, hücre farklılaşması ve kanser biyolojisi üzerinde çalışmalarda kullanılmaktadır (Białkowska vd., 2020).

Birçok hücre tipi birbirine tutunma yeteneğine sahiptir. **Sferoidler**, yüksek proliferatif, proliferatif olmayan ve apoptotik hücreler olmak üzere çok çeşitli hücrelerin bir araya gelerek oluşturduğu küresel hücre topluluklarıdır. Sferoidler de *in vivo* ortamı daha iyi taklit ettikleri için, ilaç ve nanopartiküllerin test edilmesinde ve hastalıkların modellenmesinde kullanılabilmektedir (Białkowska vd., 2020).

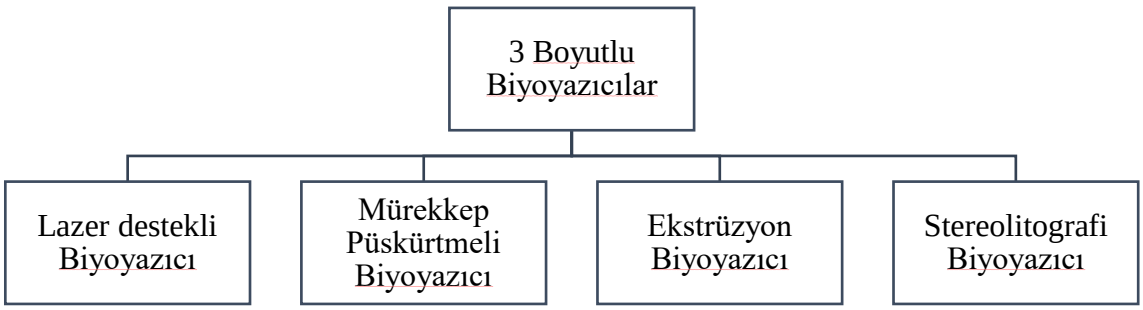
B. Dinamik Yöntemler:

Polistiren, jelatin, dekstran ve kollajen dahil olmak üzere çeşitli malzemelerden oluşan **mikrotaşıyıcılar**, küçük boncuklar (microbead) hücrelerin yapışması ve çoğalması için geniş bir yüzey sağlarlar. Mikrotaşıyıcılar üzerindeki hücrelerin yapışması, genişleme veya farklılaşmayı teşvik etmek için optimize edilebilir. Mikrotaşıyıcıların kullanıldığı pek çok MKH farklılaşma çalışması mevcuttur (Merten, 2015).

Mikrokapsülasyon yöntemi ile, hücre büyümesi için gerekli olan besin maddelerinin, oksijenin ve büyüme faktörlerinin difüzyonuna izin veren yarı geçirgen bir malzeme veya zar içinde immobilize edilir. Kullanılan biyomalzemelerin bileşimine ve büyüme faktörlerine bağlı olarak kök hücrelerin köklülüğünü korumak veya farklılaşmasını sağlamak için değiştirilebilirler. Farklılaşmaya ek olarak, MKH'lerin mikrokapsülasyonu, immün yanıtı en aza indirirken, dejeneratif dokuların onarımında MKH'lerin taşınması için avantajlı bir yöntem olabilir.

Mikroakışkanlar, hem hacim hem de boyut açısından küçük ölçekli sistemleri içeren mikroakışkanlar, hücrelerin kültürlenmesi için giderek daha fazla araştırılmaktadır. Mikroakışkan kültür sistemleri küçük ölçekli proliferasyon ve MKH'lerin kontrollü diferansiyasyonu için kullanılabilir (McKee ve Chaudhry, 2017).

3B biyobaskı yöntemleri, mürekkep püskürtmeli (inkjet), lazer destekli, ekstrüzyon ve stereolitografi (SLA) tekniklerinden birini kullanmaktadır. Biyoyazıcılar ile elektrospin tekniğini birleştiren Melt electrowriting (MEW) de güncel bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Hücreler, biyomürekkep ile birlikte çeşitli şekillerde ve konumlarda yazılmıştır (Gu vd., 2020).



Şekil 6: 3B Biyoyazıcıların Sınıflandırılması.

Ekstrüzyon biyobaskı, gerçek zaman diliminde komut verilen boyutlardaki organize yapıların üretimi için kullanılan bir yöntemdir. Ekstrüzyon baskı, mürekkep püskürtmeli baskının bir modifikasyonudur. Bu teknik, bir şırıngadan sürekli akan bir biyomürekkep filament üretir. Sürekli bir kuvvet ile kesintisiz silindirik çizgiler yazdırabilir. Çok sayıda biyouyumlu hidrojel polimeri ve kök hücreler ekstrüzyon biyobaskı için biyomalzeme olarak kullanılabilir. Mekanik vidalı piston, geliştirilmiş biyomalzeme akışı üzerinde daha iyi kontrol sağlamaktadır. Basınç düşüşü hücrelerin deformasyon ve apoptozu ile ilişkilidir (McKee ve Chaudhry, 2017). Viskoz biyomürekkep (biyomateryaller, biyomoleküller ve hücreler) bir nozul veya şırınga yoluyla basıldıktan sonra, yapılar fiziksel veya kimyasal olarak katılaşabilir yani jelleştirilebilir, bu da bu tekniği diğerlerinden daha yavaş hale getirir. Örneğin lazer destekli veya mürekkep püskürtmeli tabanlı teknoloji nispeten yüksek kesme ve uzatma kuvvetlerine veya daha yüksek sıcaklıklara rağmen, doku yapılarındaki hücre canlılığının %90'a kadar ulaştığı bildirilmektedir (Jessop vd., 2017). Ekstrüzyon biyobaskı cihazları daha geniş bir malzeme yelpazesi yazdırabilirken, kapsüllenmiş hücreleri hücre canlılığını azalttığı düşünülen daha büyük mekanik gerilmelere maruz bırakırlar (Khalil ve Sun, 2007; Mandrycky vd., 2016; Murphy ve Atala, 2014; Nair vd., 2009).

Ekstrüzyon bazlı biyobaskının en büyük dezavantajlarından biri optimum malzeme viskozitesi sağlanmadığında sızıntılara yol açabilmesi ve son doku yapısının çözünürlüğünü etkileyebilmesidir (Jessop vd., 2017). Mevcut ekstrüzyon sistemlerinde dağıtıcılar birkaç farklılığa sahiptir (Khalil ve Sun, 2007). Sıkıştırılmış gazlar tarafından desteklenmektedir. Pnömatik mikro ekstrüzyon, viskozite için daha geniş bir destek sağlamasına rağmen basılan yapı tam olarak kontrol altında tutulamaz. Örneğin, vidalı nozullar giriş havası olmadan yazdırabilir ve çok daha ucuzdur, fakat yüksek viskoziteli baskıda sorun yaratabilirler (Mandrycky vd., 2016).

Mürekkep Püskürtmeli Baskı, (örneğin: termal, piezoelektrik), yüksek çözünürlüklü hızlı baskı için mikro damlacıklar kullanır (Mandrycky vd., 2016). Mürekkep kartuşunda kapsüllenmiş hücrelere sahip bir hidrojel ön polimer çözeltisi

depolanır. Kartuş daha sonra bir yazıcı kafasına bağlanır ve elektronik olarak kontrol edilen baskı işlemi sırasında biyobağlantı kaynağı olarak işlev görür.

Mürekkep Püskürtmeli baskının avantajları şunlardır: (1) ticari yazıcılarla benzer yapı nedeniyle düşük maliyet, (2) yazıcı kafalarının paralel çalışma modunu destekleme yeteneği ile sağlanan yüksek baskı hızı ve (3) birçok deneysel sonuçla belirlenen nispeten yüksek hücre canlılığı (genellikle %80-90) (Cui vd., 2013; Cui, Breitenkamp, Finn, vd., 2012; Cui, Breitenkamp, Lotz, vd., 2012). Diğer iki yöntem Sürekli Mürekkep Püskürtmeli (Continuous Inkjet; (CIJ)) veya talep üzerine damla (Drop on Demand; (DOD)) biyoyazıcılardır. Sürekli Mürekkep Püskürtmeli yazıcılar kesintisiz bir iz üretirken, DOD sisteminde ayrı mürekkep damlacıkları üzerinde birikir. Bir kartuş hücreleri ve hidrojel biyomalzeme hücreleri yüklenir damlacıklar halinde basılır. Termal veya piezoelektrik sistem olarak iki çeşit aktarım yöntemi bulunmaktadır. Termal sistem hücre baskısı için daha yaygındır. Mürekkep püskürtmeli baskı kafaları, mikro-elektro mekanik sistem (MEMS) kullanmaktadır. Mürekkep püskürtmeli biyobaskı yöntemine çalışmalarda daha çok başvurulmaktadır (McKee ve Chaudhry, 2017). Ana sınırlamalar, baskı işlemi sırasında daha yüksek sıcaklıklarda ve basınçlarda hücre canlılığında kayıp ve hücre agregasyonu nedeniyle nozul tıkanması, doku yapısında düşük hücre yoğunluğuna yol açmasıdır. Mürekkep püskürtmeli baskının birden fazla hücre tipini bir araya getirme yeteneği, yüksek çözünürlüğü ve artan hücre konsantrasyonlarına yönelik devam eden araştırmaları, bunu karmaşık doku baskısı için umut verici bir teknoloji haline getirmektedir (Jessop vd., 2017).

Lazer destekli biyobaskı, bir darbeli lazer ışınının etkisi ile kaynak tabakadan mikrodamla formunda damlatılan polimer ve hücrelerin alttaki yüzeye transferini içerir (Jessop vd., 2017). Mürekkep püskürtmeli baskıdan farklı olarak, lazer destekli biyobaskı bir dağıtım nozulu gerektirmez. Bu teknik en pahalı ve karmaşık biyobaskı yöntemi olmasına karşın nozul içermemesi sebebiyle çok çeşitli biyomateryal viskozitelerle uyumludur ve ekstrüzyon tabanlı tekniklerin tıkanma problemlerini önlemektedir. Lazer destekli biyobaskının memeli hücrelerini işlevi etkilemeden veya DNA hasarına neden olmadan 3B biyobaskı sağladığı gösterilmiştir (Jessop vd., 2017). Lazer biyobaskı yönteminin, kontrol yöntemine kıyasla canlılık, proliferasyon,

apoptoz veya kök hücre fenotipinde herhangi bir değişiklik olmaksızın MKH'lerin bir aljinat hidrojele aktarılmasını sağladığı gösterilmiştir (Chen vd., 2011). 1 μm hassasiyetle baskı alınabilen bu teknik, sayılan avantajlarına rağmen pahalı olması sebebiyle tercih edilmemektedir (Jessop vd., 2017).

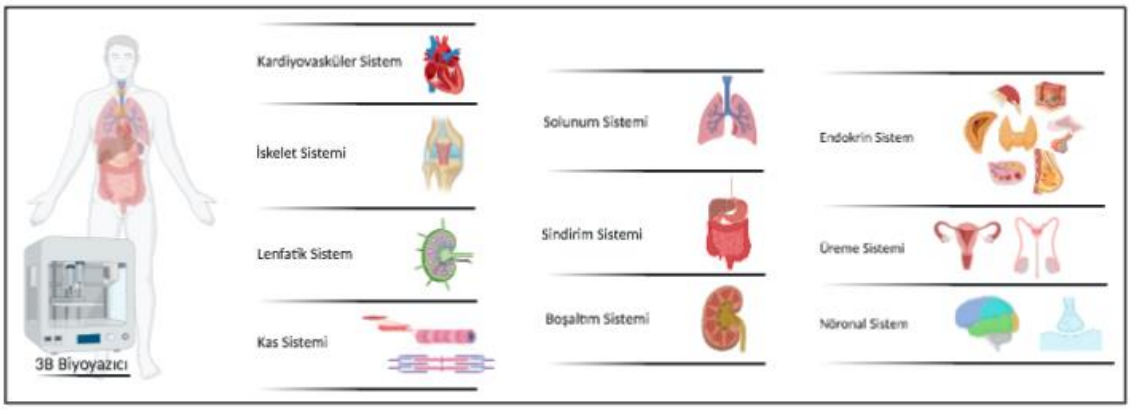
Stereolitografiye (SLA), ışıkla kürlenen reçinenin bir lazer ışını ile katman katman polimerize edilmesiyle çalışmaktadır. Başlangıçta yüksek çözünürlüklü hızlı prototipler oluşturmak için geliştirilmiştir. Malzemedeki sitotoksik bileşenler ve biyouyumlu reçinelerin eksikliği tekniğin kullanımını sınırlamıştır. Stereolitografinin karmaşık şekiller oluşturma yeteneği, anatomik modellerin üretiminde umut verici olduğunu göstermiştir. Baskı sırasında reçinelerin biyouyumluluğu, biyodegradasyonu ve hücre kapsüllemesinde devam eden gelişmeler, stereolitografiyi geleceğin umut verici bir biyobaskı teknolojisi haline getirmektedir (Jessop vd., 2017).

3B Biyobaskıda, yüksek çözünürlük sağlanması optimal yazdırılabilir destek malzeme bulma ve karmaşık biyolojik yapıların oluşturulması konusunda halen engeller vardır. Daha yüksek çözünürlük sadece yerel mimarinin daha iyi çoğaltılmasına izin vermekle kalmaz, aynı zamanda gözenek boyutunu ve birbirine tutunmayı da kontrol edebilir. Bu da 400-500 μm'nin üzerindeki difüzyon mesafelerinin oksijen taşınmasını ve dolayısıyla hücre canlılığını sınırlayabileceği göz önüne alındığında önem arz etmektedir.

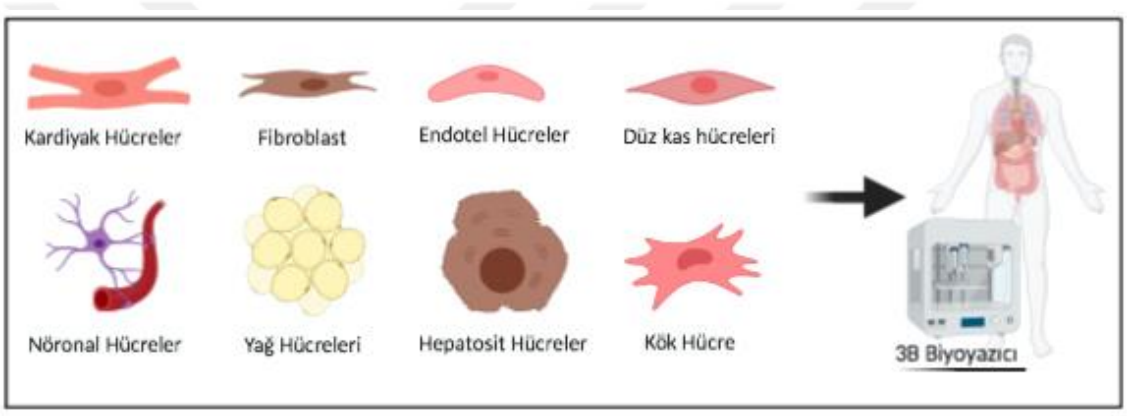
Günümüzde stereolitografi ve mürekkep püskürtmeli teknikler mevcut en iyi çözünürlüklerden bazılarını sağlamaktadır. Ancak uygun biyomateryallerin eksikliğiyle düşük hücre canlılıkları görülmekte ve mekanik mukavemet sınırlı kalmaktadır. Lazer destekli biyoyazıcılar mikroskobik çözünürlükte baskı yapabilir, ancak tek tek şeritlerin biriktirme için hazırlanması zaman alıcı olabilir ve uygun maliyetli olmayabilir. Matematiksel modelleme, hücre ekim yoğunluğu ve gözeneklilik gibi değişkenlerin sayısını aynı anda ayarlayarak doku yapılarının yazdırılabilirliğini optimize ederken çözünürlüğü artırmaya yardımcı olabilir. Otomatik robotik sistemler, ticari biyofabrikasyon için biyobaskı işlemini otomatik olarak eşleştirmek için uygun maliyetli ve potansiyel olarak ölçeklenebilir araçlar sağlayabilir (Jessop vd., 2017).

Tablo 1: Biyoyazıcı ve Parametreler (Irvine ve Venkatraman, 2016; Leberfinger vd., 2019; Liu vd., 2018).

Parametre	İnkjet Biyoyazıcı	Lazer bazlı biyoyazıcı	Ekstrüzyon bazlı biyoyazıcı	Stereolitografi
Biyomalzeme için kullanılan malzemeler	Aljinat, Jelatin, PEGDA, Kolajen	Kolejen, Matrijel	Aljinat, GelMA, Silk, Kolajen	Hibrid-hidrojel GelMA, GelMA-PEDGA
Jel Stratejisi	Kimyasal, Foto-çapraz bağlama	Kimyasal, Foto-çapraz bağlama	Kimyasal, Foto-çapraz bağlama, şeffaf inceltme, sıcaklığa bağlı	Kimyasal, Foto-çapraz bağlama
Malzemenin akışkanlığı	3.5–12 MPa/s	1–300 MPa/s	30 to 6 × 107 MPa/s	Limit yok
Hazırlık için harcanan zaman	Kısa	Orta ile uzun	Kısa ile orta	Orta ile uzun
Baskı hızı	Hızlı	Orta	Yavaş	Hızlı
Hücre Canlılığı	>85%	>95%	40–90%	>85%
Çözünürlük	Yüksek	Yüksek	Düşük-Orta	Yüksek
Hücre yoğunluğu	Düşük-Orta $<10^6$ hücre/ml	Orta-Yüksek $<10^8$ hücre/ml	Orta-Yüksek (spheroid forumda hücreler)	Orta $<10^8$ hücre/ml
Yatırılan 3D yapının kalitesi	Zayıf	Orta	İyi	İyi
Maliyet	Düşük	Yüksek	Orta	Düşük
Katkı birimi	Damla damla malzeme zorlanma tedavi biyoink	Damla	Malzeme Gerilimi	İyileşmiş biyomürekkep
Ticari Biyobaskı	Evet	Hayır	Evet	Evet
Çalıştırma Yöntemi	Piezoelektrik darbe, Termal kaynaklı darbe	Lazer kaynaklı darbe	Pnömatik basınç-mekanik basınç	Lazer bazlı kür, UV ve görünür ışık projeksiyon kür lazer bazlı kür
Dikey yapının kalitesi	Zayıf	Hassas-İyi	İyi	İyi
Doku mühendisliği (damar, kemik, kıkırdak ve nöron)	Doku mühendisliği (kan damarı, kemik, deri ve yağ)	Doku mühendisliği (kan damarı, kemik, kıkırdak, nöron, Kas, tümör) biyomakromoleküllerin kontrollü salınımı organ-on-a-chip	Doku mühendisliği (kan damarı ve kıkırdak) organ-on-a-chip	Doku mühendisliği (kan damarı ve kıkırdak) organ-on-a-chip
Tekniğin özeti	Fotopolimer bazlı biyo-mürekkep bir mürekkep püskürtmeli ile püskürtülür ve UV ışığı ile tedavi edilir.	Viskoz sıvı veya erimiş malzeme, tek tek noktaların sürekli bir ipliği olarak nozul veya şırınga ile ekstrüde edilir.	Işıkla polimerleşebilen reçine tabakasının katman tarafından polimerizasyonu	Işıkla polimerleşebilen reçine tabakasının katman tarafından polimerizasyonu
Çalıştırma yöntemi	Piezoelektrik darbe, Termal kaynaklı darbe	Lazer kaynaklı darbe	Pnömatik basınç---Mekanik basınç	Lazer bazlı kürleme---UV ve görünür ışık projeksiyonu curingaser bazlı kürleme
Avantajlar	Yatırılan malzeme miktarı üzerinde yüksek kontrol (damla başına 1 pL ila 0.1 nL)	Yüksek baskı çözünürlüğü-Tek hücreli biriktirme	Sadece hafif çapraz bağlantı biyo-bağlantıları ile kullanılabilir---Çok hücreli yapılar karmaşıktır, Yazıcı biyofabrikasyon için özel olarak tasarlanmamıştır	Uygun fiyatlı - Yüksek baskı hızı
Dezavantajlar	3D yapıların yüksekliği düşük bioink viskozitesi nedeniyle sınırlıdır-3D yapıların yüksekliği düşük bioink viskozitesi nedeniyle sınırlıdır	Gelecekteki ticari biyobaskıların yüksek maliyeti, Uzun üretim süresi, Malzeme şeritlerinin uzun hazırlık süresi, şerit hazırlama için düşük biyomürekkep çeşitliliği	Hücreler önemli kesme stresine maruz kalabilir, Orta baskı doğruluğu, düşük baskı çözünürlüğü, mekanik parçalar bu sistemi daha kırılgan hale getirir, Vidalı sistem mekanik parçaların temizlenmesini gerektirir	Sadece hafif çapraz biyo-bağlantılarla kullanılabilir-çok hücreli yapılar karmaşıktır, Yazıcılar biyo-bağlantı için özel olarak tasarlanmamıştır



Şekil 7: 3B Biyoyazıcıların Kullanıldığı Alanlar.



Şekil 8: 3B Biyoyazıcıda Kullanılan Hücreler.

1.4. 4B Hücre Kültürü

4B hücre kültüründeki dördüncü boyut, bir 3B biyobaskılı nesnenin fiziksel özelliklerinin bir veya daha fazlasının işlevsel olarak bağımlı olduğu zaman unsurunu ifade eder. 4B biyobaskı bir yapının fiziksel özellikleri, belirli bir tetikleme mekanizmasının veya uyaranın bir sonucu olarak zaman içinde değişmesidir. 4B hücre kültürü kavramı, 3B baskı işleminden sonra şekli, genişlik ve hacim ölçüleri, hücre proliferasyonu ve hareketinin incelenmesine katkı sağlanmaktadır (Ashammakhi vd., 2019; Richards vd., 2018).

1.5. 3B Biyobaskının Kullanıldığı Alanlar ve Klinik Uygulamalar

Klinikte, özellikle büyüme potansiyelini ve kök hücre bankalarının mevcudiyeti, ölçeklendirme, sterilite ve doku mühendisliği yapılarının depolanması gibi uygulamaları kontrol etme konusunda biyo-basılan dokunun güvenliğini sağlamak amaçlanmalıdır. Biyoüretim, diğer doku mühendisliği ürünlerinde olduğu gibi, mevcut iyi üretim uygulamaları (cGMP) yönetmeliklerine uymalı ve Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) veya Avrupa Tıp Ajansı'ndan (EMA) onay almalıdır. cGMP standardında klinik kullanım için 3B biyobaskı sürecini tasarımdan üretim aşamasına kadar standardize etmek ve sürekli olarak izlemek gerekmektedir. Ancak yöntem halen çok sayıda değişken içerdiğinden standardizasyon süreci zorlu olmakta ve takip için yeni ve hassas yöntemler geliştirilmesini gerektirmektedir.

3B biyobaskı teknolojisi, doku mühendisliği ile yakından ilişkili dünya çapında hızla genişleyen bir araştırma alanıdır. Bu platform teknolojisinin nihai başarısı, hücre kaynağının doğru karışımı, uygun yazdırılabilir iskele ve doğal doku yapısını taklit etmek için ideal mikroçevre ile ilgili temel bilimsel soruların cevaplarına bağlıdır. 3B biyobaskı teknolojisinin gelişim sürecinin ilk aşamaları, mevcut çalışmaların çoğunun sadece in vitro olduğu ve piyasada 3B biyobasılan dokuların bulunmadığı aşamadır.

Biyobaskı “form ve fonksiyon” bakımından cerrahiye destekleyici etkisi ve hedefleri göz önüne alındığında umut vadeden bir metottur. Kliniğe başarılı bir geçiş sağlamak için biyolojik, teknolojik ve yasal zorlukları aşarak sadece mühendislik, biyomateryal bilimi, hücre biyolojisi ve mikrocerrahi konularında teknolojilerinin kombinasyonu ile entegre bir yaklaşımla mümkün olacaktır (Jessop vd., 2017). 3B yazıcıların medikal alanda çok çeşitli kullanım alanları ve avantajları bulunmasına karşın kullanımı henüz gerektiği kadar yaygınlaşmamıştır. Standart seri üretim olacak kadar bu teknoloji geliştiğinde medikal alanda kullanımı yaygınlaşacaktır. Bunun için 3B biyobaskı sonrasında hücrenin ve biyomalzemenin etkileşimi ve hareketleri daha iyi bir şekilde gözlemlenmeli ve iyice kavrandıktan sonra klinikte kullanımına katkı sağlanmalıdır. Yapay zeka gibi yeni teknolojilerin hücresel analizlere ve 3B baskı sürecinin çeşitli aşamalarına adaptasyonu bu noktada avantaj sağlayabilecektir.

1.6. Yapay Zeka

Veri bilimi, makine öğrenimi ve istatistikleri, bilgisayar biliminin bazı yönlerini, bilgi depolamayı, çevrimiçi uygulamaları ve hesaplama algoritmalarını ve yapay zekayı içerir. Bu alan, verideki bilgilerin etkili ve güvenilir bir şekilde aranmasını, insan, yazılım sistemi veya kontrol cihazı gibi ilgili kullanıcılar tarafından işlenmeye uygun genelleştirilmiş bir biçimde bilgi çıkarmayı içerir. Bu süreç bilinçli ve güvenilir kararlar almak için gereklidir (Miller ve Brown, 2018; Panch vd., 2018).

Yapay zeka (YZ) (Artifical Intelligence; (AI)), insan zekasını taklit eden ve toplanan bilgilerin çevresel uyaranlara ve yeni verilere yanıt veren yinelemeli olarak performans endeksini en üst düzeye çıkarmak için kendini iyileştiren, derin sinir ağlarına dayanan bir sistemdir. Uygulamada, öğrenme süreci matematik, istatistik, mantık ve bilgisayar programlama kullanılarak gerçekleşmektedir. Öğrenme süreci, YZ modelinin, deneme yanılma yoluyla ya da önceki çalışmalardan alınan verilere uygun kurallara uyarak parametre ayarlanması ile yinelemeli bir prosedürde veriler üzerinde eğitilmesini sağlar. Performans endeksi, model tahminleri ve deneysel veriler arasındaki farkın en aza indirilmesi olabilir (Benke ve Benke, 2018)**.** YZ kavramında hedef tek bir görevi veya bir dizi görevi tamamlamaktır.

Dar yapay zeka veya zayıf yapay zeka olarak bilinen sistemler, günümüzde yapay zeka olarak sunulan, birkaç görevi veya birini ele alan kısıtlı ancak verimli sistemlerdir. Sistemde öğrenme her zaman devam eder. Makine öğrenimi sistemi ile dar yapay zeka, sistemin, programlanmadığı, tamamen yeni çözümler geliştirerek sürekli olarak kendini geliştirmektedir. Yapay zeka ve makine öğrenimi bilgisayar biliminin parçalarıdır, her iki sistem de normal bir bilgisayarda uygulanabilir. Yapay zeka sistemi makine sisteminin sunduğu çözümlere dayanarak bağımsız bir karar verir. Bununla birlikte, yapay zeka sistemleri, gerektiğinde süreci kontrol etmek ve düzeltmek için insan denetimine ihtiyaç duyar (Górriz vd., 2020; Nichols vd., 2019).

Yapay zeka, kendi öğrenme deneyimine ve toplanan verilere dayanarak yeni çözümler ortaya çıkaran programlanmış görevleri yerine getirebilen bir sistemdir. Yapay zekanın gelecekteki potansiyeli, programlanmamış yeni görevler belirleme, bunları kurallara ve insan etiğine göre öğrenme ve çözme yeteneğidir. Yapay zekanın, insan

gözetimi olmadan tamamen bağımsız bir sistem haline gelmesi için araştırma ve çok daha fazla araştırma ve geliştirme gerekmektedir (Dimiduk vd., 2018). Veri eksikliğinin sınırlandırılması yani yapay zekanın kendi kendine incelenmesi, programın kolayca analiz edebileceği ve hatırlayabileceği fazlasıyla bilgi girişi gerektirir. Burada işlem gücü kullanılan bilgisayarların kapasitesine bağlı olarak zaman alan bir süreçtir. Amaç eğitim ve analizleri hızlı gerçekleşebilmesidir (Benke ve Benke, 2018).

Eğitildikten sonra, YZ modeli karar vermek için yeni verilere uygulanabilir. Karar verme, algılama, ayrımcılık ve sınıflandırmayı içerebilir. Bu yaklaşım denetimli öğrenme olarak bilinir, çünkü bir geri bildirim döngüsü ve hedefe yönelik bir öğrenme süreci ile uyarlanabilir bir sisteme benzemektedir. Yapay zekanın tıpta büyük verilerin işlenmesindeki potansiyel rolü, tahmin analitiği için gerekli olan büyük kaynaklar nedeniyle uzmanlar tarafından önerilmiştir. Depolanmış büyük verilerin potansiyeli yapay zeka için bir veritabanı olarak bakıldığında oldukça yüksektir (Benke ve Benke, 2018). Birçok yapay zeka modeli güçlü istatistiksel temellere sahiptir ve öğrenme kurallarına dayanmaktadır. Yapay zeka yaklaşımlarına örnek olarak makine öğrenimi, görüntü tanıma ve uzman sistemler verilebilir.

Popüler AI teknikleri, klasik destek vektör makinesi ve sinir ağı gibi yapılandırılmış veriler için makine öğrenme yöntemlerini, modern derin öğrenmeyi ve yapılandırılmamış veriler için doğal dil işlemeyi içerir. YZ araçlarını kullanan başlıca hastalık alanları arasında kanser, nöroloji ve kardiyoloji bulunur (F. Jiang vd., 2017). Yapay zeka dermatoloji, patoloji, radyoloji gibi tıp anabilim dallarında tanı ve tedavi için önemli yere sahiptir.

Yapay zeka, sağlık ve biyomedikal araştırmaların gidişatını yavaş yavaş değiştirmektedir. Örnek olarak, retina fotoğraflarının taranması ile diyabet hastalığının teşhisinin konması gibi çok önemli noktalarda ilerleme sağlanacaktır. Diyabetik retinopati ve bunu yanı sıra birçok hastalıkta erken teşhis ve tanı, tedavi, sonuç tahmini ve prognoz değerlendirmesinde YZ kullanımı önemli rollere sahip olacaktır (K. H. Yu vd., 2018). YZ'nin rol aldığı biri diğer alan ilaç geliştirme sektörüdür. Özellikle derin sinir ağları veya tekrarlayan ağlar gibi yapay sinir ağları bu alanda kullanılmakta, ilaç sentezinin planlaması ve sentezi kolaylaştırma gibi konularda yakın gelecekte bilgisayarlar tarafından daha fazla otomatik ilaç keşfi beklenmektedir (Hessler ve Baringhaus, 2018).

Yapay zeka, radyolojik iş akışının her bölümünü etkileyebildiğinden yeni modalitelerin geliştirilmesi gibi radyolojideki önceki tekno-mantıksal atılımlardan önemli ölçüde benzersizlik taşır. Örneğin, yapay zeka algoritmaları, yalnızca bir hastanın tıbbi kaydını analiz ederek tıbbi görüntüleme taleplerinde karar desteği noktasında kullanılabilir.

Başka bir örnek, bir hastanın ultrason, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI), Bilgisayarlı tomografi (BT), Pozitron emisyon tomografisi (PET) sonuçlarını yapay zeka ile analiz ederek doğru ve hızlı teşhis konulmasıdır. Bunun yanı sıra bu görüntüleme yöntemlerinin çekim süresini ve radyasyonu azaltıcı çalışmalar yapılmaktadır. Kısaca, yapay zeka medikal sektörde önemli bir yere sahiptir. Tıp ve yapay zeka ortak çalışmaları sonucunda tanı, tedavi ve labarotuvarda yürütülen deneylerin geliştirilmesinde (Syed ve Zoga, 2018) ve birçok hastalıkta erken teşhis ve tanı, tedavi, sonuç tahmini ve prognoz değerlendirmesinde önemli rollere sahip olacaktır (F. Jiang vd., 2017; Thrall vd., 2018; K. H. Yu vd., 2018).

İnsan ve bilgisayar zekası karşılaştırıldığında eldeki verilerin bozulması sisteme hatalı veri girişi, değişkenlerin eksik değerlendirilip sisteme girilmesi, eksik dijital kayıtlar insan çalışmalarının sonuçlarıdır. Yapay zeka kullanılarak insan hatalarının önüne geçebileceği büyük datalarla çalışmalar yapılabilir (Benke ve Benke, 2018; Krittanawong vd., 2017). Görüntülerin analizi ile ilgili yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda insan performansı, geleneksel net sınırlara dikkat edilmeden yapılan yöntem ve derin öğrenme sisteminin performansı karşılaştırıldığında denetimli ve denetimsiz derin öğrenmenin yani makina öğrenmesinin klasik yöntemlere göre daha yüksek düzeyde hassasiyet içerdiği görülmüştür (Benke ve Benke, 2018).

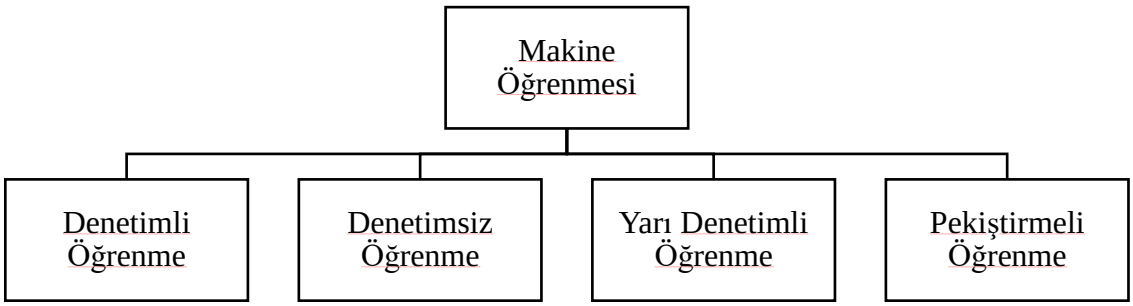
1.6.1. Makine Öğrenmesi

Makine öğrenimi (Machine Learning; (ML)) yapay zekanın bir alt kümesidir ve karar verme kurallarının açık kodlaması olmadan bilgisayar algoritmalarının geliştirilmesine odaklanır. Makine öğrenimi bilgileri toplar, analiz eder ve bağımsız bir çözüm sunar. Uygulamada veriler biriktikçe ve tecrübe arttıkça, bilgi artacak makine öğrenimi iyileşme gösterecek ve yeni çözümler bulma yolunda yeni pencereler açılacaktır (England ve Cheng, 2020; Kan, 2017; Nichols vd., 2019).

En yaygın olarak kabul edilen makine öğrenme yöntemlerinden ikisi denetimli öğrenme ve denetimsiz öğrenmedir (Şekil 9). Yarı denetimli ve takviye öğrenme, bazen kullanılan diğer iki teknolojidir (Ongsulee, 2018). Denetimli öğrenmede, algoritmaya algoritmanın geliştirilmesinde kullanılan açıklamalı temel gerçek verileri verilir. Örneğin, bir ekipman parçası başarısız veya çalışır etiketli veri noktalarına sahip olabilir. Öğrenme algoritması, karşılık gelen doğru çıkışlarla birlikte bir dizi girdi alır ve algoritma, hataları bulmak için gerçek çıktısını doğru çıkışlarla karşılaştırarak öğrenir. Daha sonra modeli buna göre değiştirir. Sınıflandırma, regresyon, tahmin ve gradyan artırma gibi yöntemlerle, denetimli öğrenme, etiketlenmemiş ek verilerde etiketin değerlerini tahmin etmek için desenler kullanır (Ongsulee, 2018).

Denetimsiz öğrenmede, sistem kendisini sınıflandırması gereken etiketlenmemiş verilerle sağlanır. Denetimsiz öğrenmenin amacı, veriler hakkında daha fazla bilgi edinmek için giriş verilerinin temel dağılımını veya yapısını modellemektir. Bazı YZ modelleri, önemli gruplamaları keşfetmek veya verideki özellikleri tanımlamak amacıyla k-means kümeleme algoritması gibi bir kümeleme işlemi ile denetimsiz öğrenme kullanır (Benke ve Benke, 2018). Derin öğrenme ve özellikle derin konvolüsyonel sinir ağları (DCNNs veya CNNs), son yıllarda en büyük dikkati toplayan denetimli makine öğreniminin bir alt kümesini temsil eder. DCNN'ler, çok katmanlı sinir ağlarına, yani derin sinir ağlarına dayanan algoritmik bir yapı kullanan denetimli bir öğrenme türüdür. Konvolüsyonel sinir ağlarının görüntü işlemesi ve bilgisayar görüşü aşamasında sınır, şekil ya da renkler üzerinden çalışılmaktadır. Bu tekniğin önemi, ölçekleme yeteneği ve sinir ağı mimarisinin, etiketli giriş verileri dışında herhangi bir yön olmadan verilerden kendi ilgili özelliklerini çıkarma yeteneğidir (Scheeder vd., 2018; C. Yu ve Jiang, 2020).

Yarı denetimli öğrenme ise, denetimli öğrenme ile aynı uygulamalar için kullanılır. Ancak, eğitim için hem etiketlenmiş hem de etiketlenmemiş verileri kullanır. Bu tür bir öğrenme, sınıflandırma, regresyon ve tahmin gibi yöntemlerle kullanılabilir. Bunun erken örnekleri, bir web kamerasında bir kişinin yüzünü tanımlamayı içerir. Pekiştirmeli öğrenmede ise, daha önce öğrenilmiş bilgiler üzerinden gidilerek sonraki adım belirlenir (Ongsulee, 2018).



Şekil 9: Makine Öğrenmesi Sınıflandırılması.

3B biyobaskı teknolojileri, benzeri görülmemiş mekansal çözünürlük ve doku benzeri karmaşıklık ile doku rejenerasyonu ve hastalık modellemesinin birçok araştırma alanında yaygın olarak uygulanmaktadır. Bununla birlikte, doku mimarisinin çıkarılması ve yüksek çözünürlüklü çizimlerin oluşturulması, doku rejenerasyonu için zorlu aşamalardır. Geleneksel olarak, bu tür mekansal bilgiler, mikroskobik görüntülerin bir koleksiyonundan elde edilir ve daha sonra ilgi alanlarını görselleştirmek için bir araya getirilir. Bu tür mühendislik dokularını elde etmek için, işlenmiş mikroskobik görüntüler bir 3B biyobaskı işlemini bilgilendirmek için koda dönüştürülür. Bu süreç veriye dayalı yaklaşımlarla tamamlanırsa ve makine zekası ile kolaylaştırılırsa, optimal bir planın tanımlanması, fonksiyonel doku rejenerasyonu için ulaşılabilir bir görev haline gelebilir. Klasik istatistiksel yöntemler, yüksek boyutlu görüntüleme verilerini işlemek ve bu tür yüksek boyutlu verileri analitik modellerle tahmin etmek için uygun olmayabilir. Karmaşık görevleri yerine getirmek için makine zekasını kullanmak uygun olacaktır. Artan karmaşıklığın artan işlevselliğe yol açma derecesi bilinmemektedir ve araştırılmalıdır (Kim vd., 2020).

Bu çalışmada doku mühendisliğinin 3B biyobaskı kısmında hücrelerin basıldıktan sonra 3B hücre kültüründe şekli, hareketi ve proliferasyonun gibi unsurların değişimi takip edildi. 3B hücre kültüründe hücrelerin davranışını yani hücre canlılığı, morfolojisi, dağılımları ve hareketleri izlemek için makine öğrenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapay zekaya denetimli makine öğrenmesi ile hücreleri ve hücre mikroçevresini tanıtıp analizler yapılması klasik yöntem insan zekasıyla incelenmesinden daha kesin ve doğru sonuçlar vermektedir. Yüksek boyutlu datanın verilerini işlemek ve analiz etmek için yapay zeka büyük önem içermektedir. 3B biyoyazıcı ile ilgili çalışmaların ilerlemesine makine

öğrenmesi önemli katkılar sağlayacaktır. Yapay organ üretiminde de bu konun anlaşılması ve doğru istatiksel analiz sonucunda büyük bir adım atılmış olmaktadır.

1.6.1.1. ZEISS ZEN Intellesis Yazılımı

ZEISS ZEN Intellesis yazılımı mikroskopta alınan görüntülerin veri kümeleri ile makine öğrenimi eğitmelerine olanak tanımaktadır. Büyük ve çok boyutlu veri kümelerini sınıflandırıcı bir eğitim uygulanabilmektedir. En önemli noktalardan biri çok kanallı 3B hücre yapılarını veya plak tabanı görüntülerini de dahil veri kümeleriyle çalışabilmektedir. CZI, TXM, OME-TIFF, JPG ve PNG dahil olmak üzere yazılım platformu tarafından okunan herhangi bir görüntü formatı ile çalışılır ve veriler agnostiktir. ZEISS bünyesine sahip diğer yazılım platformları ile birlikte kullanılabilir. ZEN Software'in çevrimiçi mağazasından satın alınabilen veya 30 günlük ücretsiz deneme sürümü sunulmaktadır. Görüntü segmentasyonu görüntü analizinin önemli bir parçasıdır, başlangıç noktasıdır. Intellesis, kolayca sağlam ve tekrarlanabilir segmentasyon sonuçları oluşturma olanağına sahiptir. Piksel sınıflandırması ve derin öğrenme gibi Python tarafından desteklenen yerleşik makine öğrenme teknikleri kullanılmaktadır. Zen Intellesis yazılımı, bir kez eğitildikten sonra yüzlerce görüntüyü otomatik olarak segmentlere ayırabilir. Böylece hızlı ve doğru analizler yapılarak datalar elde edilebilir (Manser vd., 2018).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Malzemeler

- Jelatin, Sigma, Almanya
- Alinat, Sigma, Almanya
- Kitosan, Sigma, Almanya
- Matrijel, Corning, ABD
- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Gibco, USA
- Glutamax, Gibco, USA
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, USA
- DMEM/F12, Sigma, Almanya
- DMEM/F12, Gibco, USA
- Kök hücre dondurma solüsyonu, Nutrifreeze, BI, Israel
- MKH karakterizasyon kiti, BD, USA
- %0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, USA
- TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red, Gibco, USA
- Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- Sodyum hidroksit (NaOH), Sigma, Almanya
- Paraformaldehit (PFA), SigmaveAldrich, Inc., Almanya
- 4',6-Diamidino -2-fenilindol dihidroklorür (DAPI), Sigma
- Hidrojen Peroksit, Sigma, Almanya
- Alkol, Tekkim Kimya

2.2. Sarf Malzemeler

- 25,75,175 cm2 ’lik kültür kabı, Corning
- 6,12, 24 ve 48 kuyulu kültür kapları, Corning
- 5 ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10-100-1000 µl’lik pipet uçları, İsolab
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Corning
- Steril santrifüj tüpleri (15-50 ml), Nest
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA

- Mikroskop lamı, Nest
- Kriyoviyal, Corning

2.3. Hücre Hatları

Tez kapsamında daha önce, ATCC ‘den satın alınan Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre hattı (WJ-MKH) kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücrelerin pasaj numaraları P2-P5 arasındadır.

Deneyde kullanılan GFP işaretli mezenkimal kök hücreler de bu hücre hattından elde edilmiş olup deneylerdeki pasaj numaraları, aradaki transfeksiyon ve seleksiyon süreçlerinin de eklenmesiyle 13-18 arasındadır.

Bazı deneylerde kullanılan A549 akciğer kanseri hücre hattı, İSÜ Tıp Fakültesi Genetik A.D. Öğretim Üyesi Muradiye ACAR tarafından hediye edilmiştir.

2.4. Kullanılan Cihazlar

- Floresans Mikroskobu, Zeiss Axio.Observer Z1, Almanya
- 3B Biyoyazıcı, Axolotl Biosistemler, Türkiye
- pH Metre, Ohaus, USA
- Hassas Terazi, SHIMADZU AUW220D
- Santrifüj, Hitachi, Japonya
- Hücre Kültürü İnkübatörü (CO_2inkübatörü), Panasonic, ABD
- Steril Kabin, Telstar, Norveç
- Otoklav, Nüve, OT120M, Türkiye
- Inverted Mikroskop, Nikon, Japonya
- UV Light, Omnicure S2000, Excelitas Technologies, ABD
- Manyetik karıştırıcı, Jeiotech, Korea
- Buzdolabı, Panasonic, ABD
- Mikropipetler; Rainin, Eppendorf, Isolab, Almaya

2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve Pasajlanması

Çalışmalarda, ATCC’den daha önce ticari olarak satın alınmış (ATCC no: PSC-500-010), insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı (WJ-MSC) kullanıldı. Çalışma sırasında insanlardan herhangi bir örnek alınmayacağı ve insan veya hayvanlara uygulama yapılmayacağı için etik kurul iznine gerek duyulmadı.

Hücre kültürü aşmalarında, aksi belirtilmedikçe DMEM/F12 besiyeri, %10 FSS, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 NEAA, ve gerekiyorsa %1 Glutamax eklentileri ile kullanıldı. Hücreler düzenli olarak ters mikroskopta kontrol edildi. Hücreler kültür kabının yüzeyini %80-90 oranında doldurduğunda pasajlama işlemi yapıldı. Hücreler 2-3 günde bir kontrol edilerek besiyeri değişikliği yapıldı.

Pasajlama sırasında atık besiyeri dökülerek, kültür kabının yüzey alanına bağlı olarak hücreler PBS yıkandı. TripLE solüsyonundan kullanılan kültür kabının yüzey alanına uygun miktarda kültür kabına eklendi ve 37°C 5 dakika inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra kültür kabına konulan TripLE solüsyonunun inhibisyonu için aynı hacimde serum içeren besiyeri eklendi. Kültür kabının yüzeyindeki tüm hücrelerin alındığından emin olunarak santrifüj tüpüne aktarıldı. 500g'de 5 dakika santrifüj edildı. Süpernatant atıldı, pelete 1 mL besiyeri eklendi ve pipetaj yapılarak hücrenin besiyerinde çözünmesi sağlandı. Sayım için 1.5 mL santrifuj tüpünün içine mikropipet ile 10 µl hücre ve 10 µl trypan mavisi eklendi, pipetaj yapıldıktan sonra Thoma lamına konuldu ve üzeri lamel ile kapatıldıktan sonra hücreler mikroskopta sayıldı.

Hücre sayımı formülasyonu; Toplam hücre sayısı = Sayılan hücre sayısı x Dilüsyon Oranı x 10.000 şeklindedir. Hücre sayısına göre hangi kültür kabına ne kadar sayıda hücre ekileceği karar verildi. Tarih, hücre tipi, pasaj numarası, yapan kişinin adı kültür kabına yazıldı. Santrifüj tüpüne besiyeri eklenerek hücreler sulandırıldı. Uygun kültür kaplarına besiyeri ve hücreler eklendi. İnkübatöre kaldırıldı.

2.5.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurulması

Dondurma öncesinde klasik hücre pasajlamada yapılan işlemler uygulandı. Hücreler pellet halinde santrifiujden alındıktan sonra dikkatlice süpernatant uzaklaştırıldı. Pelleti çözdükten, 1ml'de 10^6 hücre olacak şekilde dilüe edilen hücrelerin üzerine %90 FBS (fetal sığır serumu) ve %10 DMSO (Dimetil sülfoksit)'dan oluşan dondurma solüsyonu ya da hazır kök hücre dondurma solüsyonu (Nutrifreeze), yavaşça eklendi ve pipetle karıştırıldı. Hızlıca kriyojenik tüpe aktarılan hücreler -80℃ derin dondurucuda saklandı.

2.5.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözülmesi

Donmuş hücreler -80℃'den hücreler alıp hızlı bir şekilde elde çözüldü. Çözülen hücreler pipet ile 15 ml'lik santrifüj içine aktarıldı. 5 ml DMEM/F12 yavaşça eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra tüp santrifüje konuldu ve 500g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıdı. Pellet çözüldükten sonra 1 ml DMEM/F12 eklenerek iyice karıştırılıp çözülmesi sağlandı. Hücre kültürü flaskına yüzeye bağlı olarak DMEM/F12 eklendi. Hücre kültürü şişesinin tabanına yayılması sağlandı. Santrifüj tüpündeki hücreler pipet yardımıyla hücre kültür flaskına eklendi. Mikroskopta hücreler kontrol edildikten sonra inkübatöre kaldırıldı.

2.5.3. Mikoplazma Testleri

Hücreler her bir veya iki pasajda bir mikoplazma varlığı açısından test edildi. PBS ile yıkandı daha sonra hazırlanan %4 PFA(Paraformaldehit)'dan 500 ul eklendi ve 4 derecede 15 dakika inkube edildi. PBS ile yıkandıktan sonra DAPI solüsyonunda 10 ul eklendikten sonra lam ile kapatıldı ve florasan mikroskopta incelendi. Mikroskoptaki inceleme sırasında sitoplazmada noktalar şeklinde DAPI ışıması gözlenmesi mikoplazma kontaminasyonunu işaret etmektedir. Deneyler sırasında mikoplazma gözlenmedi.

2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Akış Sitometrisinde Karakterizasyonu

Hücre kültüründe üretilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olup olmadığı veya bu özelliğini korunup korunmadığının belirlenmesi için mezenkimal kök hücrelerin akış sitometrisinde karakterizasyonu yapılır. Bu işlem, kültürü yapılan hücre tiplerinin belirlenmesi için pozitif, negatif ve kontrol tüplerinde, MKH hücre yüzeyinde karakteristik olarak taşınması gereken antikorlarla boyama yapılarak gerçekleştirildi.

Analiz için yaklaşık $1x10^6$ mezenkimal kök hücre pellet şeklinde alındı. Pellet üzerine 300 µl PBS solüsyonu ilave edilir. Pozitif, negatif ve kontrol olmak üzere üç sitometri tüpü hazırlandı. Her sitometri tüpüne yaklaşık 100 µl PBS olacak şekilde hücreler paylaştırıldı. Hücrelere, pozitif tüpe; 5 µl Pozitif kokteyl antikorları (CD90, CD105, CD73, CD44), negatif tüpe; 2.5 µl Negatif kokteyl antikorları (CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR), kontrol tüpüne; 1.5 µl izotip kontrol pozitif ve 1.5 µl izotip kontrol negatif antikorlarından koyuldu. Karışımlar hassas bir şekilde vortekslendi. Karanlık ortamda 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Her tüpe 2 ml PBS solüsyonu

eklendi. 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı döküldü ve pellet üzerine her tüpe okutma yapmak için PBS solüsyonu eklenerek süspanse edildi.

Kullanılan tüm antikorlar, akış sitometresi cihazı ile uyumlu olan BD firmasından kit olarak temin edildi. Örnekler BD FACS Calibur Flow Sitometri cihazından okutularak, yine cihaza ait Cell Quest Pro yazılımı ile analiz edildi.

2.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin GFP Geni ile Viral Transdüksiyonu

Çalışmada kullanılan lentivirüsler ViroStem (Türkiye) firması tarafından hediye edilmiştir. WJ-MKH'ler 24 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarına her bir kuyucukta 30.000-50.000 hücre olarak ekildi. Ekilen hücrelere bir sonraki gün titrasyon miktarı $>1x10^9$/ml olan, içlerinde GFP geni ile antibiyotik direnç geni taşıyan lentiviral partiküller eklendi. 24 saat sonra transdüksiyon medyumu, PBS ile yıkanarak hücreler %10 FBS, %1 PS içeren DMEM/F12 kültür medyumuna aktarıldı.

2.7.1. GFP'li Hücrelerin Seleksiyonu ve Çoğaltılması

Hücrelerin transdüksiyon oranı florasan mikroskopta ve flow sitometri ile belirlendi. Ardından popülasyonu saflaştırmak için hücrelere blastisidin antibiyotiği 4-16 µg/ml oranda verildi. Blastisidin içeren besi yeri üç günde bir değiştirildi. 10 günlük seleksiyonundan sonra GFP genini ifade eden ve etmeyen hücreleri görüntülemek için hücreler floresan mikroskopta ve flow sitometride analiz edildi.

2.7.2. GFP'li Mezenkimal Kök Hücrelerin Akış Sitometrisinde Karakterizasyonu

Çoğaltılan ve ardışık seleksiyonlarla saflaştırılan popülasyonda, GFP işaretli mezenkimal kök hücre yüzdesinin ve seleksiyon verimliliğin belirlenmesi amacıyla akış sitometrisi kullanıldı. Yaklaşık $1x10^6$ mezenkimal kök hücreler pellet şeklinde alındı. Hücreler yıkandıktan sonra tüpe okutma yapmak için PBS solüsyonu eklenerek süspanse edildi. FACS Calibur Flow Sitometri cihazından okutularak, Cell Quest Pro yazılımı ile analiz edildi.

2.8. Biyomürekkeplerin Hazırlanması

Toz olarak satılan non-steril aljinat, jelatin, GelMA, kitosan gibi polimerlerden kullanılacak kadar miktar hassas terazi yardımıyla tartıldı ve UV altında steril edildi. Sonrasındaki işlemler laminar kabin içerisinde, steril ortamda gerçekleştirildi. Biyomürekkebin hazırlanmasında Kalsiyum-Magnezyum içeren fosfat tampon çözeltisi (PBS) veya kültür besiyeri kullanılabilmektedir. Çalışmamızda biyomürekkep içerisine hücreler de ekileceğinden sulandırma ortamı olarak antibiyotikli kültür medyumu kullanıldı.

5 ml biyomürekkep hazırlamak için belirli miktarlarda tartılan polimerler 15/50 ml hacimli santrifüj tüplerine alınarak üzerlerine bir pipet yardımıyla 4,5 mL antibiyotikli kültür medyumu ilave edildi. Tamamen çözünene kadar pipet ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. Karışım homojen hale getirildikten sonra santrifüjlendi ve hücreler hazırlanana kadar 37°C'de tutuldu.

Diğer taraftan kültüre edilip çoğaltılan hücreler ile santrifüjlendikten sonra elde dilen pellet, 10.000.000 hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde dilüe edildi. Dilüsyondan 0,5 ml (5 milyon hücre) alınarak biyoink karışımı üzerine eklendi. Böylece biyomürekkep içerisinde ml'de 1 milyon hücre bulunması sağlandı. Hücreler eklendikten sonra, zarar görmemeleri için pipet yardımıyla yavaşça bioink ile karıştırıldı. Sferoid deneyleri için ise biyoink hazırlanıp çapraz bağlandıktan sonra hücreler üzerine ekildi.

Kitosan kullanılan deneylerde, yukarıda anlatılan aljinat ve jelatine ek olarak, toplam hacmi %1 olacak şekilde kitosan da karışıma eklendi.

Çalışmada kullanılan GelMA ve çapraz bağlayıcı IrgaCure, Adbioink (Türkiye) firmasından kit olarak temin edildi. GelMA kullanılan deneylerin hazırlığı da benzer şekilde yapılmakla birlikte sterilizasyon için UV yerine otoklavlama yöntemi uygulandı. GelMA hazırlanışında yine ağırlık/hacim oranı hesaplanarak besiyerinde karıştırıldı. Hazırlanan örnekler 121°C'de katı programda 15 dk süreyle otoklavlandı. Örnekler baskı sırasına kadar buzdolabında saklandı.

2.8.1. Çoğaltılan Hücrelerin Biyomürekkeplere Yüklenerek 3B Biyoyazıcılarda Basılması

Hazırlanan biyomürekkepler, Axolotl marka biyoyazıcının mürekkep kartuşlarına aktarıldı. Aktarım işlemi, enjektör yardımıyla yapıldı. Kartuşlar biyoyazıcının ilgili

ekstruder bölümüne takıldı (Şekil 10). Kartuşlar biyoyazıcıda 37°C'ye kadar ısıtıldıktan sonra baskı işlemine geçildi.

Baskı işlemi de laminar kabin içerisinde steril ortamda, petri kapları içerisine yapıldı. Baskı sırasında yazıcıya yüklenen kartuşlar, önceden belirlenen basınç (3-8 PSI), sıcaklık (37°C) ve hız (%60) değerlerinde, uygun kalınlıkta (20G) iğne ucuyla, kare grid ve yuvarlak disk şekillerinde basıldı. Biyomürekkep-hücre solüsyonu, yazıcının step motorları yardımıyla X ve Y eksenlerinde hareket ettirilmesi sayesinde yüzeye 2 boyutlu olarak bırakıldı. İlk tabakanın basımı tamamlandıktan sonra nesnenin oturduğu tabla ile robotik kollar birbirinden (Z ekseninde) uzaklaştırılarak bir sonraki tabakanın basımına geçildi. Baskı bu şekilde 3B şekil üst üste katmanlar halinde şekillenene kadar devam etti. Motorların X, Y ve Z eksenindeki hareketinin hassasiyeti ile malzemenin aktığı nozzle adlı uç kısmın inceliği baskının kalitesini ve detayların inceliğini belirledi.

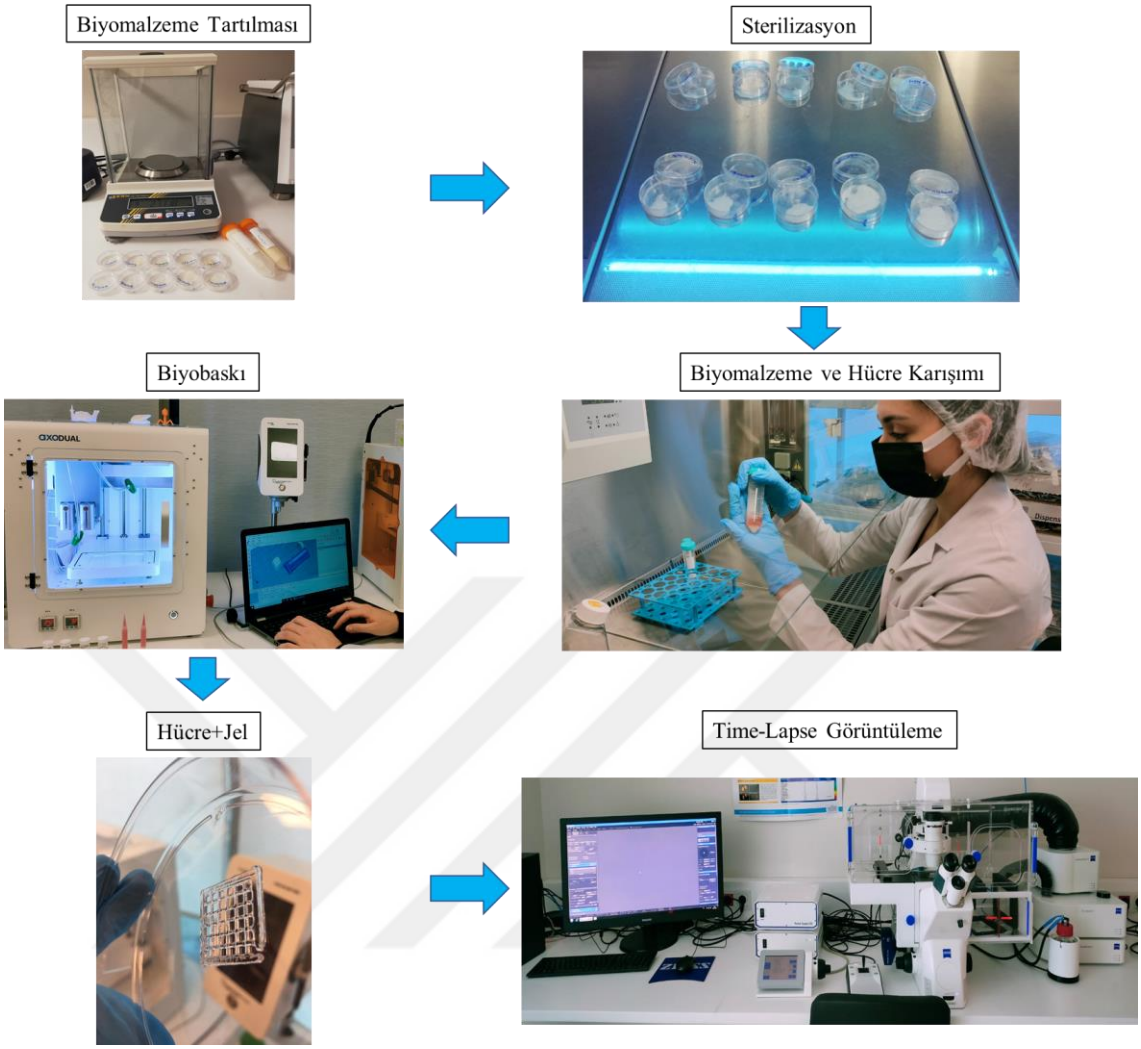
Baskı işleminden sonra örneklerin şekillerinin korunması için çapraz bağlama işlemi gerçekleştirildi. Çapraz bağlayıcı olarak 0.1N $CaCI_2$ çözeltisi hazırlandı. Aljinat-Jelatin ve aljinat içeren gruplar $CaCI_2$ çözeltisi ile 10 sn boyunca yıkanarak çapraz bağlandı. Diğer bioinklerden farklı olarak GelMA içeren biyomürekkepler OmniCure cihazında 45 sn süreyle UVB ışıması ile çapraz bağlandı.

Daha sonra besi yeri ile iki tur yıkanan örneklerin üzeri taze besiyeri ile örtülerek sıcaklıklarının sabitlenmesi mikroskobik analizler öncesinde kısa süreliğine inkübatöre alındı (Şekil 10).

2.9. Florasan Mikroskopta Time-Lapse Sistemi ile Görüntülenmeleri

Baskının ardından örnekler inkübasyon kontrollü tam otomatize Zeiss Axio Observer Z1 model inverted mikroskopta, 37°C sıcaklıkta %5 CO_2'li ortamda 24-48 saat süreyle kültüre edildi. Örnekler, belirlenen lokasyonlarda mikroskopun time-lapse özellikleri kullanılarak incelemeye alındı. Time-lapse görüntülemede örneklerden görünür ışık (BF) ve GFP (yeşil) renkler için uygun dalga boylarında ışıma veren LED lambalarda 24-48 saat boyunca her 5 dakikada bir görüntüler alındı.

Time-lapse analizler farklı biyomürekkep karışımları ve farklı hücreler ile tekrarlandı. Elde edilen fotoğraf ve videolar daha sonra CZI ve JPEG dosya formatına dönüştürülerek saklandı.

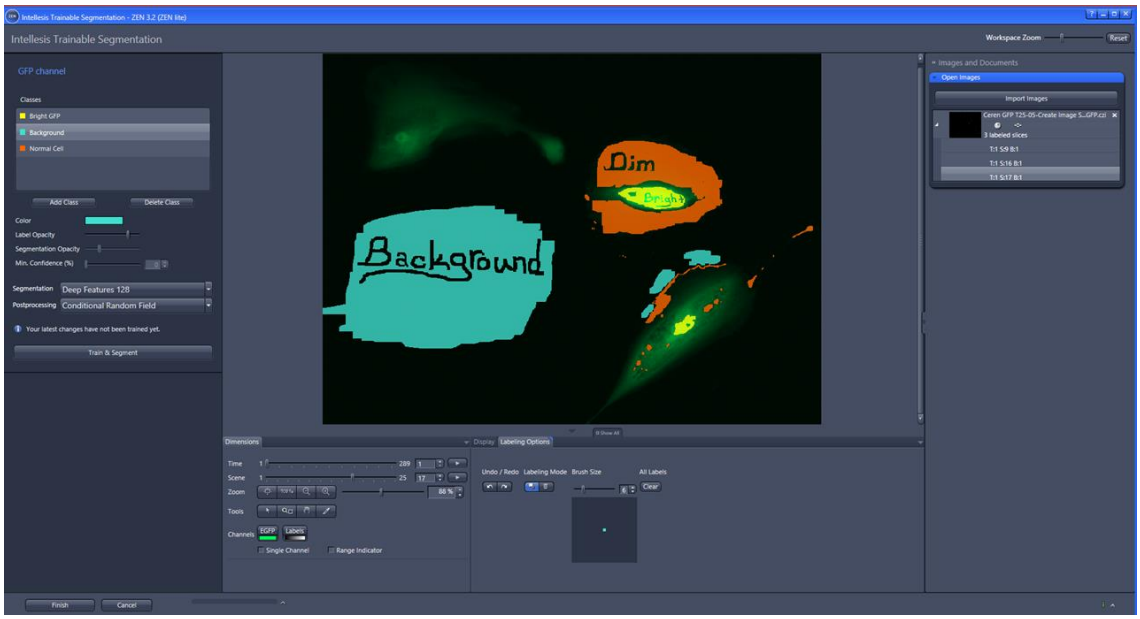


Şekil 10: Çalışmamızdaki Biyobaskı ve Time-Lapse Aşamaları.

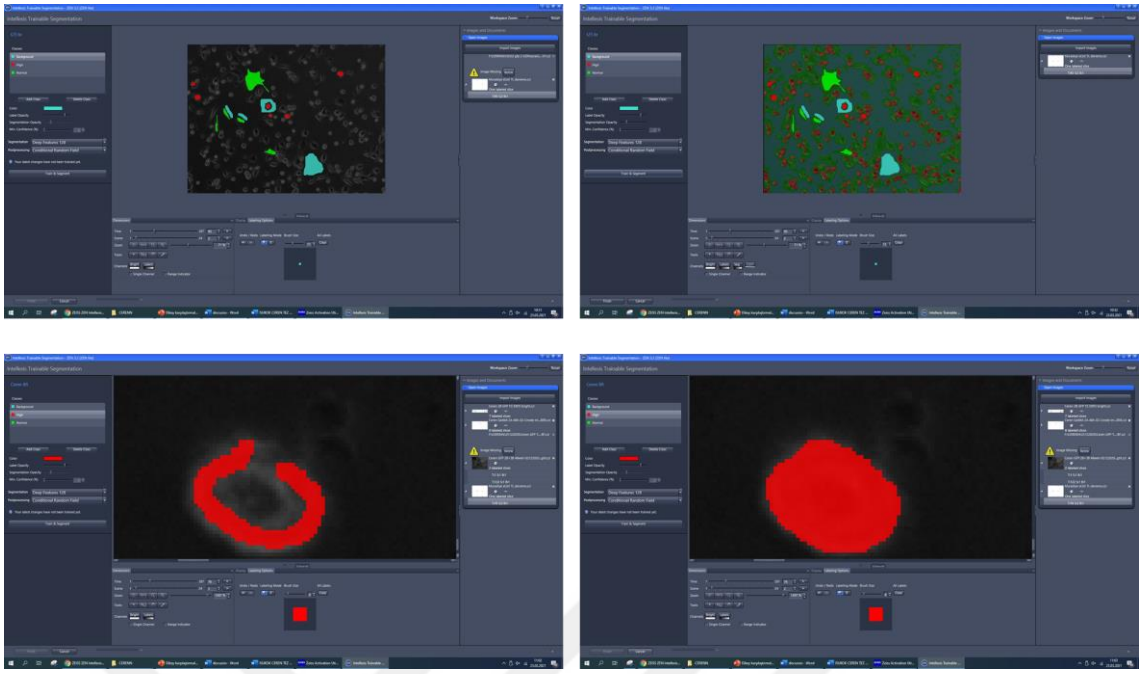
2.9.1. Intellesis Programının Kullanımı

Çalışmadaki yapay zeka analizleri için Zeiss firmasına ait Zen görüntü işleme yazılımının yapay zeka modülü Intellesis kullanılmıştır. Yazılımın maliyeti proje bütçesinin oldukça üzerinde olduğundan 1 aylık deneme sürümü ile analizler gerçekleştirilmiştir. Modülde öncelikle örnek grubundan rastgele seçilen örneklerdeki alanlar hücre içeren bölgeler ve içermeyen petri kabının tabanı olarak işaretlendi. İşaretlemede geniş hücreli/hücresiz alanlar büyük boy fırça ile taranırken hücre uzantıları gibi ince yapılar küçük boy fırça ile tarandı. Transfekte olmuş olmamış hücreler, parlak ve soluk hücreler, yuvarlak ve adherent hücreler GFP/Bright/Merged kanallarında

öğretilerek CZI formatındaki time-lapse görüntüleri üzerinden analiz edilerek sonuçlar elde edildi. Hassasiyeti arttırma amacıyla yazılıma hücre sınırları daha ayrıntılı olarak öğretilmeye çalışıldı. Önceki deneyimlerimiz doğrultusunda daha hassas sonuç veren "Deep Learning 128 derecesi ve Conditional Random Field" seçeneği aktive edilerek analizler yapılmıştır. Sonuçlarla Excell üzerinden istatistiksel yöntemlerle analiz edildi ve grafik oluşturuldu. Jelin şişme ve biyobozunma miktarı, hücrelerin ortalama hareket mesafesi, hücre sayısındaki artış/azalma, canlılık ve ölüm oranlarındaki değişimler gibi hücrelerin 3B ortamdaki davranışlarına ilişkin kıymetli veriler elde edildi (Şekil 11 ve 12). Oluşturulan 3 boyutlu görüntülerden, zaman faktörü de eklenerek 4 boyutlu bir değişim grafiği elde edildi.



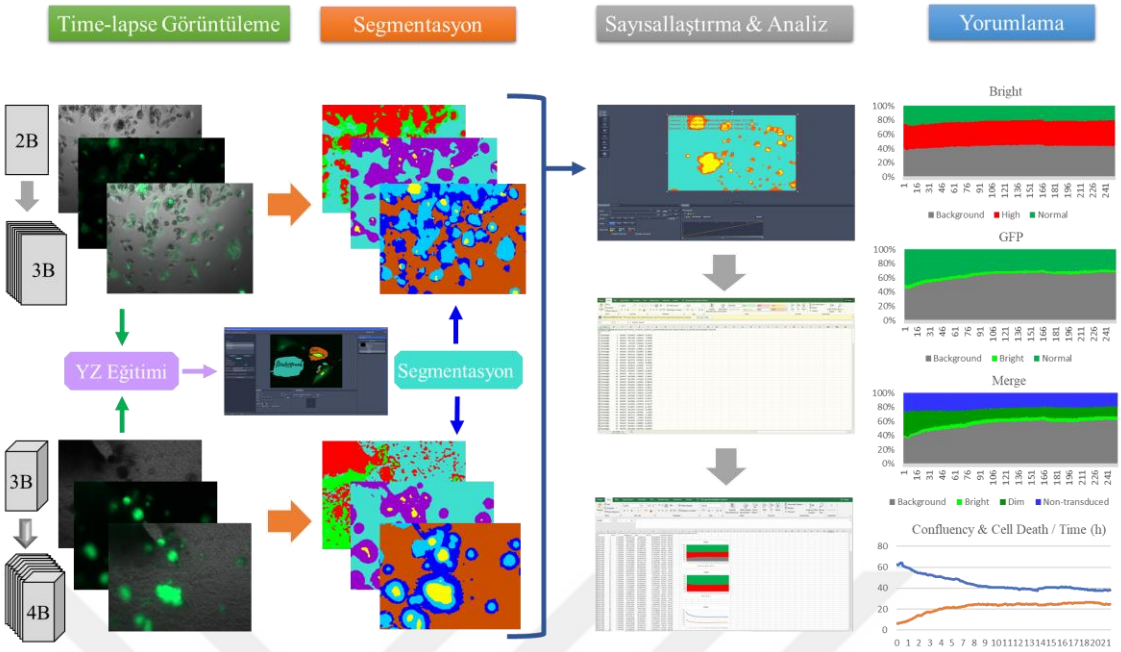
Şekil 11: Görüntü işleme.



Şekil 12: Detaylı Yapay Zeka Yöntemi.

2.9.2. Hücre Canlılığı, Morfolojisi, Dağılımları ve Hareketleri ile ilgili Sayısal Bilgilerin Derlenmesi ve Analizi

Elde edilen görüntülerden seçilen hücreler mikroskoba ait yazılımda (Zen) işaretlenip fotoğraflar üzerinden sayı, yeşil boyanmış (canlı) hücre sayısı, hücrelerin, baskının başlangıcında ve baskı sonrası kültürde geçen günler boyunca jel içerisindeki konumları, birbirleri ile kurdukları etkileşimler ve 3B ortamda hareketleri ölçüldü. Yapay zeka ile olmak üzere ölçüm şekli belirlenmiştir. Birkaç ardışık deney sonrasında elde edilenfotoğraf koleksiyonu üzerinde analizler gerçekleştirilerek deney grupları üzerinde çalışılmaya başlanmıştır. Zeiss Zen Intellesis yazılımı ile öncelikle işaretleme yapılar eğitim verildi ve daha sonra segmente edildi, belirli sayıda örnekte gerçekleştirilen segmentasyonun ardından yapay zeka yazılımı hem ilk analizlerde kullanılan örnekler tüm fotoğraflar olmak üzere toplu olarak analiz edildi (Şekil 13).



Şekil 13: Yapay Zeka Aşamaları.

2.10. Deney Grupları

2.10.1. 2B ve 3B Kültür Karşılaştırmaları

2B ve 3B hücre kültüründe hücre davranışlarının yapay zeka ile analiz edilmesi için eşit hücre miktarı kullanılarak 2B ve 3B iki deney grubunu aynı/farklı platelerde ve farklı zamanlarda time-lapse görüntülerini elde ettik. 3B hücre kültüründe, önceki çalışmalarımızdan ve literatürdeki bilgilerden yola çıkarak, farklı yoğunluklarda sadece Aljinat (%0,1,3,5,8,10) ve sadece Jelatin (%0,1,3,5,8,10,30), sadece Matrijel (30X) ve sadece GelMA içeren biyoinkler ile Aljinat-Jelatin (%3-%5), (%2-%8), Aljinat-Jelatin-Kitosan (%2-%8-%1) kompozitleri kullanıldı. Hücre olarak çoğu deneyde GFP-MKH ve bir deneyde A549 (Akciğer kanseri hücre hattı) kullanıldı.

2.10.2. Farklı Fokus Karşılaştırmaları

37°C sıcaklıkta %5 CO_2'li ortamda 24-48 saat süreyle kültüre edildi. Örnekler, belirlenen lokasyonlarda mikroskopun time-lapse özellikleri kullanılarak incelemeye alındı. Bunun yanı sıra hücrelerin 3B ortamda farklı fokuslarda yani Z düzlemlerinde

lokalize olmaması sebebiyle farklı aynı X ve Y lokasyonlarında ve farklı Z lokasyonunda time-lapse görüntüleri elde edildi.

Ayrıca hücrelerin davranışlarını daha net gözlemlemek için 20X'de time-lapse görüntüleme yapılan bir deney grubu kullandık.

2.10.3. Hücre Ölümü Analizleri

Hücrelerin kontrollü ölümünü analiz etmek için Hidrojen peroksit (H2O2) %2 oranında (0,5 M) GFP-MKH ve A549 hücrelerinde kullanıldı. Apoptoz ve nekroz açısından hücre ölümleri incelendi.

2.11. Hesaplamalar

Grafiklerde değişim saat cinsinden verilmiştir. Her fotoğraf karesi 5 dk aralıkla elde edildiğinden saatler, 12 kare 1 saat mantığı ile aşağıdaki formul kullanılarak hesaplanmıştır.

*Saat (Hours) = (Sahne*5dk)/60dk*

Görünür ışık (Brightfield) Analiz Hesaplamaları

Konfluensi miktarı belirlenirken alandaki parlak veya soluk renkli tüm alanların toplamı alınarak toplam alan olan 255 μm^2 üzerinden oranlama yapılmıştır.

*Konfluensi (Confluency) (%) = (High+Normal)/255*100*

Her ne kadar grafiklerimizin çoğunda parlak hücreler hücre ölümü olarak adlandırılsa da kimi durumlarda bu hücreler aynı zamanda yeni ekilmiş ve henüz tutunmamış hücreleri de ifade etmektedir.

Hücre ölümünün hesaplamasında dikkat edilmesi gereken nokta, hesaplamalarda ölen hücrelerin toplam alana değil, toplam hücre sayısına göre olan oranının verildiğidir. Bu oran aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

*Hücre ölümü (Cell Death) % = (High / (High+Normal)) *100*

GFP Analiz Hesaplamaları

UV kanalında, GFP ışıması ile yapılan analizlerde konfluensi oranı sadece GFP+ hücreler üzerinden hesaplanmıştır. Bu noktada, GFP- hücreler UV kanalında görünmediğinden konfluensi oranları görünür ışığa göre düşük olabilmektedir. Diğer yandan GFP+ hücreler ile arka plan net bir şekilde ayırt edilebildiğinden, görünür ışıkta yaşanan arka planın hesaplamalara dahil olması durumu GFP'de gözlenmemektedir. Buna göre hesaplamalarımızda kullanılan formüller şu şekildedir:

*Konfluensi (%) = (Bright+Normal)/255*100*

*Hücre ölümü (Cell Death) % = (Bright/(Bright+Normal))*100*

Görünür ışık + GFP Birleşik (Merge) Analiz Hesaplamaları

Görünür ışık ile UV ışık tayflarının birleştirildiği Merge kanalında konfluensi hesaplanırken her iki kanaldan gelen hücrelere ait verilerin toplanımını arkaplana oranı hesaplandı. Buna göre kullanılan formüller şu şekildedir:

*Konfluensi (%) = (Bright+Dim+Non-transduced)/255*100*

*Cell Death (%) = (Bright/(Bright+Dim))*100*

Hücre Hareketi Hesaplamaları (Sismograf)

Time-lapse görüntülerin analizinde, her iki kare arasında hücrelerin bir miktar hareket ettiği görüldü. Bu hareket her karede, küçük de olsa bir değişim yaratmaktaydı. Biz de iki kare arasındaki konfluensi ve hücre ölümü datalarındaki farklardan yola çıkarak hücrelerin hareketlilik oranlarının, diğer bir deyişle titreşimlerinin ölçülebileceği basit bir formül geliştirdik. Buna göre hücre hareketi için şu formul kullanıldı:

Formül: (Parlak tn + Normal tn) – (Parlak tn-1 + Normal tn-1)

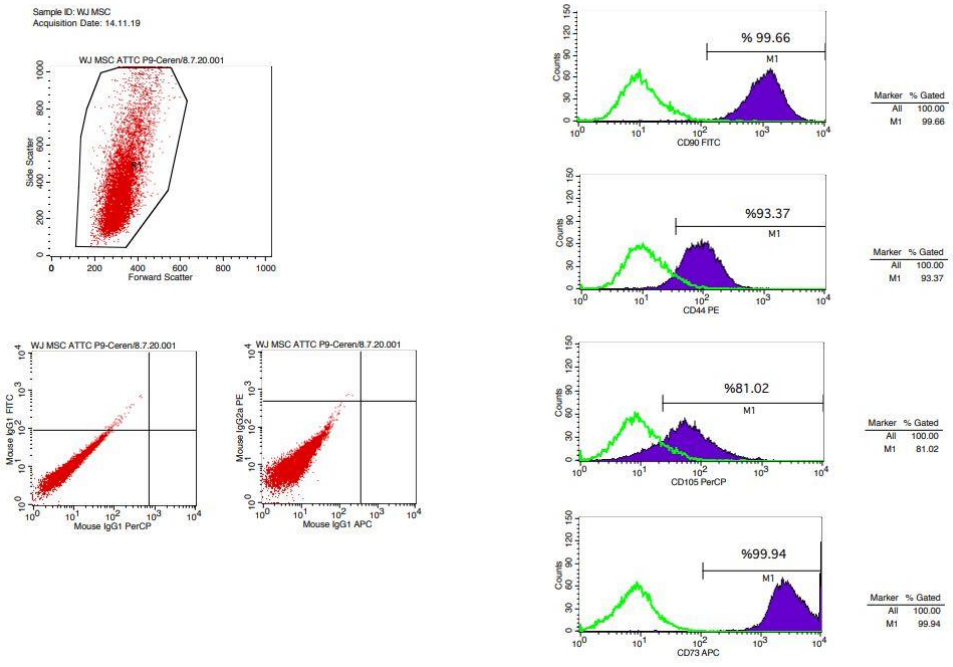
Buradaki t ölçümün yapıldığı herhangi bir zamandaki datayı, t_{n-1} bir önceki karedeki toplam hücre datasını göstermektedir. Bu formül ile iki kare arasındaki değişim belirlenerek, hücrelerin o deneydeki davranışına, yani çoğalma/tutunma/ölme durumlarına göre hareket hızlarındaki farklılıklar izlendir. Videolarda ölen hücrelerin hareket etmediği gözlendiğinden, ölmüş hücrelerdeki verilerin minimumda kalacağı hipotezi kuruldu. Bu durumu doğrulamak için yukarıda 2.9.3. numaralı bölümde belirtilen deney düzenekleri kurularak sismograf sisteminin verimliliği test edildi. Hesaplamalarda aynı kuyucuktaki veriler, ilaç öncesi ve ilaç sonrası zamanları kapsayacak şekilde iki grup olarak değerlendirildi. Bu aşamada ek olarak gruplar arası genel değişimi görebilmek için ikiye bölünmüş analizlerdeki sonuçların ortalaması alınarak grafik oluşturuldu.

3. BULGULAR

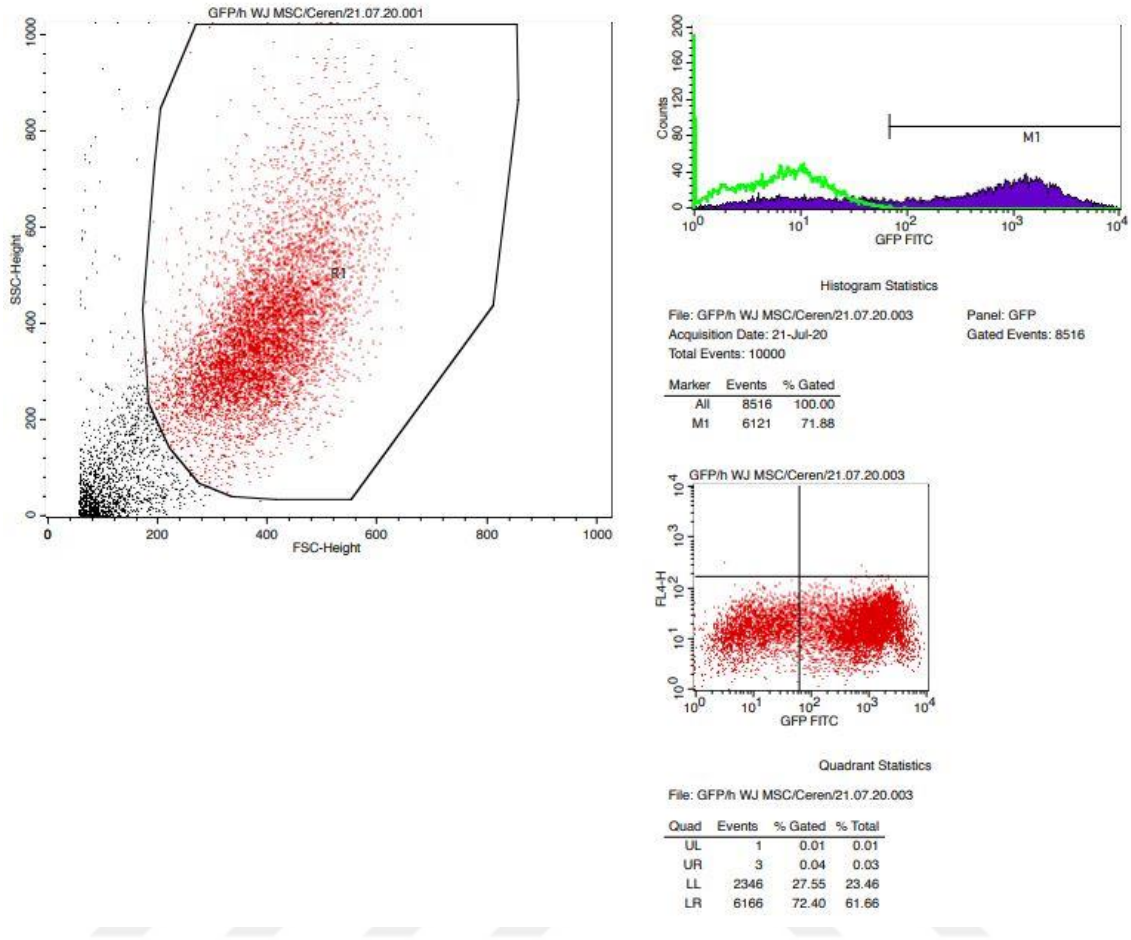
3.1. GFP Transfeksiyon Bulguları

Çalışmamızda ATCC firmasından daha önce satın alınmış ticari MKH'ler kullandık. Hücrelerse deney öncesi ve GFP transfeksiyonu öncesi ve sonrasında kök hücre karakterinde değişiklik olup olmadığını kontrol etmek amacıyla flow sitometri analizleri yapıldı.

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon sonucunda CD90 (%99.66), CD44 (%93.37), CD105 (%81.02) ve CD73 (%99.94) pozitif sonuç verdiği ve MKH akış sitometrisi karakterizasyonun pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 14).



Şekil 14: MKH Karakterizasyonu.

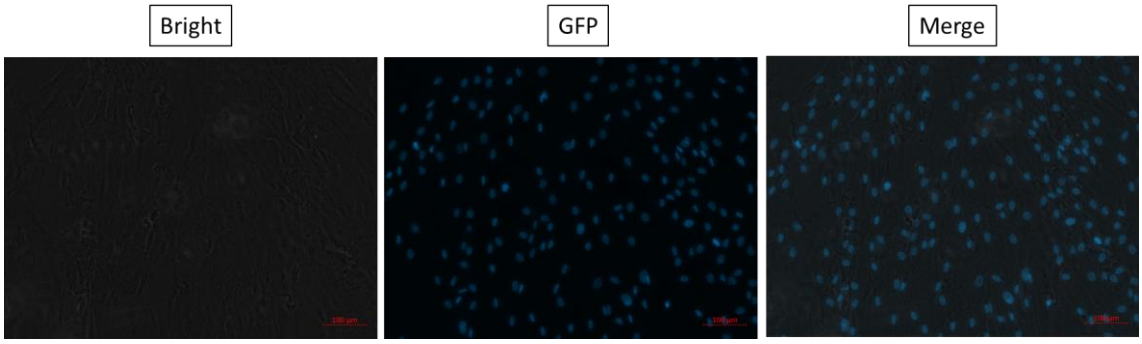


Şekil 15: GFP transfeksiyonu sonrası GFP ışıma miktarının flow sitometrik analizi. Hücrelerde transfektyon oranının % 71.88 olduğu tespit edildi.

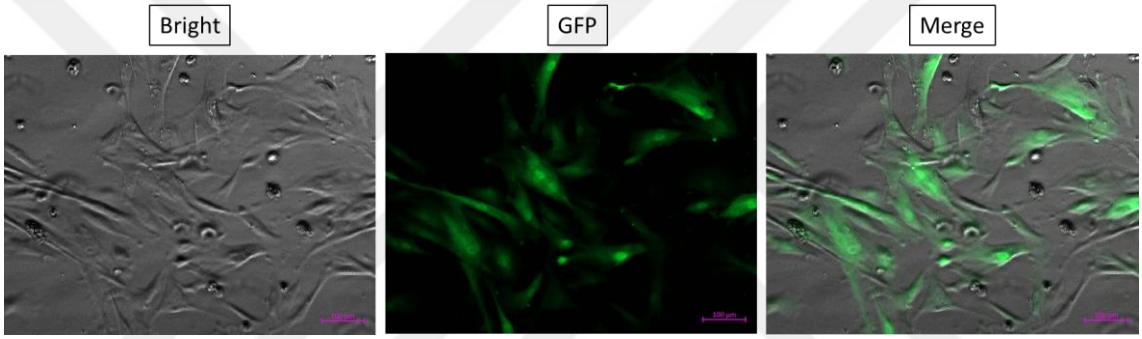
Flow sitometrik analizler GFP işaretlenmiş kök hücrelerin karakterizsyonu sonucunda GFP işaretli hücre ekspresyonu %71.88 oranında tespit edildi. Bu da bize GFP transdüksiyon ve seleksiyon aşamasının verimli olduğunu göstermektedir (Şekil 15). Ayrıca, blastisidin ile yapılan seleksiyon sonrasında hücrelerin transdüksiyon verimliliği floresan mikroskopta gözlemlendi (Şekil 17, 18 ve 19).

Ticari olarak alınan ve bütün tesleri yapılmış olmasına rağmen mikoplazma ve MKH karakterizasyon testleri yapıldı.

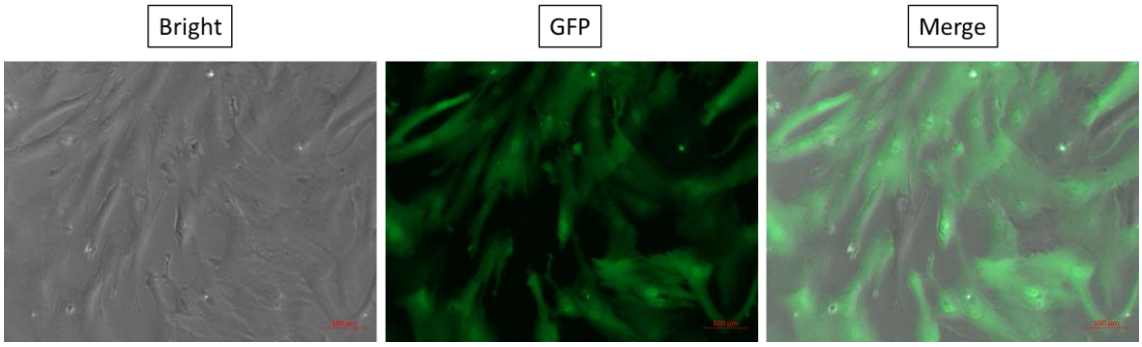
ATCC MKH hücrelerinin mikoplazma testinin sonuçlar incelendiğinde Şekil 16'da de görüldüğü üzere hücrelerin mikoplazma negatif olduğu saptandı (Şekil 16).



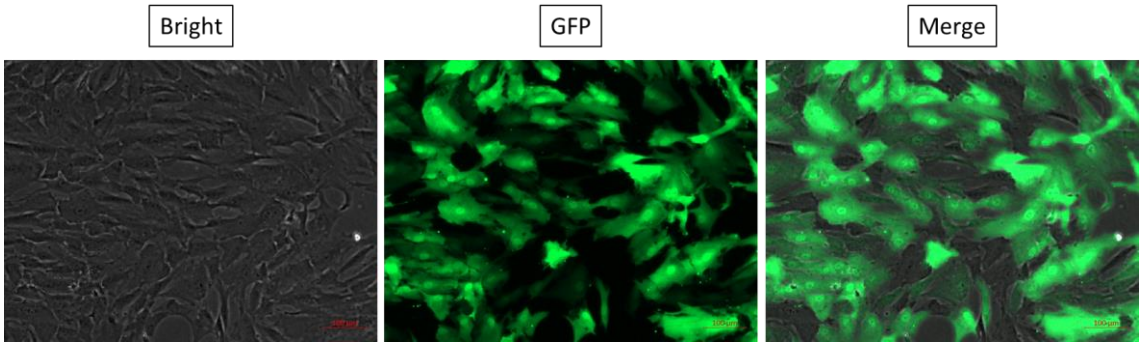
Şekil 16: Mikoplazma Testi (5x).



Şekil 17: Blastisidin Seleksiyonu sonrası GFP'li MKH.



Şekil 18: Blastisidin Seleksiyonu sonrası GFP'li MKH.

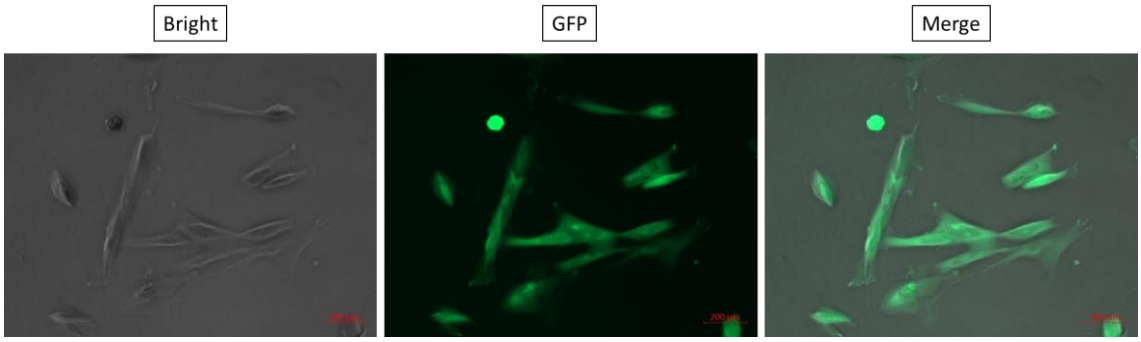


Şekil 19: 10. gün seleksiyon sonrası GFP'li MKH.

3.2. Time Lapse Görüntülerde Yapay Zeka Analizleri

2B ve 3B kültürü yapılan çeşitli örneklerden inverted floresan mikroskopta 24/48 saat sürelerde görüntüler toplandı. Elde edilen görüntüler ZEISS ZEN INTELLESIS modülüne aktarıldı. Burada öncelikle örnek grubunu temsil edecek şekilde seçilen örneklerdeki hücreler ile petri kabının tabanı (background) farklı bölgeler olarak işaretlendi. Analiz yapılan kanala (BF/UV) göre hücrelerin parlaklık düzeyi yüksek ve düşük olanlar şeklinde ayrıldı.

2B kültürdeki hücreler kültür kabına ilk ekim sırasında yuvarlak formda bulunduğu, adherent hücrelerin, kabların inkübatörde sabit bırakılmasının ardından yavaşça dibe çökerek kültür kabının yüzeyine tutunduğu ve yüzey alanını mümkün olduğunca geniş tutarak maksimum hücre adezyonunu sağladığı, rutin hücre kültüründe bilinen bir durumdur. Hücrelerin tutunma sırasındaki görüntüsü küre şekline olup, mikroskoplarda gelen ışığın kırılmasından kaynaklı parlak bir sınır ile çevrili görünmektedirler. Buna karşın tutunmuş hücrelerde hücre yüksekliği sadece 3-4 µm civarında olduğu için bu parlak hat çok daha ince bir çizgi olarak görülmekte, sitoplazmanın geri kalanı ise daha soluk renkte ve kontrast yaratan organeller dışında oldukça şeffaf görünmektedir. Çekirdek ise genetik materyalin yatay düzlemde fazla sıkıştırılamamasından kaynaklı olarak 10µ'ye varan kalınlıklarda ve buna bağlı olarak ışığın kırılması nedeniyle daha parlak görünmektedir (Şekil 20). Bu doğrultuda BF kanalındaki hücreler yüksek ışıma veren (High) ve normal ışıma veren (normal) hücreler olarak iki gruba ayrıldı.

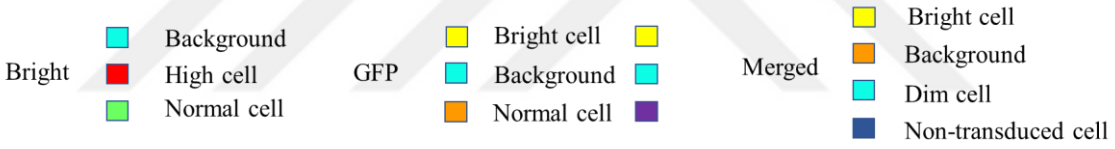


Şekil 20: 28102020 2B sahne 4, yüksek ışıma veren (High-Bright) ve normal ışıma veren (Normal-Dim) hücreler.

GFP geni aktarılmış hücre popülasyonunda da benzer biri durum gözlenmektedir. Tutunmakta olan hücreler yuvarlak ve ışıma yayan tüm GFP proteinlerinin küçük bir alanda toplanmış olması nedeniyle parlak olarak görülmektedir. Tutunmuş hücreler ise ışıma veren proteinlerin hücre ile birlikte kültür kabının yüzeyine yayılması nedeniyle birim alanda çok daha az ışıma vermektedir. Ancak görünür ışıktakine benzer şekilde UV kanalında da, hücre çekirdeğinin çevresindeki yükselen sitoplazmik bölge, birim alanda daha fazla GFP içerdiğinden çekirdek çevresi sitoplazmaya göre daha yüksek parlaklık vermektedir. Analizlerimizde hem BF hem UV kanallarında, bu bölgeler sitoplazmik alanlara göre daha parlak görüldükleri için YZ analiz programı tarafından parlak alanlar olarak sınıflandırıldı. Bu bilgiler doğrultusunda: UV kanalındaki analizlerde, transdükte edilmiş hücreler; parlak yeşil (Bright) ve soluk (Dim) olarak iki farklı kategoride sınıflandırılırken GFP ışıması hiç görülmeyen hücreler transdükte edilmemiş (non-transduced) olarak sınıflandırıldı.

Tablo 2: YZ eğitimlerinde hücrelerin parlaklık, şekil ve yapışma durumlarına göre yaptığımız sınıflandırmalar. Her sınıflandırma, Intellesis programında kullandığımız marker rengi ile de belirtilmiştir.

	Görünür ışık (Brightfield, BF)	**Ultraviyole GFP Kanalı**	**Birleştirilmiş Görüntüler (Merge)**
Parlak / Yuvarlak hücreler	High	Bright	Bright
Yüzeye tutunmuş GFP+ hücreler	Normal	Normal	Dim
Yüzeye tutunmuş GFP- hücreler		-	Non-transduced
Kültür kabınn yüzeyi	Background	Background	Background



Şekil 21: Segmentasyon Bilgisi.

Analizler sonucunda elde ettiğimiz çıkarımlardan biri de hücre ölümü sırasında hücrelerin kabın tabanında kopmaları üzerindedir. Apoptoz ve nekroz durumlarında hücrelerin adezyon molekülleri ile petri kabı ve diğer hücreler arasındaki bağlantıları kopmaktadır. Hücre iskeletindeki stres fibrillerinin kasılması ve azalan adezyon nedeniyle hücreler kabın yüzeyine daha fazla tutunamayıp küre şeklini alarak yüzeyden kalkmaktadır. Bu süreç, time-lapse görüntülerde hücrelerin ilk ekildikleri sıradaki tutunmaları ile benzer ancak tersten ilerleyen bir süreç gibi izlenmektedir. Dolayısıyla ölerek yüzeyden kalkan bir hücre de yukarıda bahsedilen tutunmakta olan hücreler gibi, yuvarlak ve parlak bir görünüm almaktadır. Çalışmamızda bu durum bir analiz yöntemine çevrilerek hücre ölümünü tespit etmek konusunda sayısal bilgi elde edilip edilmeyeceği araştırıldı.

Çalışmada kullanılan datalara ilişkin sayısal veriler:

- Deneylerde, toplam 202.266 fotoğraf çekildi.
- Toplam data boyutu 743 GB'ın üzerindeydi.
- Her bir deney setinden seçilen örneklerde gerçekleştirilen YZ eğitimi yaklaşık 15-30 dk sürdü.
- Analiz süreleri kullanılan bilgisayarın performansına ve seçilen YZ hassasiyet seviyesine göre değişkenlik göstermektedir. Çalışmamızda, eğitimin ardından tüm datanın segmentasyon işlemi, 24 saatlik deney gruplarında yaklaşık 12 saat sürerken 48 saati kapsayan deneylerde 24 saati buldu.
- Örneklerin sayısal analizi ve verilerin tabloya dönüştürülmesi işlemi her deney seti için 30 - 60 dk arasında sürdü.

Aşağıda tez kapsamında farklı örneklerle 2B ve 3B kültürlerde zamana bağlı gerçekleştirdiğimiz çeşitli analizler verildi. Her analiz bir deney grubu olarak farklı senaryoları test etmek için kurgulandı.

Deneyler sırasında elde edilen video görüntülerinin teze konması mümkün olmadığı için, deneylere ait temsili kuyucuklardan, eşit zaman aralıklarında seçilen kareler örnek olarak verildi. Ayrıca bu karelere ait segmente edilmiş görüntüler ve elde edilen datalara ait grafikler de resim olarka eklendi. Segmetasyon sonrası elde edilen Excel tabloları ise boyut olarak çok büyük (600.000+ satır) olduğu için sadece bir adet örnek tablo eklendi.

3.2.1. 2B ve 3B Kültür Karşılaştırmaları

Bu grup altındaki deneyler 2B ve 3B kültürlerdeki farklılıkları ortaya koymak için kurgulandı. Deney gruplarında farklı biyoink formülasyonlarındaki hücreler analizler edildi.

YZ analizlerinin uygulandığı deneyler öncesinde, çeşitli hidrojel kombinasyonları ile ön denemeler gerçekleştirildi. Aljinat, jelatin birlikte ve ayrı ayrı farklı yüzdelerde çapraz bağlı ve çapraz bağlanmadan hücre ekimi şeklinde deneyler yapıldı. DAPI-PI

eklenerek hücre çekirdeği boyanıp hücrenin davranışı izlendi. %0,1,3,5,8,10 aljinat ve jelatin oranları test edildi. %10 viskozitesi oldukça düşük ve hücrenin besi ortamı için uygun olmadığı görüldü. %1 oranı ise hücreler için oldukça yüksek viskoziteye sahip olduğu saptandı. Bir sonraki deneyde %2 Aljinat-%8 Jelatin, %3 Aljinat-%5 Jelatin ve Matrijel kullanılarak deneyler tekrarlandı. Matrijel ile yapılan deneyin takibinde ilerleyen günlerde matrijelin daha hızlı bozunduğu ve hücrelerin tabana tutunup yayıldığı görüldü. %3 Aljinat-%5 Jelatin ise hücrelerin hareketini yavaşlattığı gözlendi. Sonraki deneylerde %2 Aljinat-%8 Jelatin kompoziti kullanılmaya karar verildi. Yapılan diğer çalışmalarda da %2 Aljinat- %8 Jelatin oranının hücreler için uygun ortam olduğu gözlendi. Yaptığımız bu ön denemelerin sonucunda YZ analizlerinde kullanacağımız uygun Aljinat-Jelatin kombinasyonları belirlendi. %2 Aljinat - %8 Jelatin formülasyonu hem biyoyazıcıda basılabilir hem de hücreler için uygun içerikte olduğu görüldü. Ön denemelerde ayrıca YZ analizleri için farklı boyutlardaki plateler denendi ve 6 kuyucuklu kapların 3B Biyobaskı için, 48 kuyucuklu platelerin hücrelerin analizi için daha uygun olduğu sonucuna varıldı.

Hücre hareketinin (migrasyonunun) incelendiği deneyde, platede farklı noktalara yüzeyi tamamen kaplamayan bioink baskısı yapıldığında, jelin kültür kabındaki hareketi nedeniyle hücre hareketinin tespit edilemediği görüldü. Bunun yanı sıra jelin zamanla şişmesi veya bozunması da hücre davranışını incelemeyi zorlaştıran bir faktör olarak gözlemlendi.

3.2.1.1. 02122020 numaralı deney

02122020 numaralı deney 2B ve 3B karşılaştırması için dizayn edildi. %2 Aljinat-%8 Jelatin kompoiziti ile p17 6. Seleksiyon sonrası GFP-MKH kullanıldı. Deney 6 kuyucuklu platede yapıldı. 2B hücre kültüründe adherent ve henüz yüzeye tutunmamış hücrelerin olduğu ve zamanla adherent forma geldikleri gözlemlendi. 3B hücre kültüründe ise hücrelerin bir araya gelerek küresel hücre toplulukları (sferoidler) oluşturduğu gözlendi. Ayrıca hücrelerin bir süre sonra, muhtemelen apoptoza bağlı olarak GFP sinyalini kaybettikleri gözlemlendi (Şekil 22 ve 24).

Segmente edilmiş fotoğraflarda petri kabını üst (2B) ve sol (3B) kenarındaki bölgenin aydınlıkta / karanlıkta kalması nedeniyle görüntü işleme algoritmaları tarafından koyu renkli hücreler olarak algılandığı ve bunun da analiz sonuçlarını etkilediği görüldü. Diğer yandan bu durum karanlıkta UV ışık ile elde edilen GFP kanalında ortaya çıkmadığından, GFP analizde daha doğru sonuçlar elde edildiği görüldü.

GFP kanalındaki grafik sonuçlar ile time-lapse görüntüler karşılaştırıldığında, hücrelerin tutunmadan önceki yuvarlak hallerinde 'parlak (bright)' ve tutunduktan sonraki daha düşük olan 'normal' ışıma yapan alanlar, tüm GFP pozitif hücrelerin kapladığı alanı[1] yani kofluensiyi ifade etmektedir. Buna göre GFP+ alanlardaki artış hücrelerin daha geniş bir yüzeye yayıldığını göstermektedir. 2B hücre kültüründe videolardaki hücrelerin kabın yüzeyine tutunması yani konfluensisi arttıkça, analizlerdeki GFP ışımasının da arttığı gözlendi. Dolayısıyla yaptığımız analiz ile konfluensi miktarı arasında doğrusal bağlantı elde edildi.

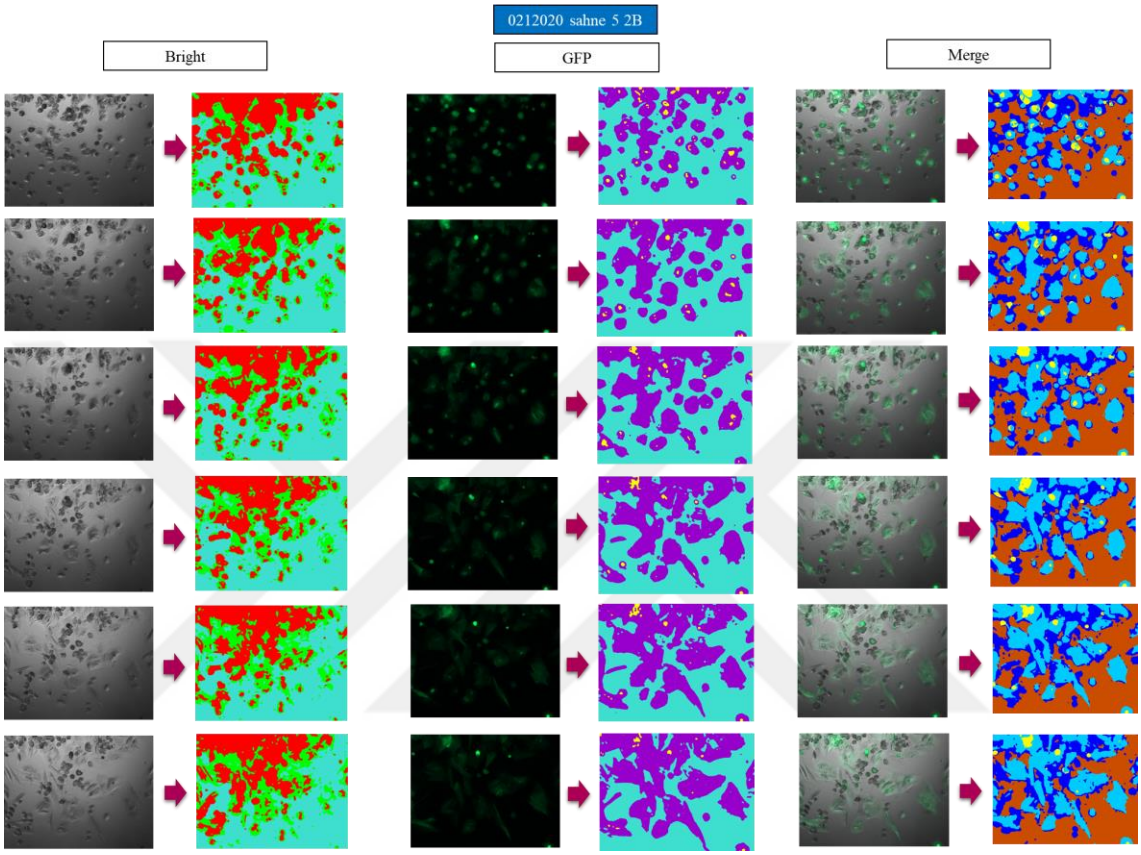
Bu noktada, videolardaki tutunan hücre görüntülerine ait başka sayısal bir veri bulunmadığı, hatta bu konudaki ilk sayısal veri elde eden sistemlerden birinin tarafımızca geliştirildiği göz önüne alınarak, istatistiksel olarak videolar ile Excel dosyaları da karşılaştırılamayacağından istatistiksel analiz ile doğrulama şansı bulunmamaktadır.

3B hücre kültüründeki videolarda, ekilen hücrelerin jele tutunmayarak birbirlerine tutundukları ve oluşturdukları sferoidlerin jel üzerinde oldukça hareketli olduğu görüldü. Bu harekete bağlı olarak bazı kuyucuklarda hücrelerin odak alanı dışına çıktıkları bazılarında seçilen alana yeni hücrelerin girdiği, çoğu durumda ise her ikisinin de gerçekleştiği görüldü. Çalışmamızda bu durumun alan dışına çıkan / içeri giren hücrelerden azalan / artan miktarlarda sinyal alınması nedeniyle sayısal verilere, konfluensi miktarında değişim olarak yansıdığı görüldü. Şekil 24'de alana giren / çıkan hücre sayısı olarak fazla değişim olmayan bir kuyucuktan alınan seri örnekler verildi.

3B örneklerde gözlemlediğimiz bir diğer problem hücrelerin X ve Y eksenindeki hareketine ek olarak basılan biyoinklerin sıvı alarak şişmesi sonucu ortaya çıkan hacimsel

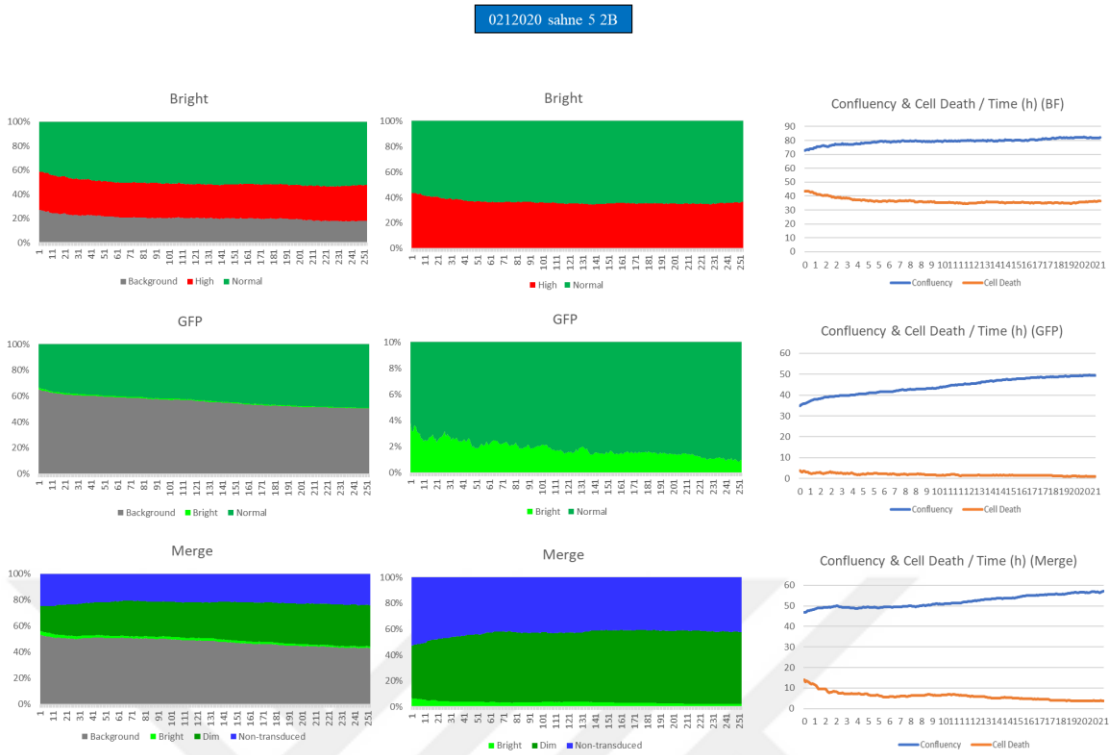
[1] Gereç ve Yöntem kısmında da belirtildiği ve Tartışma kısmında da açıklandığı üzere, hesaplamalarda konfluensi kültür kabının yüzeyi (background) dışında kalan alanlardan elde edilen gerek görünür ışık gerekse GFP sinyalleri o bölgede bulunan hücreleri, dolayısıyla konfluensiyi işaret etmektedir. Bu nedenle analizlerimizde, ışıma/hücre bulunan tüm alanların toplam alana oranı konfluensi olarak hesaplanmış ve metinde de bu şekilde belirtilmiştir.

artıştır. Bu artış hem yüzeye ektiğimiz hem de jelin içerisine gömülü hücrelerin, time-lapse analiz için başlangıçta belirlenen odaklardan çıkmalarına neden oldu. Bu durumun olumsuz etki edip etmediğiniz belirlemek için, farklı fokuslardaki analizlerin karşılaştırıldığı ayrı bir deney düzeneği oluşturulmuş olup bölüm 3.2.2'de ayrıca sunuldu.

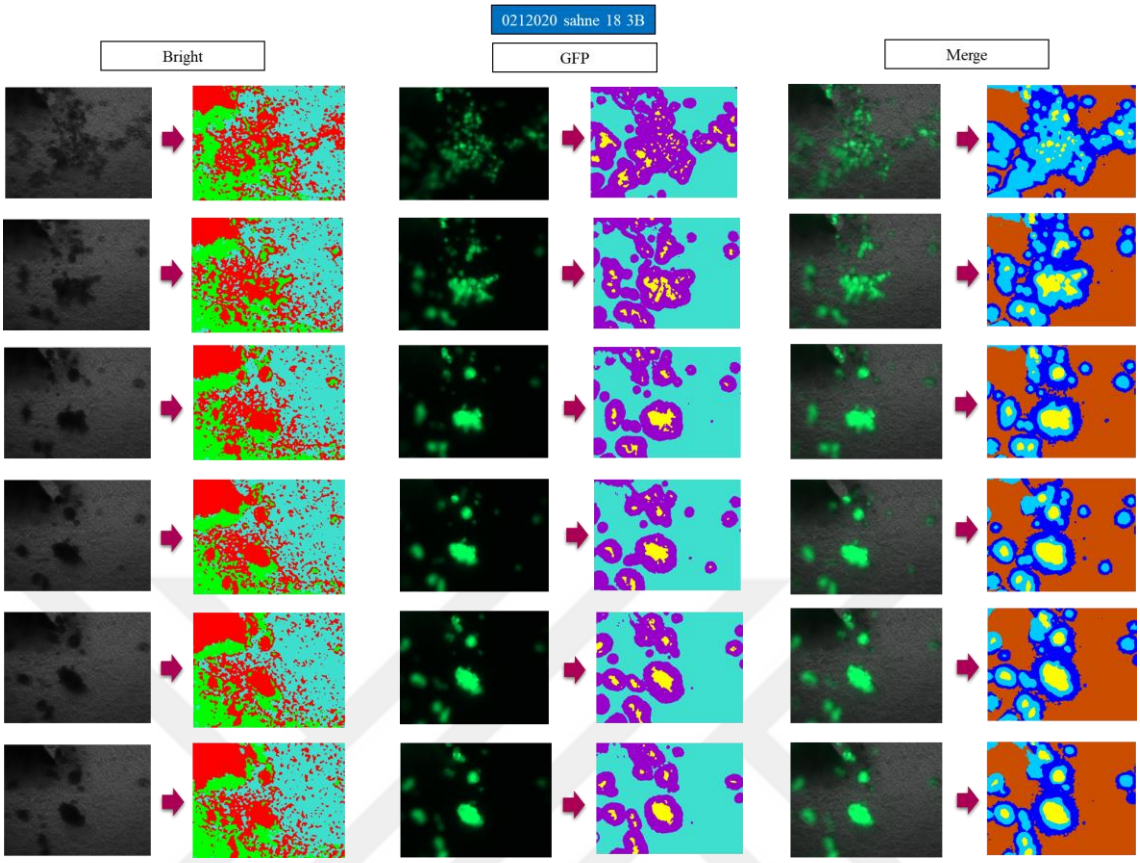


Şekil 22: 02122020 deneyi, 2B, sahne 5 fotoğrafları.

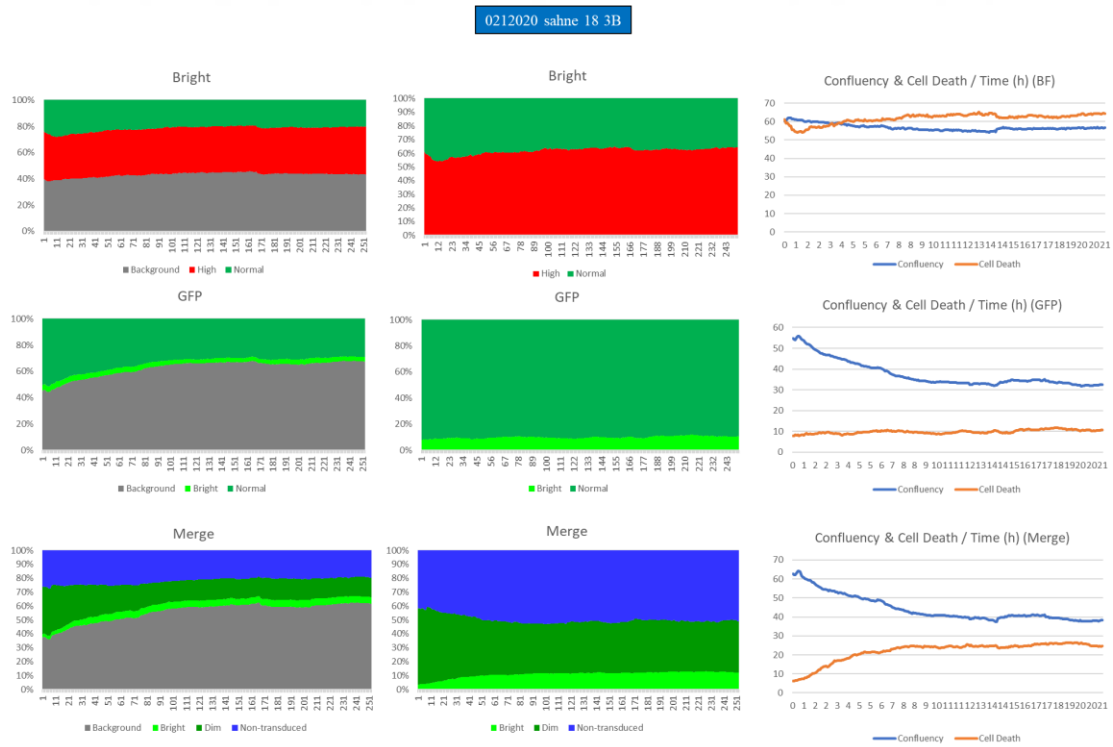
Yukarıda ve aşağıdaki örneklerde verilen resimler, deneydeki ilk kareden başlayarak, toplam kare sayısının beşte biri olacak şekilde eşit aralıklara bölünmüş zaman dilimlerinin sonundan alınmıştır. Toplamda 253 kareden oluşan bu deneyde, ilk resim birinci kareden alınmış olup, diğer her resim 50 kare sonrasını göstermektedir. Video görüntüleri teze eklenememesine rağmen bu yöntemle deney başlangıcından sonuna kadarki tüm süreç tek şekilde incelenebilmektedir.



Şekil 23: 02122020 sahne 5 - 2B grafikleri.



Şekil 24: 02122020 deneyi, 3B, sahne 18 fotoğrafları.

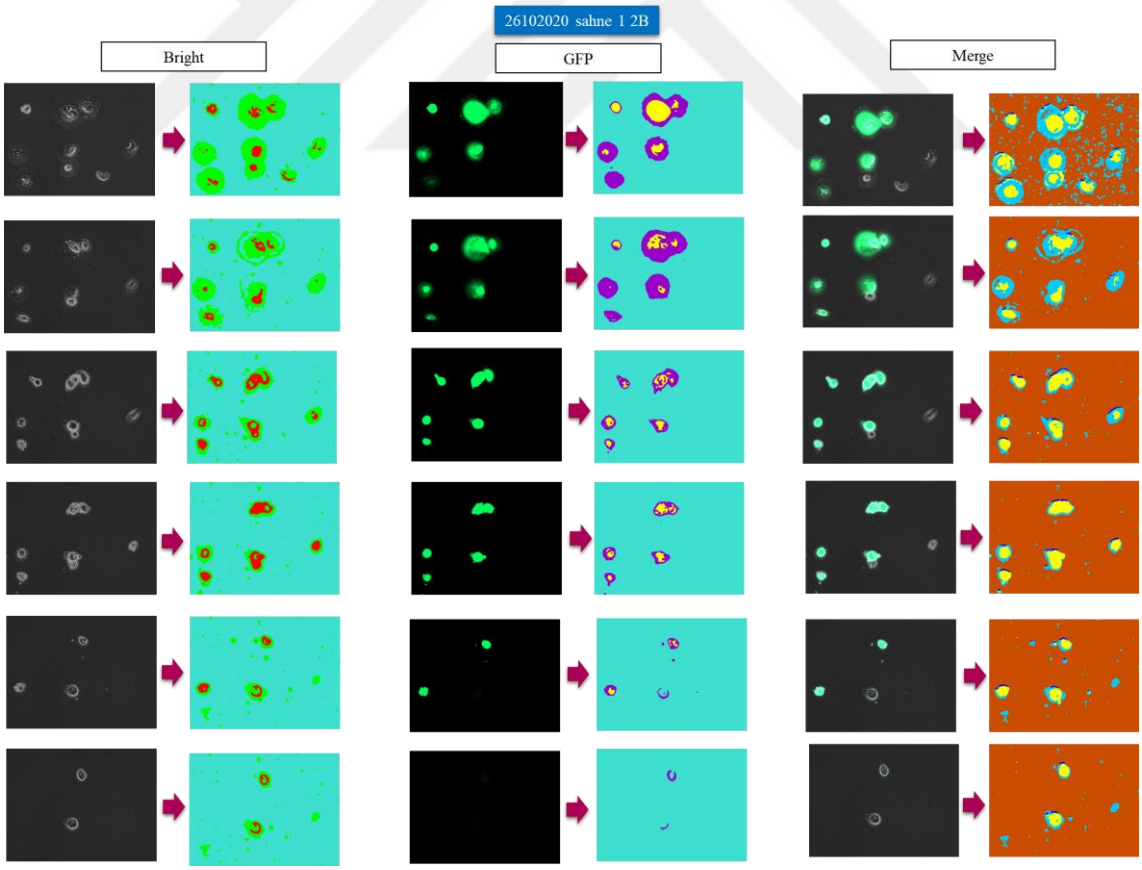


Şekil 25: 02122020 sahne 18 - 3B grafikleri.

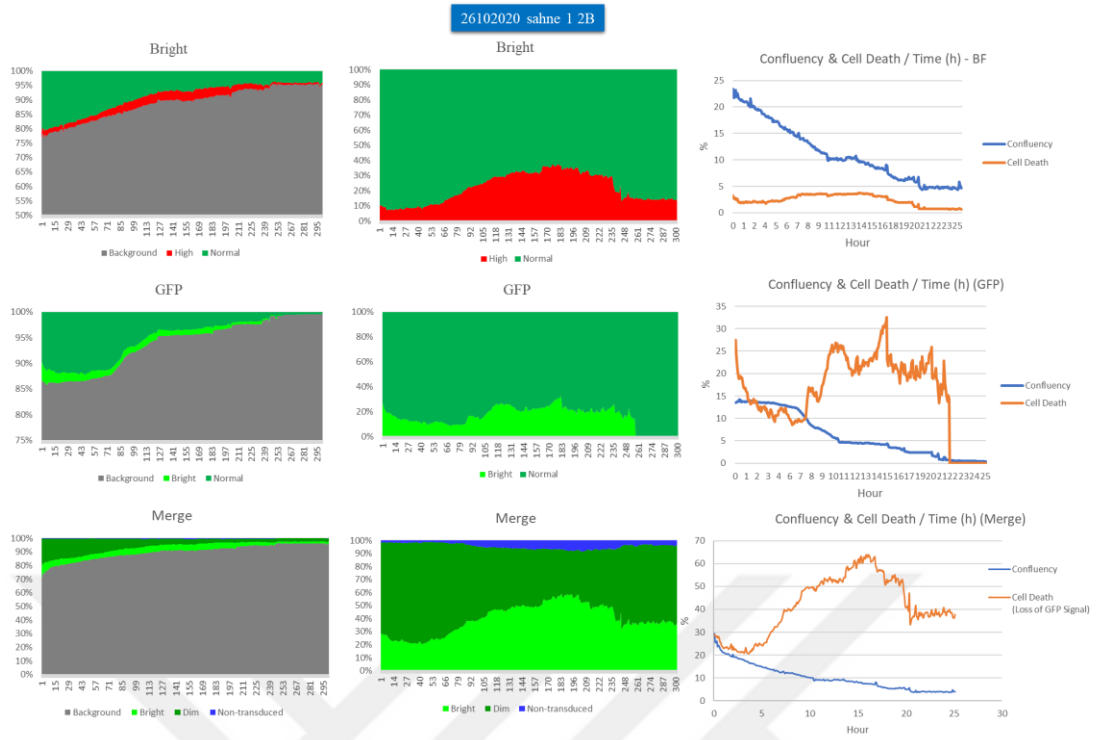
Özetle, 02122020 numaralı deneyde görünür ışık kanalındaki analizde, kuyucukların içeriğindeki ışık yansımaları, arkaplanın açıktan koyu griye değişen tonlarda renk almasına, bu da YZ yazılımının yine benzer tonlarda olan hücreler ile arka planı ayırt etmesinde güçlüğe neden oldu. Sonuç olarak bu örnekte görünür ışık kanalında net sonuç elde edilemedi. Diğer yandan yukarıdaki grafiklerde de görüldüğü üzere GFP kanalındaki analizlerin daha net sonuçlar verdiği tespit edildi.

3.2.1.2. 26102020 numaralı deney

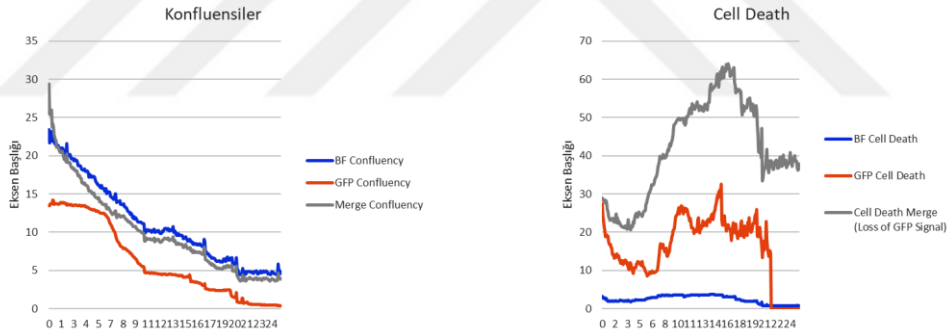
Yapılan 26102020 numaralı 2B hücre kültürü deneyinde p16 GFP-MKH hücresi ve 6 kuyucuklu plate kullanıldı. Bright, GFP ve Merge olmak üzere bütün kanallardaki videolarda konfluensisinin azaldığı ve hücrelerin apoptoza gittiği görüldü. Yapılan analizlerde de bu durumun doğrulandı (Şekil 26 - 28).



Şekil 26: 26102020 deneyi, 2B, sahne 1 fotoğrafları.



Şekil 27: 26102020 sahne 1 - 2B grafikleri.



Şekil 28: 26102020 sahne 1 - 2B örneğinde, farlı hesaplama tekniklerinin görüntü elde edilen BF, GFP ve Merge kanallarındaki karşılaştırmaları.

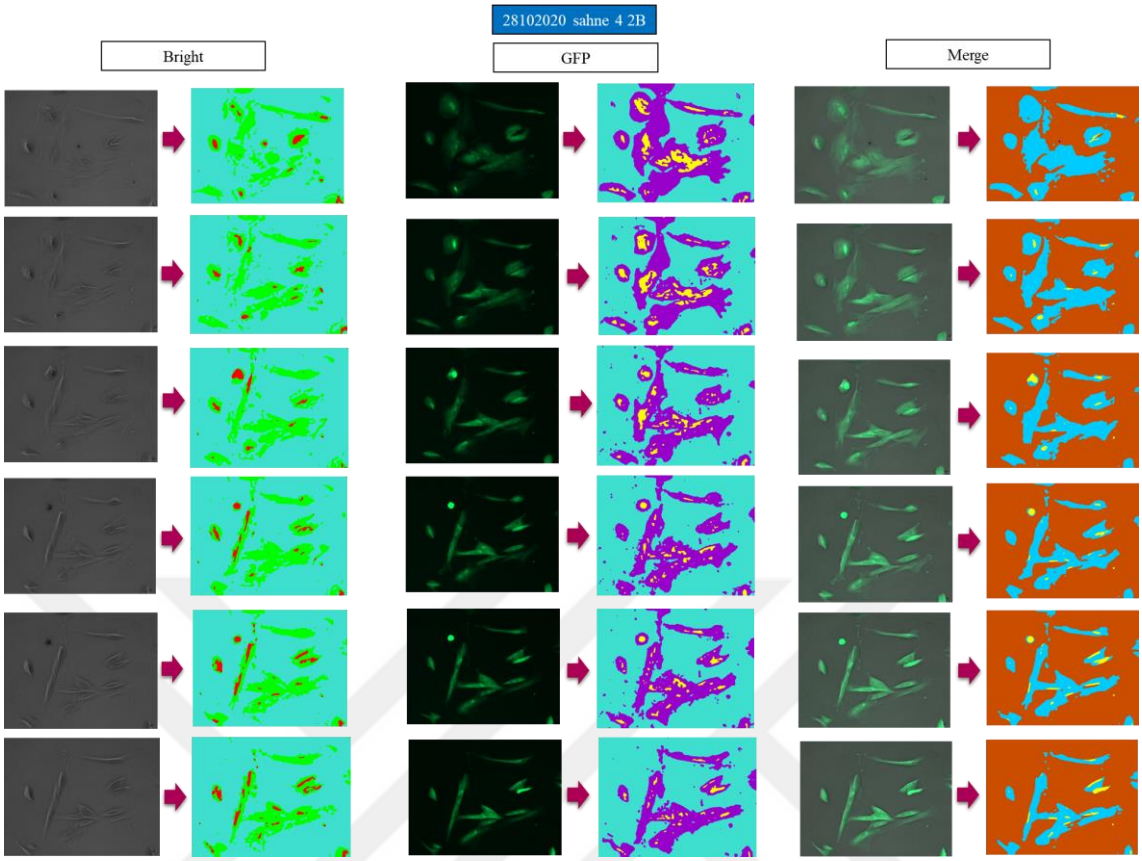
Şekil 26'da, deneyin başlangıcında hücrelerin kültür kabına tutunmakta olduğu görülüyor. Ancak deney devam ettikçe hücrelerin tutunmaktan vazgeçerek yeniden küresel şekil aldığı ve yüzeyden kalktıkları görüldü. Bu durumun, daha sonra, mikroskoba bağlı inkübatör sistemindeki bir arızadan kaynaklandığı saptandı. Daha sonraki deneylerde (Ör: Yukarıda verilen 0212200 numaralı deney) bu sorun büyük ölçüde giderildi. Ancak mevcut 26102020 numaralı deney düzeneği, hücre ölümü ile ilgili güzel analiz sonuçları verdiği için çalışmamızda aytıntılı olarak incelendi.

Her iki kanaldan ayrı ayrı ve birlikte elde edilen dataların tek grafikte gösterildiği Şekil 28'de de görüldüğü üzere tüm kanallarda konfluensi düşmektedir. Değişimin yüksek olduğu aralardaki kırılma noktaları da tüm kanallarda yakalandı. Merge kanalındaki analizlerin ise çoğunlukla GFP kanalındakilere benzer veriler verdiği, ancak hücre ölümü analizlerinde tek tek BF ve GFP kanalında yakalanmayan bazı hücrelerin de toplam hücre alanına dahil edilmesiyle hücre ölümünün bir miktar daha fazla olduğu izlendi.

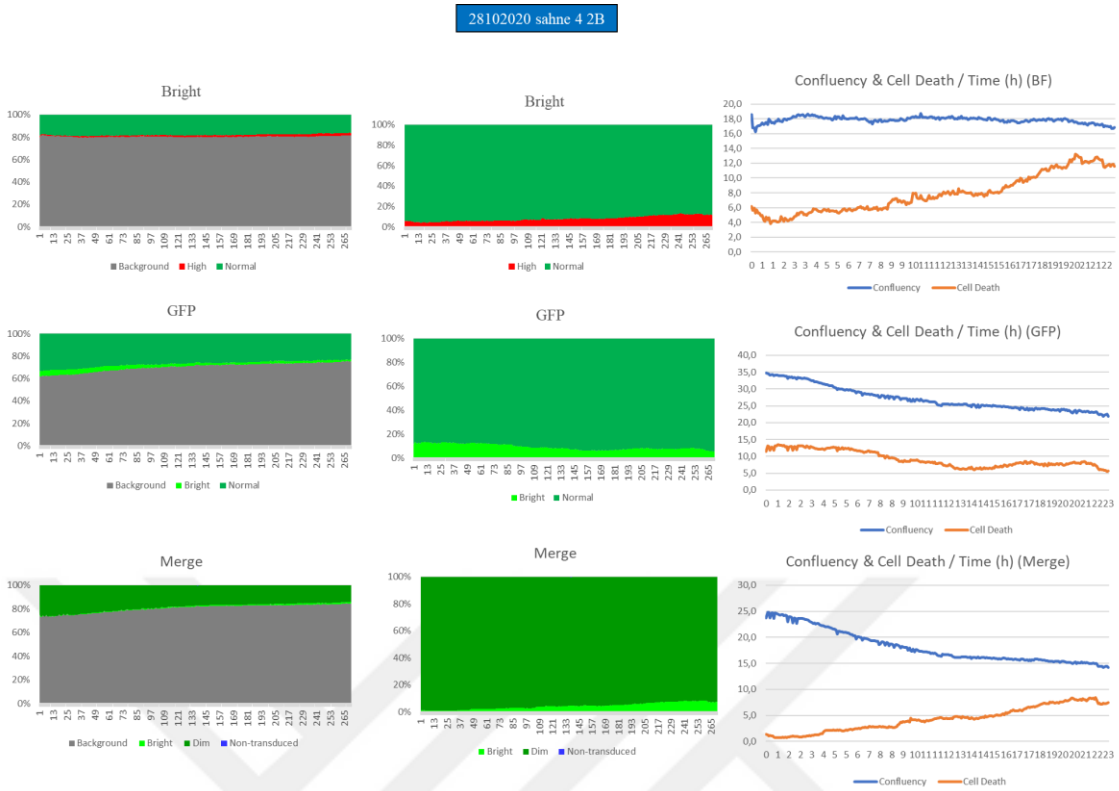
BF ve GFP kanallarındaki hücre ölümüne ilişkin datalarda özellikle GFP datasında saatler ilerledikçe hücre ölümünde de bariz artış olduğu ve bu artışın konfluensi grafiğine de yansıdığı görüldü. Deneyin sonlarına doğru ise, BF kanalında halen ölüm aşamasında hücreler görülüyorken GFP kanalında canlı hücre kalmadığı görüldü. Bu durumun nedeni olarak, videolar ve verilen örnek fotoğraflarda da görüldüğü üzere, bazı hücrelerin yuvarlak şekil alarak yüzeyden büyük ölçüde kalkmalarına rağmen, halen kabın tabanına tutunmakta oldukları, dolayısıyla da BF kanalında pozitif sonuç verdikleri saptandı. Diğer yandan, videolar ayrıntılı incelendiğinde, hücrelerin GFP sinyalini henüz yüzeyden kalkmadan önce kaybettiği gözlendi. Bu nedenle son aşamalarda halen yüzeye tutunmuş hücreler olmasına rağmen bunların protein sentezini dolayısıyla GFP ışımasını kaybeden ölü veya ölmeye çok yakın hücreler olduğu sonucuna varıldı. Bu noktadan yola çıkılarrak hücre ölümünün, hücrelerin tabandan kalkmasından daha önce tamamlanmış olabileceği sonucuna da varıldı.

3.2.1.3. 28102020 numaralı deney

Bir diğer 28102020 numaralı 2B hücre kültürü deneyinde p16 GFP-MKH hücresi ve 6 kuyucuklu plate kullanıldı. Önceki deneyde karşılaşılan hücre ölümü probleminin hücrelerin deneye erken aşamada konmasından kaynaklanabileceği düşünülerek bu deneyde hücreler ekildikten sonra tutunana kadar 60 dk bekletildi. Ardından hücreler adherent formda iken time-lapse analiz başlatıldı. Merge ve GFP kanalında yapılan YZ analizi sonrasında sayısal verilen incelendiğinde hücre konfluensisinin deneyin ilerleyen saatlerinde yine de azaldığı tespit edildi (Şekil 29 ve 30).



Şekil 29: 28102020 deneyi, 2B, sahne 4 fotoğrafları.

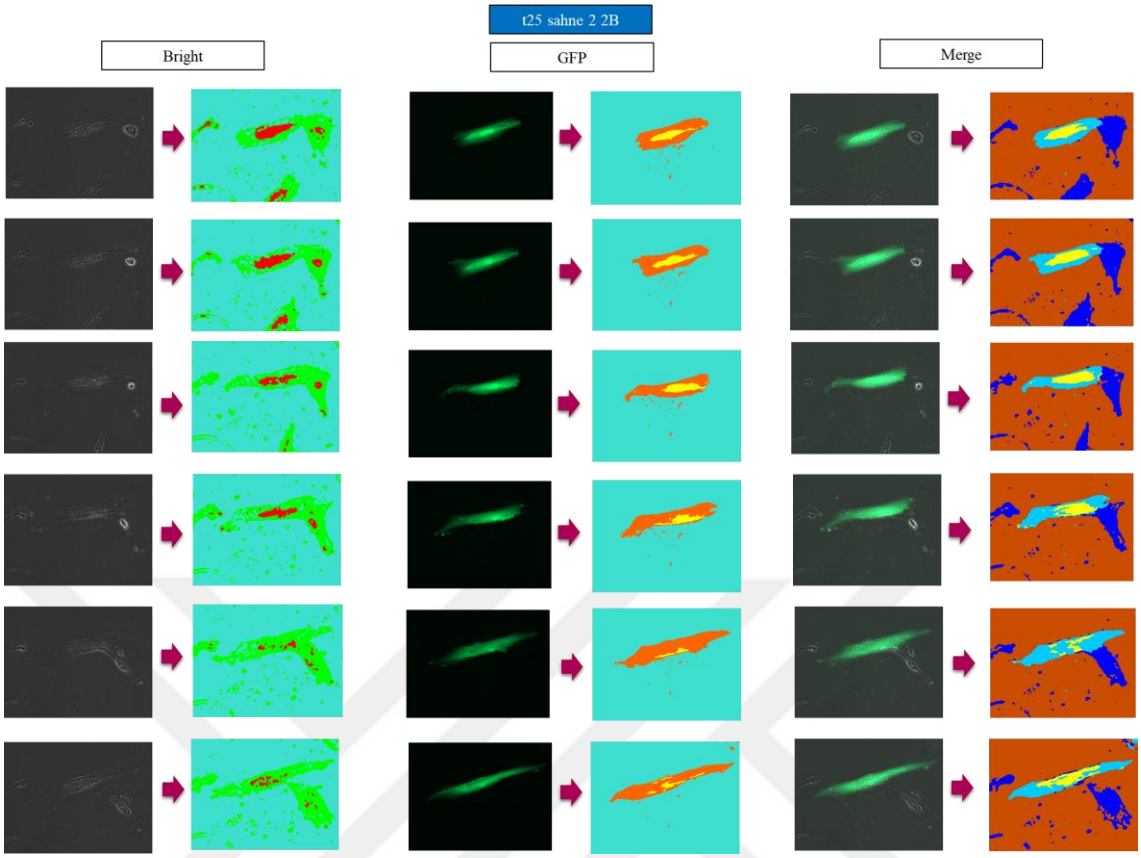


Şekil 30: 28102020 sahne 4 - 2B grafikleri.

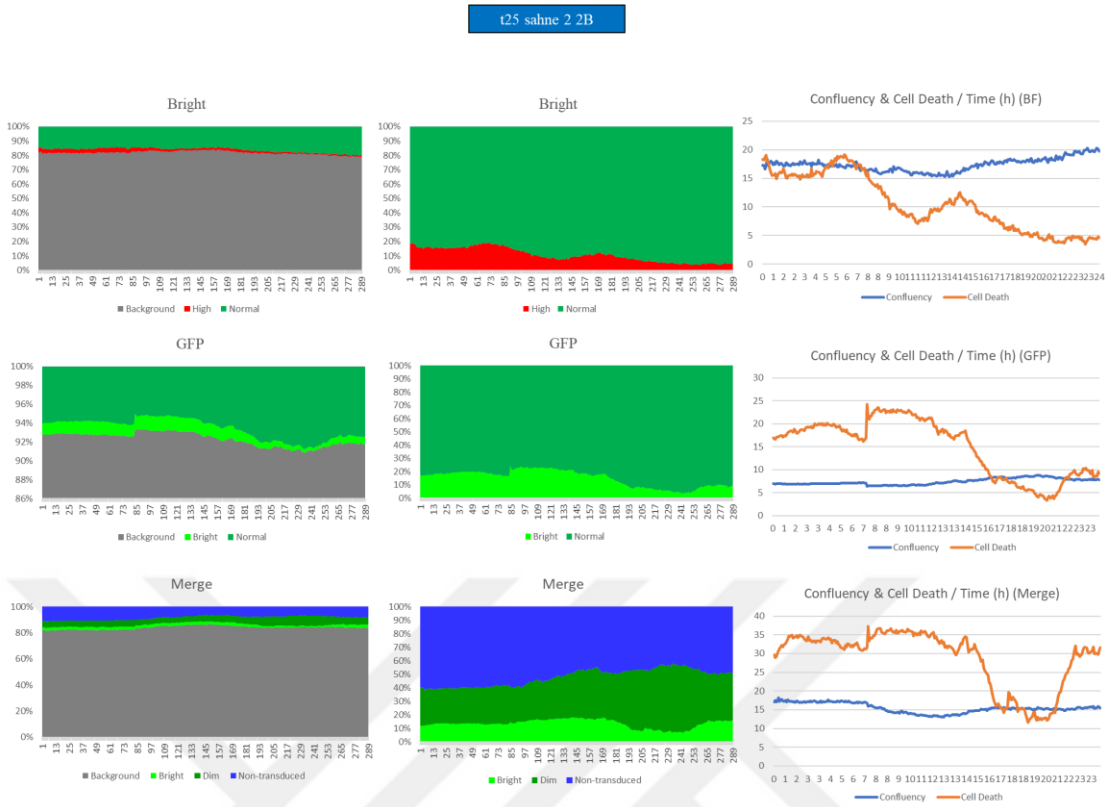
Şekil 29'daki video görüntülerinde ve şekil 30'da da görüldüğü üzere hücre ölümünde zamanla orantılı bir artış belirlendi. Buna bağlı olarak da konfluenside bir miktar azalma testip edildi. Ancak videolar ayrıntılı olarak incelendiğinde, konfluensideki azalmanın, hücrelerin kültür kabından kalkmasından ziyade, toparlanarak yüzey alanlarını azaltmalarından kaynaklandığı görüldü. Tüm analizler birlikte değerlendirldiğinde, en sağlıklı datanın, diğer deneylerde de olduğu gibi, her iki kanalın birleşiminin kullanıldığı Merge grafiğinden elde edildiği sonucuna varıldı.

3.2.1.4. T25 numaralı deney

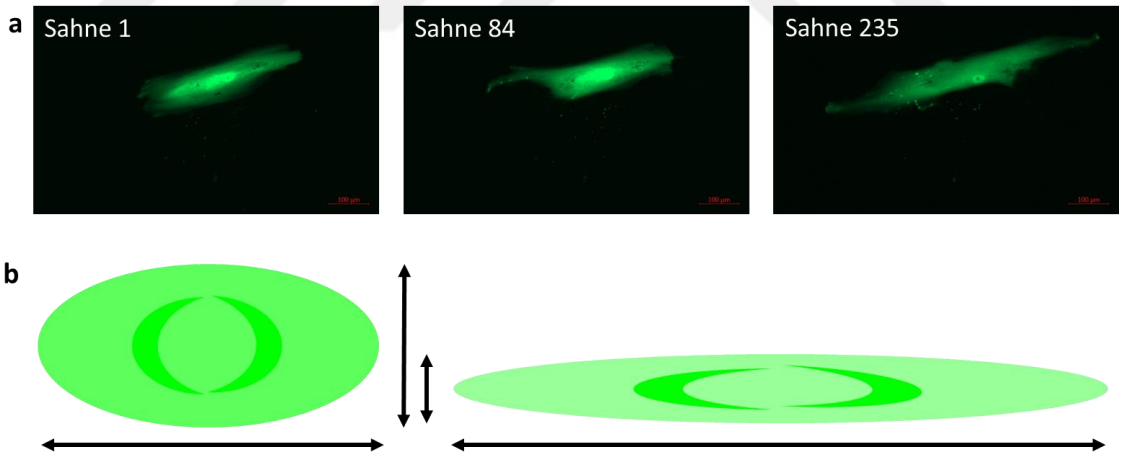
Hücrelerin davranışlarını daha net gözlemlemek için t25'de time-lapse görüntüleme yapılan bir deney düzeneği oluşturduk. Bu deneyde her kuyucukta bir-iki hücreye odaklanıldı. Bu deney sonucunda, kültür kabındaki az sayıda hücre üzerinden veri elde edildiği için genel olarak, gruplardaki hücre ölümü/proliferosyonu adına genel bir sonuç elde edilmedi. Ancak hücrelerin 2B kültürde bireysel düzeydeki davranışları izlendi (Şekil 31 ve 32).



Şekil 31: t25 deneyi, 2B, sahne 2 fotoğrafları.



Şekil 32: t25 sahne 2 - 2B grafikleri.



c

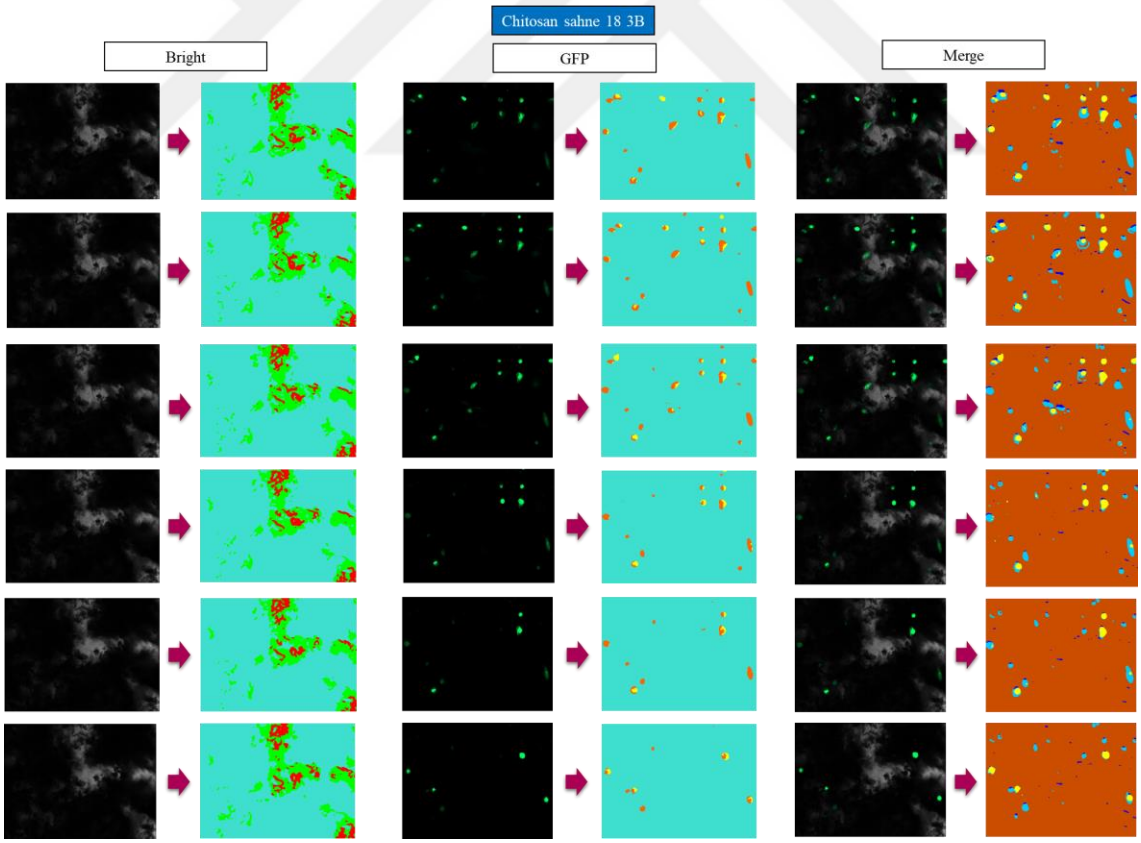
Fotoğraf	Saat	Arkaplan	Parlak GFP	Soluk GFP	Hücre Alanı (%)	Parlak alan/ Toplam Hücre Alanı
1	0	226,6853	3,030354811	14,82965111	7,0039	16,967
83	7	226,523	3,032118901	14,99018335	7,0676	16,824
84	7	228,4183	3,906755014	12,22020831	6,3243	24,225
235	20	222,1389	0,909917925	21,49650226	8,7868	4,061

Şekil 33: a) t25 sahne 2 2B örneğinden bir hücrenin deney başlangıcında, minimum (84) ve maksimum (235) yüzey alanına sahip olduğu karelerdeki görüntüsü. b) Tek bir hücrenin yüzey alanı ile GFP ışıması arasındaki ilişkiyi gösteren şekil. c) Örnek verilen hücrenin belirtilen zamanlarda kapladığı alan ve GFP düzeyi.

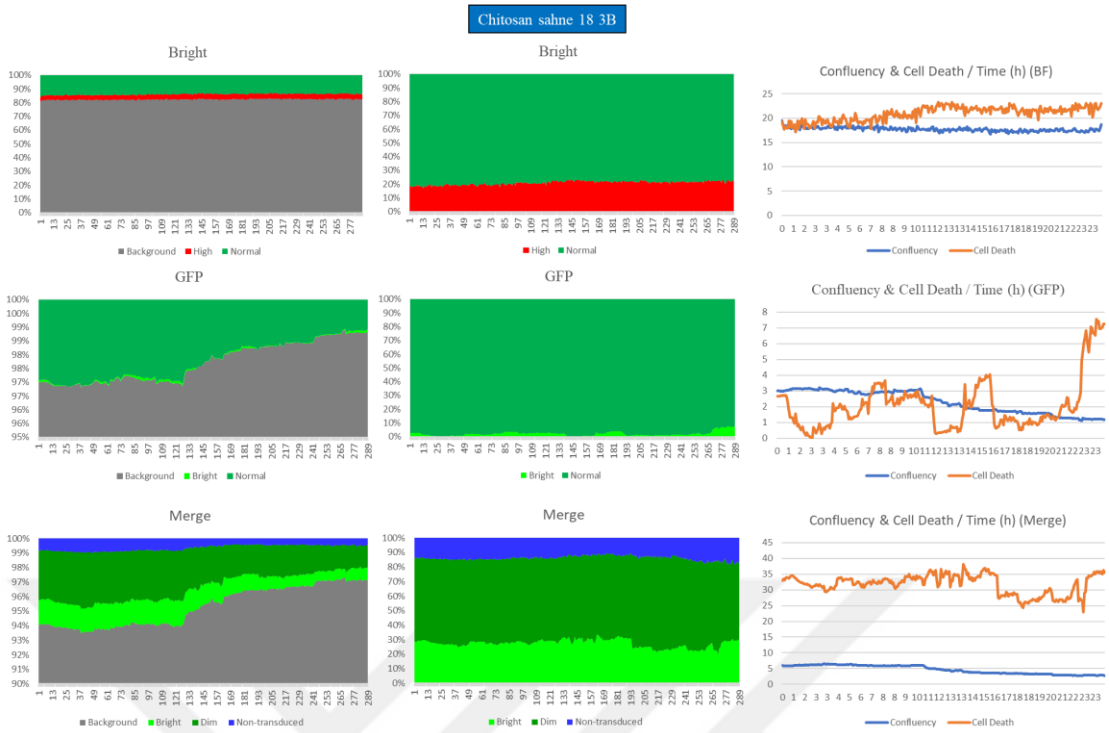
31-33. Şekiller bize tek bir hücrenin bile deney süresince yüzey alanının ne kadar değişebildiğini ortaya koymaktadır. Bu değişimler aynı zamanda hücrenin canlı olduğunun da göstergesi olduğundan bu şekilde yakın çekim elde edilen görüntüler de sismograf tekniği ile hücre canlılığının analizinde kullanılabilir.

3.2.1.5. Kitosan deneyi

Bu deney düzeneğinde, hidrojel içerisne 3B biyobaskıda sıklıkla kullanılan bir polimer olan kitosan kullanıldı. Ancak kitosan ile jel hazırlandığında polimerin ışık geçrmeyen yapısı nedeniyle BF kanalındaki ışımayı soğurduğu ve görüntü elde edilmesini engellediği görüldü. Ancak bu durum görünür ışıkta mat olan polimerden geçebilen UV ışımasının ölçülebildiği GFP kanalında yapılan analizler ile aşıldı. Deneyde Hücre ölümü arttıkça konflensi değeri de düştü (Şekil 34 ve 35).



Şekil 34: Kitosan deneyi, 3B, sahne 18 fotoğrafları.



Şekil 35: Kitosan sahne 18 - 3B grafikleri.

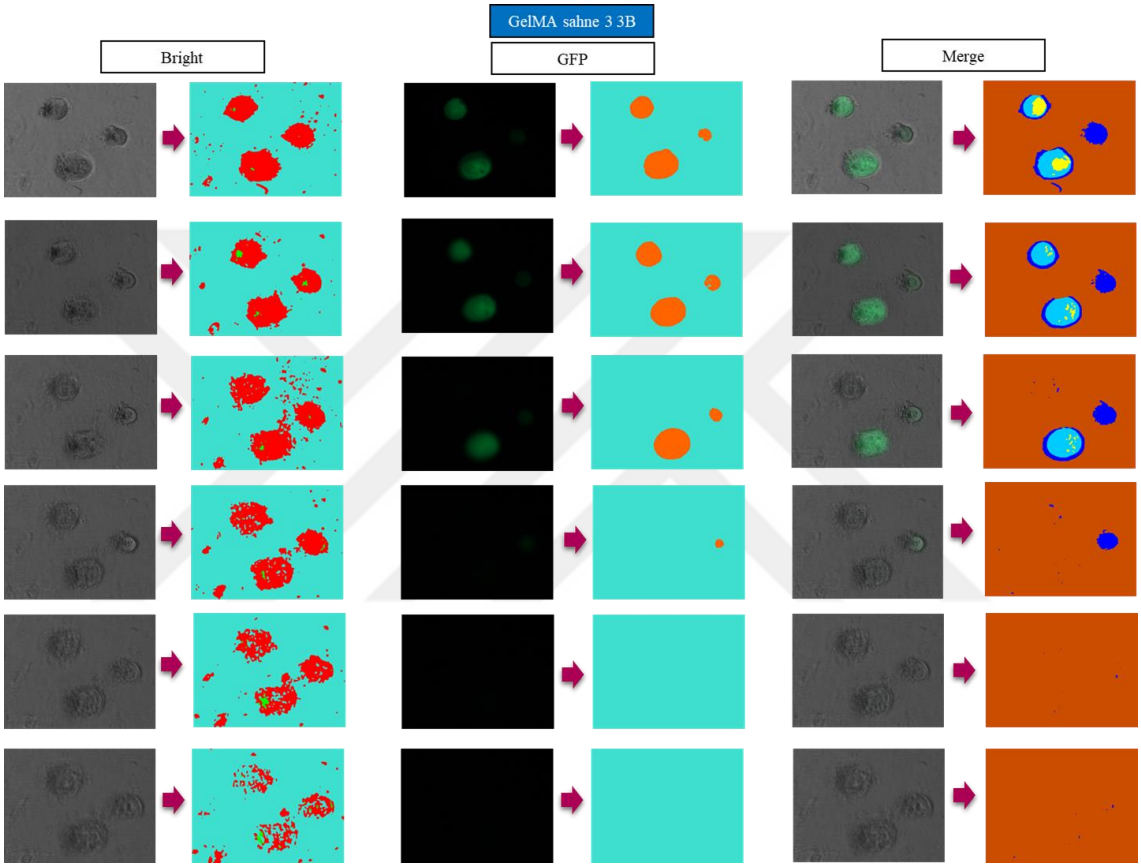
Bu deneyde, polimerlerin görünür ışığı geçirmemesinden kaynaklanan BF kanalında düzgün sonuç alınamaması durumu, Merge kanalındaki analizleri de etkilemiştir. Ancak GFP kanalındaki analizlerin bu durumdan çok etkilenmemesi bu tip karanlık alanlarda sadece GFP kanalının kullanılmasının daha uygun olacağı sonucunu doğurmuştur.

GFP ve Merge kanallarının segmentasyon datası incelendiğinde, bazı hücrelerin/alanların bir kanalda parlak hücre olarak sınıflanırken diğer kanalda normal olarak sınıflandığı görülmüştür. Bu durumun, yapay zeka eğitiminde parlak hücrelerin tanımlanması sırasında farklı parlaklık değerlerinin seçiminin sonucu etkileyebildiğinin bir göstergesidir. Bu olumsuz durumu gösterebilmek yeniden yapay zeka eğitimi verilmeden adına analizler olduğu gibi bırakılmıştır.

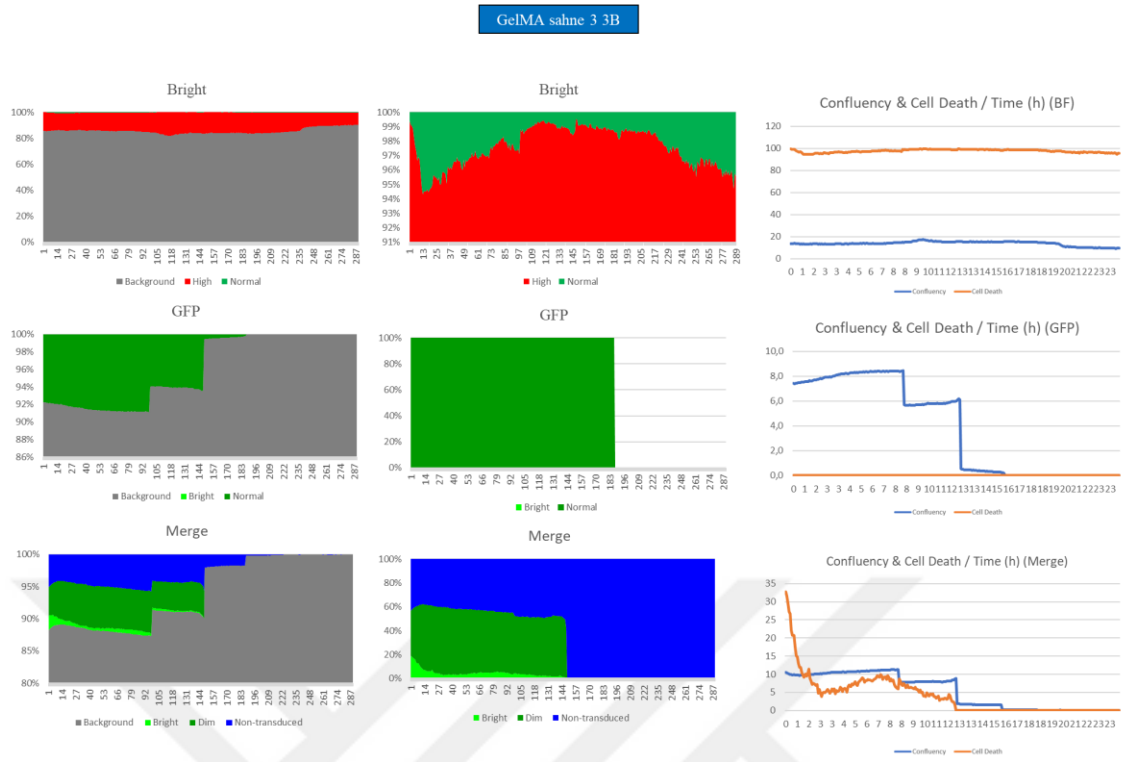
3.2.1.6. GelMA deneyi

3B hücre kültüründe yapılan deneylere ek olarak GelMA kullanılarak deney kurgulandı. Hücrelerin GelMA içeren bioink kaplı yüzeye yapıştığı analizler sonucunda yine bazı hücrelerde hücre ölümü gözlemlendi. Bright kanalında yapılan analizlerde

hücrelerin kapladığı alan, polimerin rengi ile benzer olduğu için YZ algoritmasının, hücreler ile arkaplanın ayrımında zorluk yaşadığı saptandı. Hücreler yüzeye sıkı şekilde tutunduğu hatta bir miktar biyoinkin içerisinde gömülü olduğu için hücre yüzey alanının 4B analizde değişmediği gözlendi. Dolayısıyla hücre ölümünü BF kanlında algılanamazken GFP ve Merge kanallarında GFP ışımasının kaybolması ile hücre ölümü tespit edilebildi (Şekil 36 ve 37).



Şekil 36: GelMA deneyi, 3B, sahne 3 fotoğrafları.



Şekil 37: GelMA sahne 3 - 3B grafikleri.

Şekil 37'deki grafiklerde hücre parlaklığı ve konfluensisindeki keskin düşüşler, görüntüde 2-3 adet hücrenin bulunduğu 20X objektifle görüntü elde edilmesinden ve buna bağlı olarak bir hücrenin ölümünün bile toplamda büyük bir yüzdesel değişime neden olmasından kaynaklanmaktadır. Bu açıdan bu deney t25 deneyi ile benzer şekilde hücrelerin yakın çekimde de güzel sonuçlar verebileceğini ancak bunun, çok az sayıda örnekten elde edildiği için kültür kabındaki yüzbinlerce hücreyi temsil edemeyeceği görüldü.

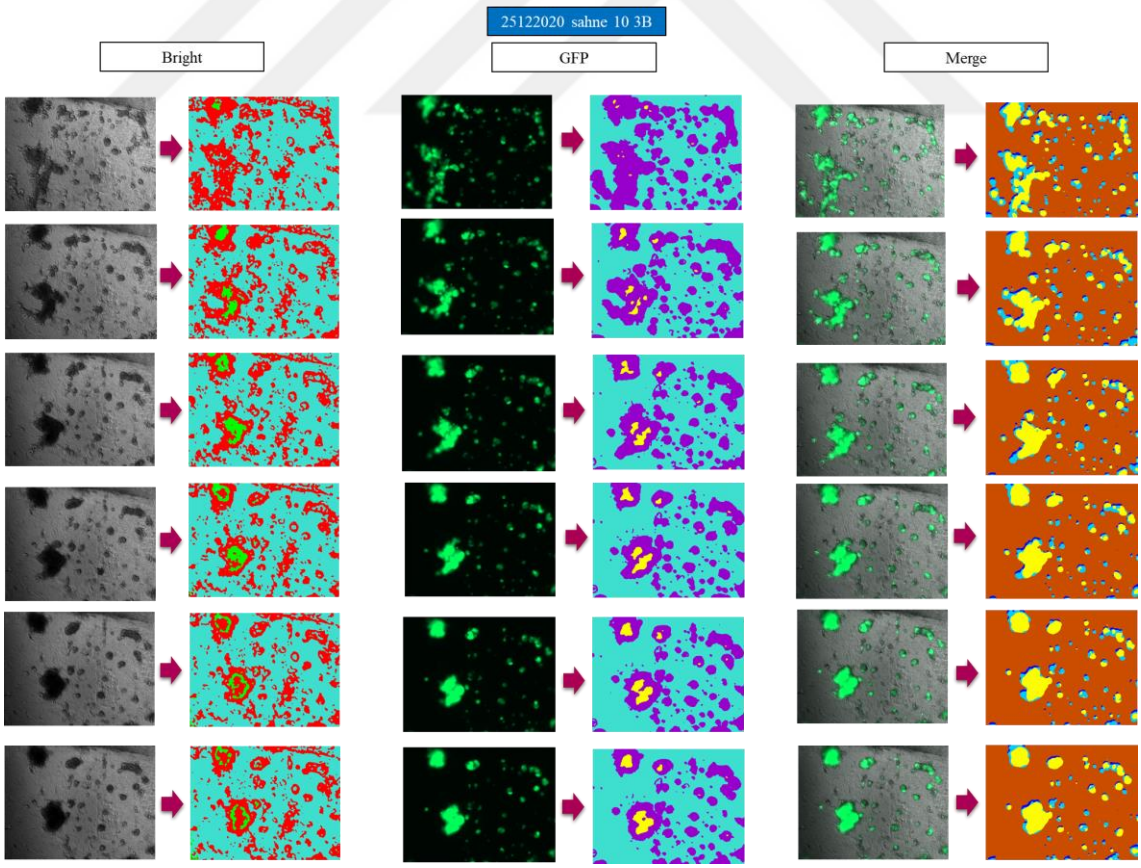
3.2.2. Farklı Fokus Karşılaştırmaları (25122020 numaralı deney)

3B kültürlerde hücreler jel içerisinde farklı düzlemlerde bulunmaktadır. Bu durum odaklamada ve data eldesinde problemlere neden olabilmektedir. Ayrıca hidrojellerin su/besiyeri çekerek şişmesine de bağlı olarak da başlangıçta odaklanılan hücreler fokus alanından çıkabilmektedir. Dolayısıyla mikroskobun analiz için çok sayıda düzleme odaklanılan Z-stack metodu ile örnek alınması gerekmektedir. Ancak çoğunlukla bir düzlem üzerinden gerçekleştirdiğimiz analizlerimiz bile 600 GB'tan fazla data ürettiği

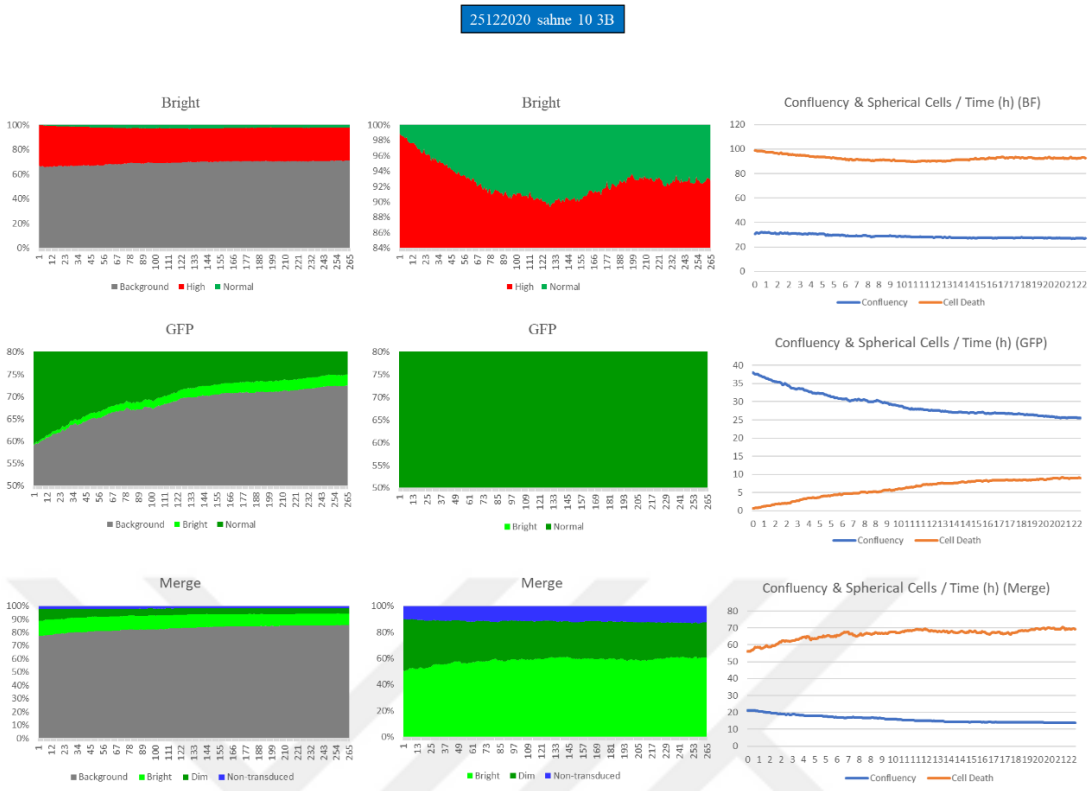
düşünülürse bu şekilde elde edilebilecek bir deney datasının mevcut verinin 10-50 katına dahi çıkabileceği öngörülebilir. Bu datanın saklanması ve işlenmesi de ayrı birer zorluk olacaktır. Bu nedenlerle, farklı düzlemlerdeki hücrelerin tek seferde analiz edilmesi zaman ve kapasite açısından tasarruf edilmesini sağlayacaktır.

Hücrelerin farklı düzlemlerde olmasının bir diğer yan etkisi, odaklanılan düzlem dışındaki hücrelerin de bulanık da olsa sinyal göndermesidir. Konfokal mikroskoplarda minimalize edilebilen bu problem, yüksek maliyeti nedeniyle konfokal mikroskoba sahip olmayan laboratuvarlarda ortadan kaldırılamamaktadır. Araştırmamızda, aslında negatif bir özellik olan odak dışındaki hücrelerin de sinyal veriyor olmasını avantaja çevirerek bu hücrelerin de analiz edilebilirliğini test ettik.

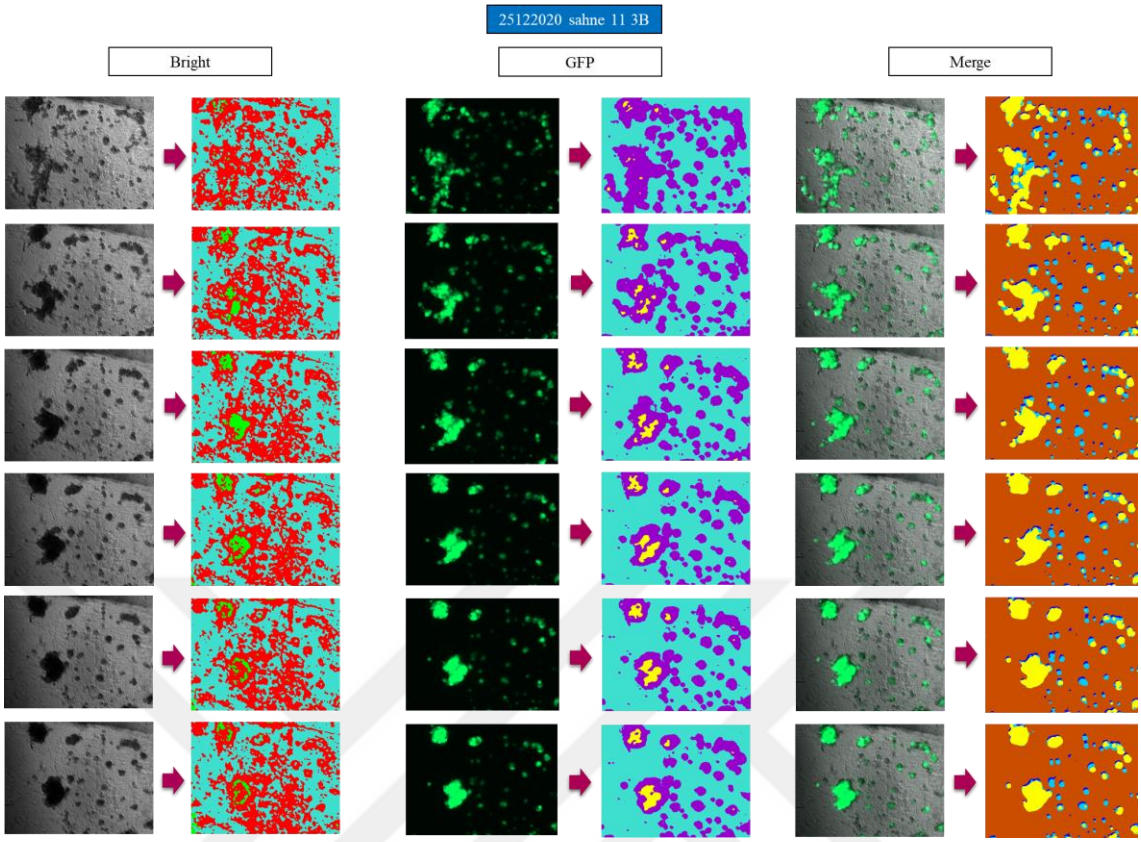
Bunun için hücrelerin aynı alanda, farklı düzlemlerde yoğun olarak bulunduğu lokasyonlar belirlendi. Bu lokasyonlardaki farklı Z düzlemlerine odaklanılarak değişik alanlarda üs üste binen ışımaların yer aldığı time-lapse görüntüleri elde edildi.



Şekil 38: 25122020 deneyi, 3B, sahne 10 fotoğrafları.



Şekil 39: 25122020 sahne 10 - 3B grafikleri.

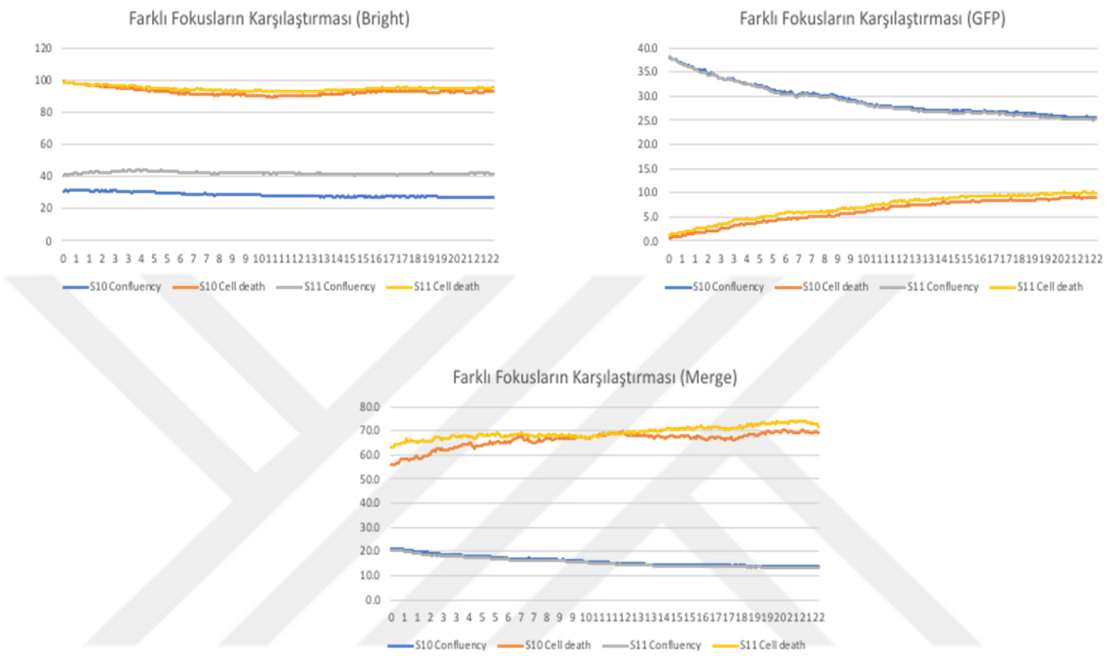


Şekil 40: 25122020 deneyi, 3B, sahne 11 fotoğrafları.



Şekil 41: 25122020 sahne 11 - 3B grafikleri.

Aşağıdaki resimde, yukarıdaki örneklere ait grafikler birlikte verildiğinde özellikle GFP kanalında dataların birbiriyle tamamen uyuştuğu görülmektedir.



Şekil 42: 25122020 sahne 10 ve 11 - 3B grafikleri.

Bu deney düzeneğinin yapay zeka ile analizi sonrasında Bright ve Merge kanallarında, odak dışında kaldıkları için bulanık olarak gözlenen hücrelerin GFP kanalında analizi sonucunda aynı X ve Y koordinatlarında ve farklı Z lokasyonunda bulunan hücrelerin, mikroskobun odağında olmasa bile neredeyse tamamen aynı sonucun verdiği gözlemlendi (Şekil 38 - 42).

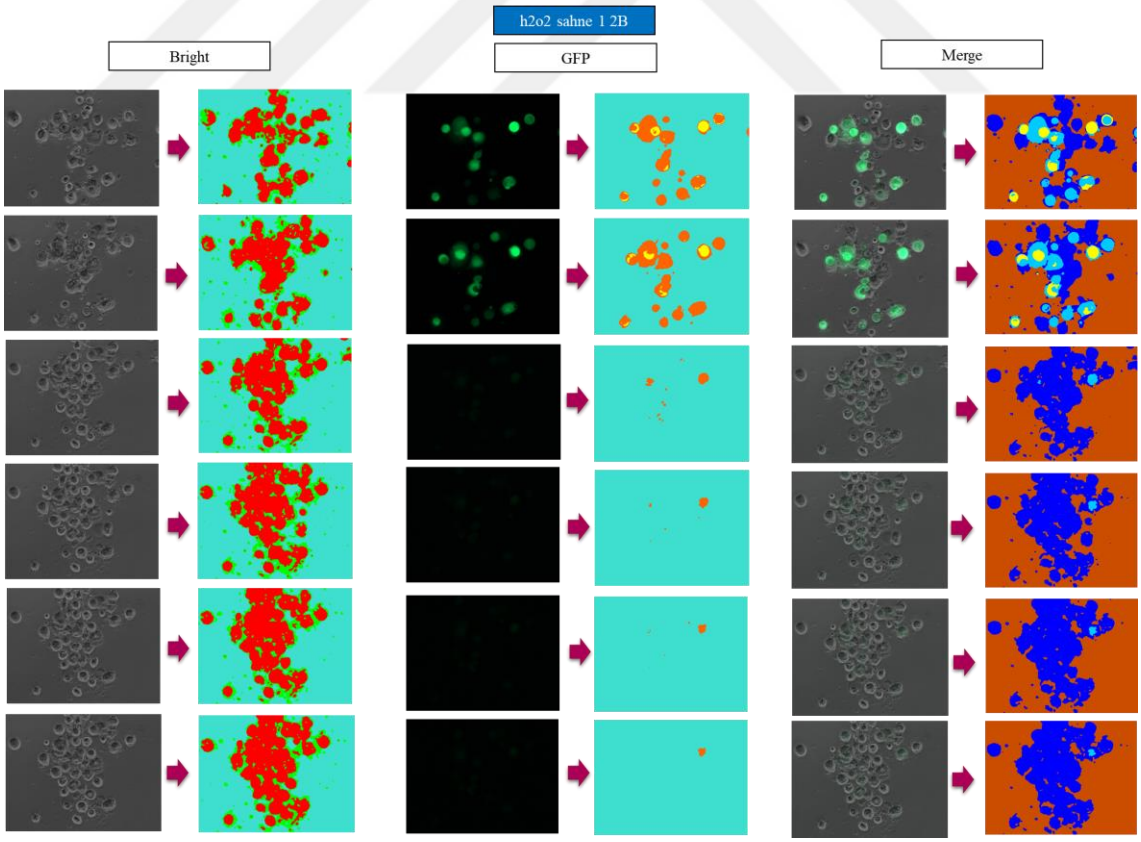
Bu veriler GFP kanalının, farklı odaklardaki hücrelerin aynı anda aynı sonucu verecek şekilde ölçülebildiğini ortaya koymaktadır.

3.2.3. Hücre Ölümü Analizleri

3.2.3.1. H_2O_2 numaralı deney

Hidrojen peroksit (H_2O_2) hücre kültüründe kontrollü apoptoz elde etmek için yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir (Saito vd., 2006). Bu deney düzeneğinde, kuyucukların yarısına 4. saatin (48. kare x 5 dk) sonuda H_2O_2 eklenerek apoptoza gitmeleri teşvik edilirken diğer yarısına uygulama yapılmadı.

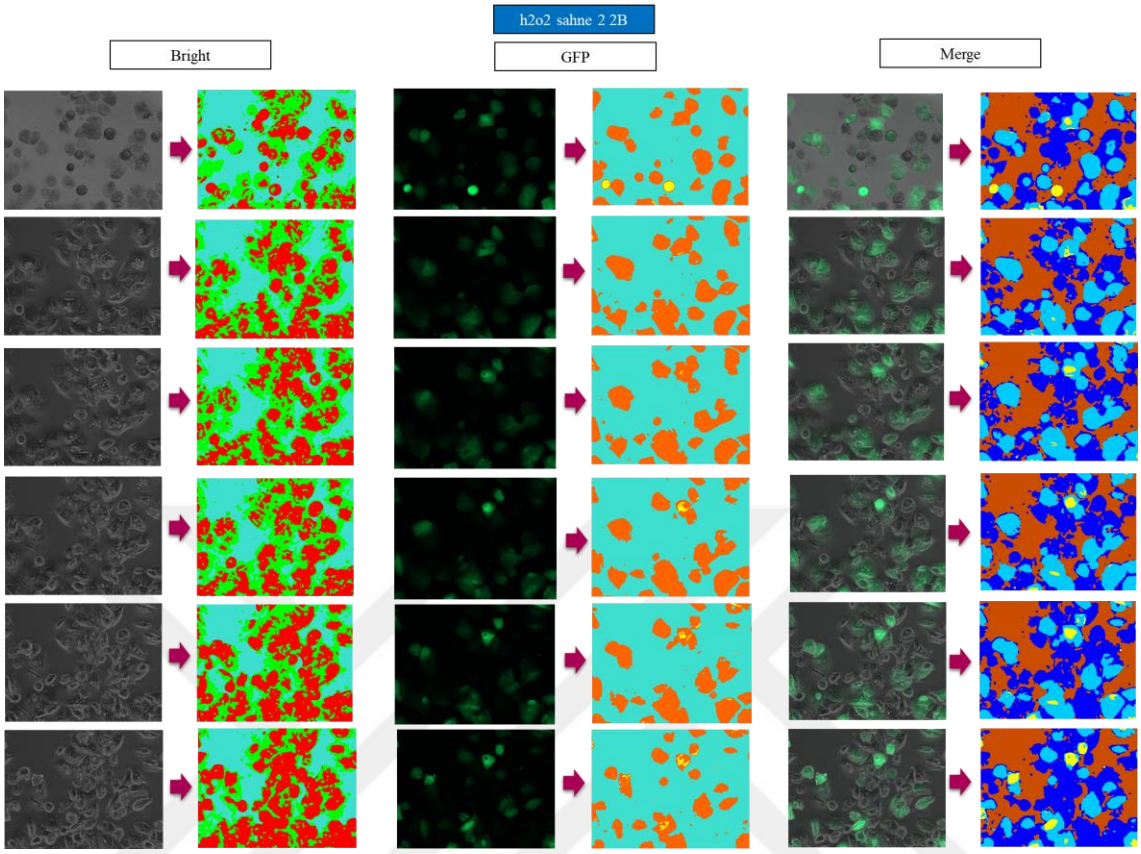
Videolarda, hidrojen peroksit kullanılan gruplarda, ilaç öncesinde hücrenin hareketli olduğu ve ilaç sonrasında hücre hareketinin azaldığı veya durduğu gözlendi. Hidrojen peroksit (H_2O_2) verildikten sonra hücrenin GFP ışımasını da kaybettiği görüldü. Bright kanalında yapılan yapay zeka analizlerinde bir farklılık görülmezken GFP ve merge kanallarında GFP ışımasının kaybıyla birlikte hücre ölümleri tespit edilebildi (Şekil 43 - 46).



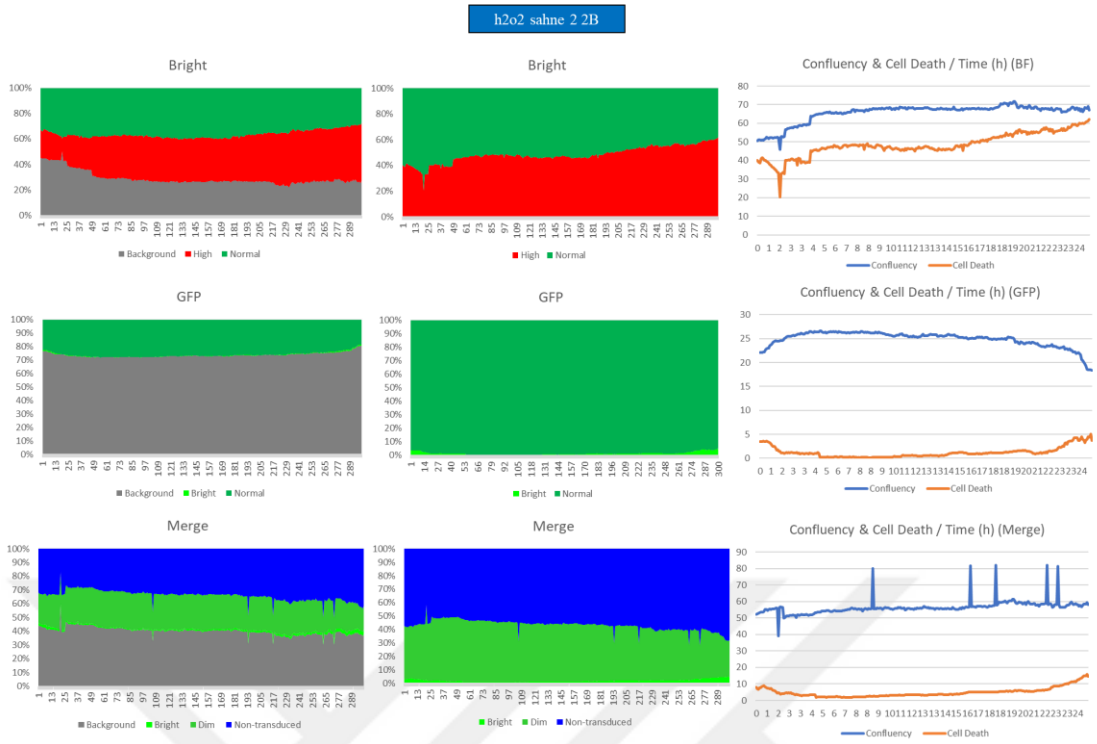
Şekil 43: H_2O_2 deneyi, 2B, sahne 1 (H2O2 uygulanan grup) fotoğrafları.



Şekil 44: H_2O_2 sahne 1 - 2B (H2O2 uygulanan grup) grafikleri.



Şekil 45: H_2O_2 deneyi, 2B, sahne 2 (H2O2 uygulanmayan kontrol grubu) fotoğrafları.



Şekil 46: H_2O_2 sahne 2 - 2B (H2O2 uygulanmayan kontrol grubu) grafikleri.

Bu verilerde H_2O_2 uygulanan gruplarda GFP sinyalinin ve hücre canlılığının uygulamadan sonra hızlıca ortadan kalktığı sayısal olarak da gözlenebilmektedir.

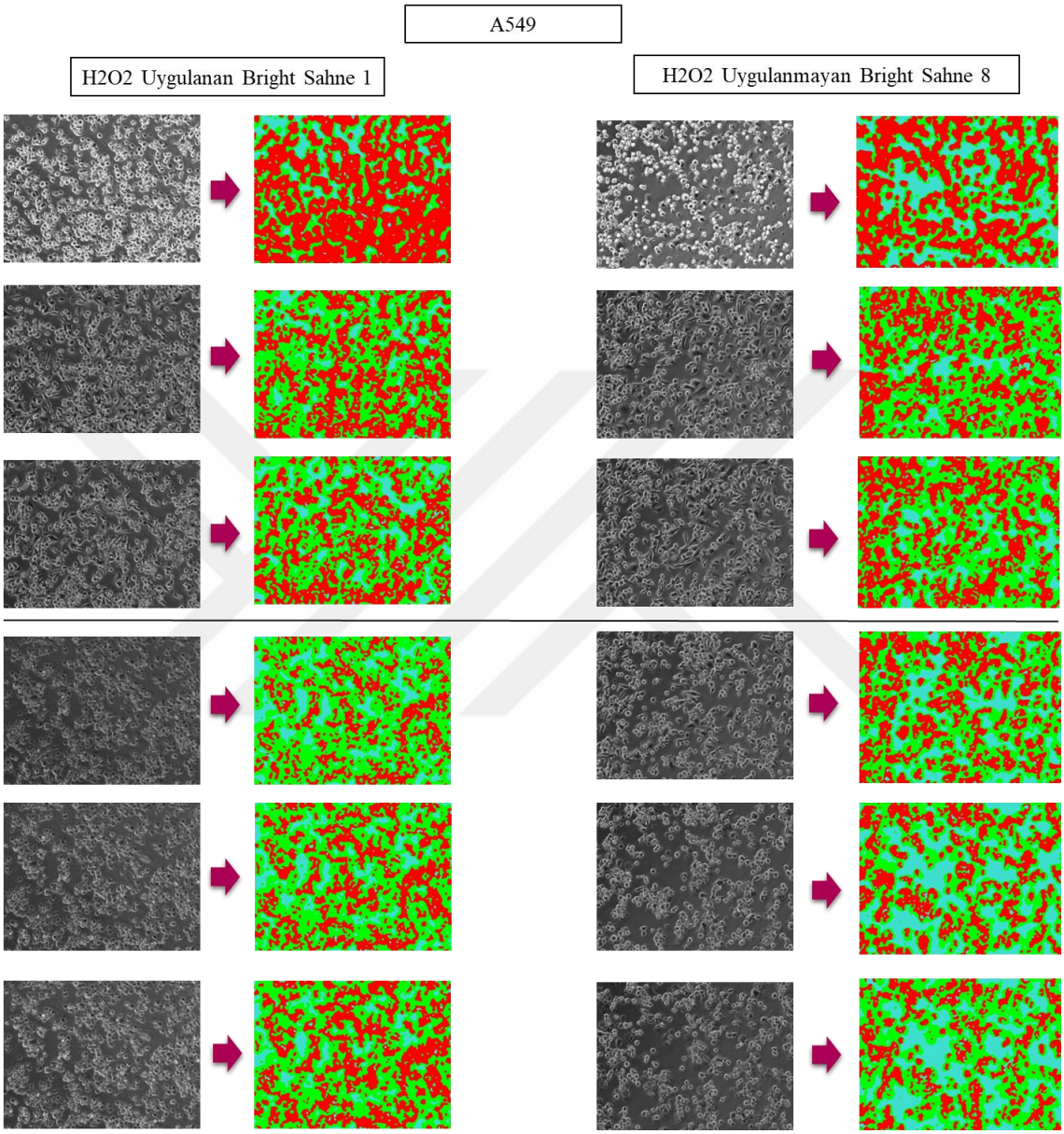
Hücre canlılığını kaybı ileriki bölümde yer alan sismograf datalarında da ayrıca saptandı.

3.2.3.2. A549 numaralı deney

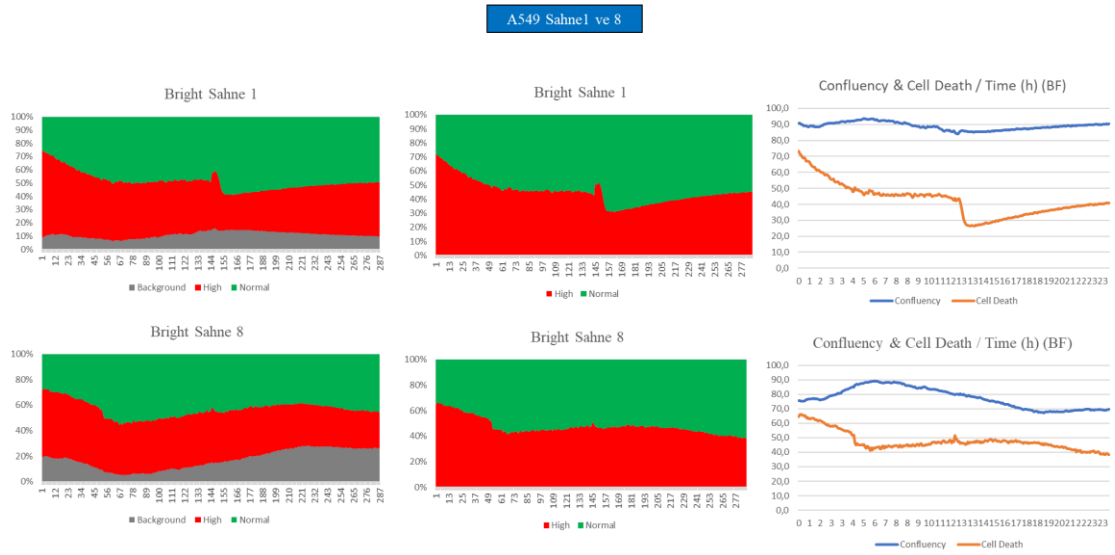
A549 hücre hattı akciğer adenokarsinoma hücre hattı olup, epitelyal morfolojide hızlı çoğalan hücrelerdir. Çalışmamız her ne kadar GFP geni aktarılmış kök hücreler üzerine olsa da yöntemin farklı hücrelerde de uygulanabilirliğini test etmek amacıyla bu hücre hattı da deneylerde kullanıldı. Ancak bu hücrelerde GFP transdüksiyonu gerçekleştirilmediği için yalnızca Bright kanalı ile analizler gerçekleştirildi.

Bu deney düzeneğinde hücreler ekimden sonra 30 dk inkübatörde tutulduktan sonra mikroskobik analize alındı. 24 saat kültüre edilen örneklerdeki deney gruplarına 12. saatin sonunda (144. kare) %2 oranında (0,5 M) hidrojen peroksit eklendi. Kontrol grubuna ekleme yapılmadı. Hidreojen peroksit eklendikten sonra hücrelerin hızla ölüme

gittiği görüldü. Sismograf analizlerinde de hidrojen peroksit grubunda ilaç öncesi hücre hareketi daha yüksek görülürken ilaç sonrası hücre hareketinin azaldığı gözlendi (Şekil 47 ve 48).



Şekil 47: A549 deneyi, 2B, sahne 1 ve 8 fotoğrafları. Sahne 1 H_2O_2 uygulanan, sahne 8 kontrol gruplarından seçilmiş birer örnektir.



Şekil 48: A549 sahne 1 ve 8 – 2B grafikleri. Sahne 1 H_2O_2 uygulanan, sahne 8 kontrol gruplarından seçilmiş birer örnektir.

Örneklerin videoları incelendiğinde deney grubunda H_2O_2 uygulamasının hemen ardından hücrelerin ölmeye başladığı ve 50-60 dk içerisinde neredeyse tamamının hareketlerini durdurduğu izlenmiştir. Bu durum Şekil 47'da hücrelerin parlak yüzeylerinin azalması şeklinde ortaya çıkarken grafiklerde (Şekil 48) de hücre canlılığında keskin bir düşüş olarak yansımıştır. Ancak videolarda görünür ışık kanalında halen canlı hücre görünüyor olmasına rağmen, videolar ve sismografta hücre hareketinin/canlılığının minimuma indiği gözlenmektedir.

3.2.4. Hücre Hareketi (Sismograf) Analizleri

Canlı hücreler kültür kabının yüzeyinde sürekli hareket halinde olan hücrelerdir. Bu hareket insanlar tarafından yapılan incelemelerde saptanamayacak kadar yavaş ilerlemesine rağmen time-lapse görüntüleme ile kolayca farkedilebilmektedir. Çalışmamızda, iki kare arasındaki ışıma farkını hesaplayarak hücrelerin bir kareden diğerine ne ölçüde hareket edilebildiğini gördüğümüz bir analiz yöntemi geliştirdik. Bu analiz yöntemi, hareketli, dolayısıyla canlı hücreler ile, hareket etmeyi bırakmış,

dolayısıyla ölmüş hücrelerin ayırt edilmesini ve hücre ölümünün kültürde hangi dakikalarda ortay açıktığının saptanmasını sağlamaktadır.

Aşağıdaki grafikler, yukarıda yapılan deneylerin bazılarına uygulanmış sismograf formulizasyonunu göstermek için seçilen örneklerdir. Örneklerde ölen hücre gruplarının, tıpkı bir kalp atışının EKG'de düz çizgi vermesi gibi, hareket grafiğinde düz çizgi verdiği görülebilmektedir.

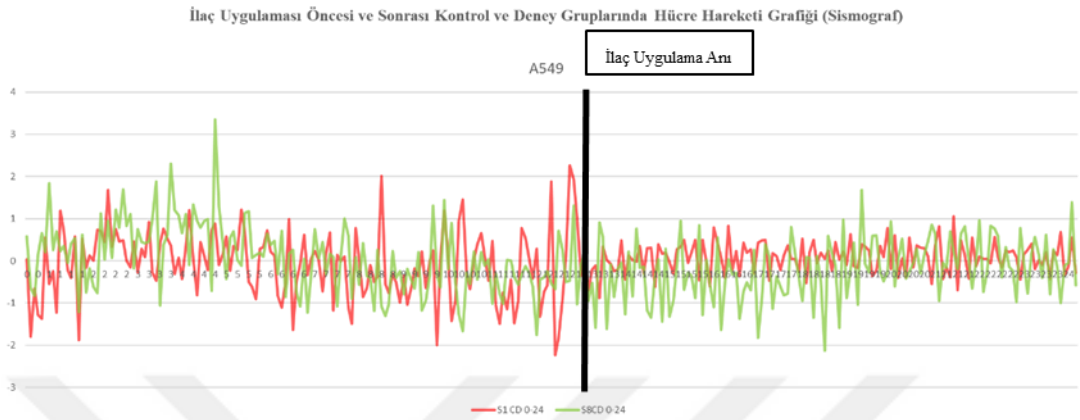
GFP-MKH hücrelerinin kullanıldığı örnekte 4. saatte ilaç uygulanan grupta (kırmızı), uygulamanın ardından, özellikle GFP datasında hücre hareketinde ciddi düşüş yaşandığı gözlenmektedir. Kontrol grubunda ise (yeşil) 4. saat öncesi ve sonrasında bir değişim görülmemektedir. GFP analizinde sonuçlar daha net olmakla birlikte bright ve merge sonuçlarında kontrol grubunda da hücre ölümü öncesi ve sonrası hareketlilik değişimi görülmektedir.



Şekil 49: H_2O_2 sahne 1 ve 2 - 2B – GFP-MKH Sismograf grafikleri.

Aşağıdaki, kanser hücrelerinin kullanıldığı örnekte 12. saatte ilaç uygulanan grupta (kırmızı), uygulamanın ardından, hücre hareketinde ciddi düşüş yaşandığı

gözlenmektedir. Kontrol grubunda ise (yeşil) 12. Saat öncesi ve sonrasında bir değişim görülmemektedir.



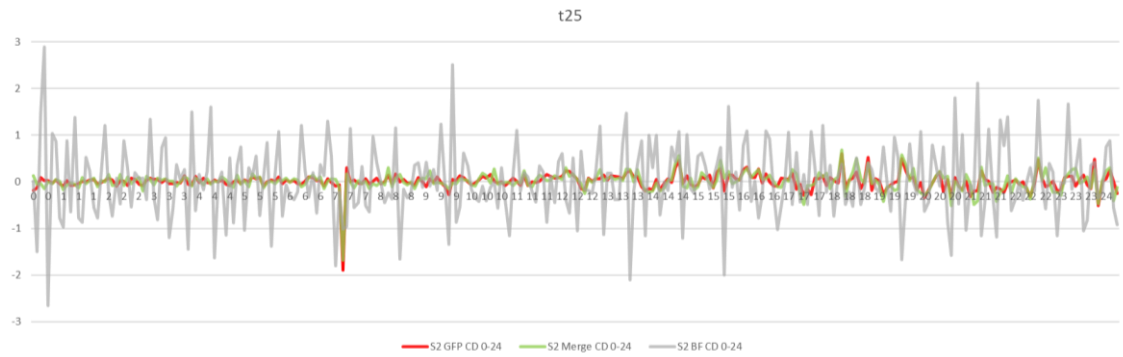
Şekil 50: A549 sahne 1 ve 8 - 2B Sismograf. Mavi çizgi ilacın uygulandığı zamanı göstermektedir. Uygulamanın ardından deney grubunda (kırmızı) hücre hareketi azalmıştır.

Tablo 3: A549 ilaç öncesi ve sonrası grafiğin ortalama datası.

	İlaç Uygulaması Öncesi (İlk 12 saat)	İlaç Uygulaması Sonrası (Son 12 saat)
Deney Grubu	0,012985374	0,013839365
Kontrol Grubu	-0,003140118	0,000668969

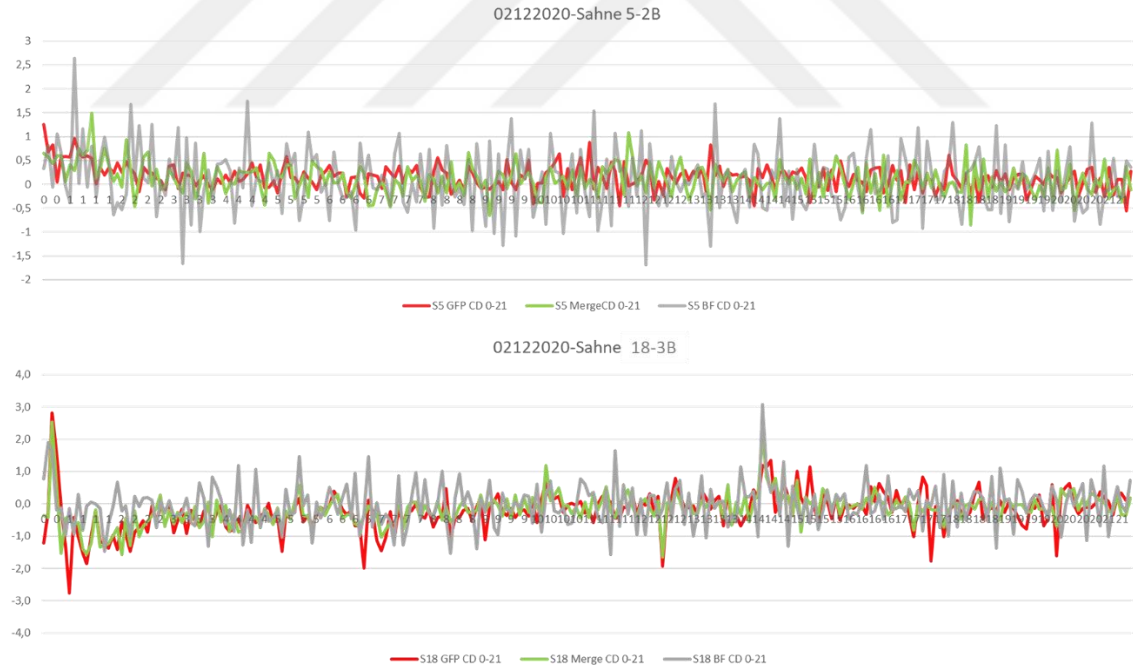
* $p<0,01$

Aşağıdaki örnekte ise t25 objektifle görüntülenen ve herhangi bir ilaç uygulanmayan hücrelere ait hücre hareket grafiği yer almaktadır. Time-lapse görüntülerde hücrelerin 24 saat boyunca canlı kaldığı ve hareket ettiği izlendi. Grafiklere bu hareketlerin de doğru şekilde yansıdığı görüldü.



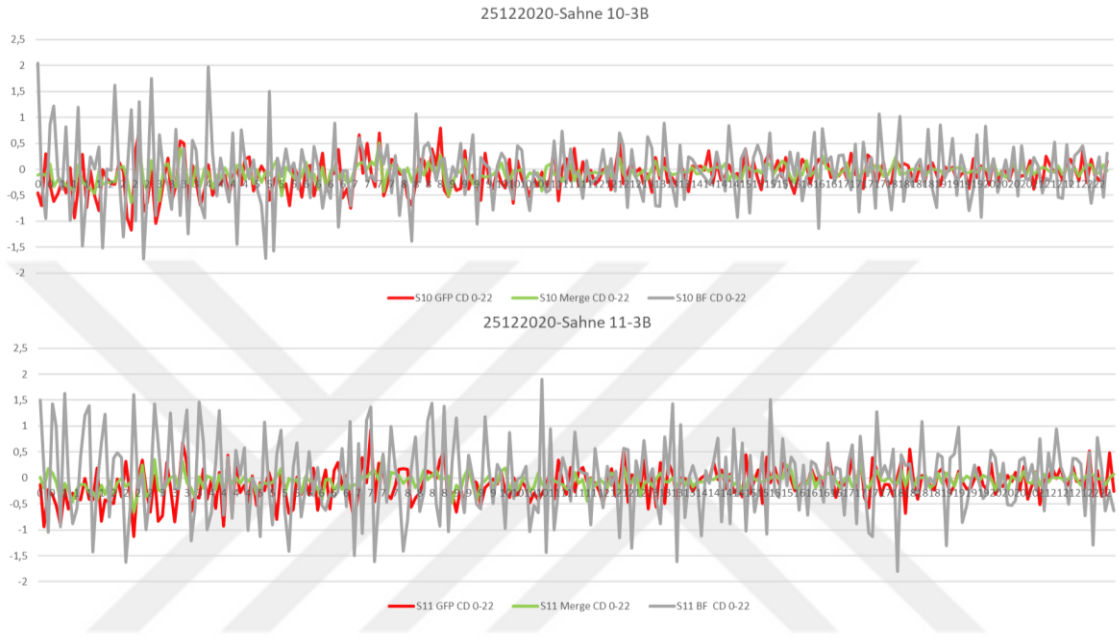
Şekil 51: t25 sahne 2 - 2B sismograf (GFP, Merge ve BF).

2B ve 3B kültüre edilmiş örneklerin karşılaştırıldığı aşağıdaki grafikte, hücrelerin her iki kültür tipinde de zamana bağlı olarak analiz edilebildiği görülmüştür. 2B kültürde hücrelerin kabın yüzeyine tutunmaya başlamaları ile birlikte hareketliliklerine azalma olduğu da görülmektedir. Benzer durum, sferoid oluşturan 3B kültürdeki hücrelerde de gözlenmiştir.



Şekil 52: 02122020 sahne 5 ve 18 - 2B/3B sismograf (GFP, Merge ve BF).

Farklı fokusların karşılaştırıldığı aşağıdaki grafikte (Şekil 53), hücrelerin toplam ışıması birbiri ile oldukça benzer grafikleri veririken (Şekil 39,41,42), hücre hareketlerinde farklı grafikler elde edildiği görülmektedir. Bu durum odak düzlemi dışında olsalar bile hücrelerin hareketlerinin takip edilebildiğini göstermektedir.



Şekil 53: 25122020 sahne 10 ve11 - 3B sismograf (GFP, Merge ve BF).

4. TARTIŞMA

Çalışmamız, 2B konvansiyonel hücre kültürü ile 3B kültür örneklerde, zamana bağlı (4 boyutlu) değişim analizleri için, yapay zeka ve makine öğrenmesi temelli yöntemler geliştirilmesi üzerinedir.

4.1.1. 2B ve 3B Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarının başlangıcından günümüze dek kullanılan 2B hücre kültürü, uygun maliyetli ve artık standardize edilmiş bir analiz yöntemi sunarken, normal vücuttaki 3B ortamın aksine hücreleri düz bir yüzeye yapışmaya zorlaması ve hücre morfolojisini değiştirmesi nedeniyle, doğal vücut içi ortamı taklit etmekte ve hücrelerin hücre dışı mikroçevreleri ile olan dinamik etkileşimlerini anlamak için yetersiz kalmaktadır (Knight ve Przyborski, 2015; Meyer vd., 2009; Souza vd., 2018). Diğer yandan 3B hücre kültür yöntemleri, hücreleri 3B bir matriks içerisinde süspanse halde tuttuğu için hücrelerin doğal şekillerini almalarını ve fonksiyonlarını daha doğru şekilde yerine getirmelerini sağlamaktadır. 3B ortamın, hücre yapışma, göç ve sinyalleme mekanizmalarında farklılıklar ortaya çıkardığı gözlemlenmiştir (Yamada vd., 2019). Dolayısıyla, 3B kültüre edilen hücreler ile gerçekleştirilen analizler daha doğru sonuçlar vermektedir (Bolhaqueiro vd., 2018; J. Lee vd., 2020; Richards vd., 2018; Tokunaga vd., 2014).

3B kültür için kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Sferoid/organoid çalışmaları, mikrotaşıyıcılar, mikrokapsülleme, mikroakışkanlar ve 3B biyobaskı (3D Bioprinting), sık kullanılan 3B kültür yöntemleridir (Irvine ve Venkatraman, 2016; Vijayavenkataraman vd., 2018; Zhuang vd., 2018). 3B biyobaskı, hücresel büyümesi ve olgunlaşması için dokuya özgü mikroçevre desteği sağlayan uygun bir biyobağlantı kurmaktır (Ashammakhi vd., 2019).

4.1.2. 3B Biyobaskı

3B Biyoyazıcılar, insan doku oluşumu ve onarımı için doku ve organ rejenerasyonunu çalışmalarında bir mühendislik teknolojisi olarak büyük önem taşımaktadır. 3B biyobaskı, biyomürekkep (bioink) olarak adlandırılan hidrojel yapıda malzemeler içerisine yüklenmiş hücrelerin, 3B biyoyazıcılar aracılığıyla katman

katman yerleştirmesini içeren bir tekniktir (Kang vd., 2016). Biyoink optimizasyonu, hücre yüklü 3B biyobaskının ana zorluklardan biri olarak kabul edilir.

Biyoinklerin basılabilirlik ve mekanik açıdan en çok farklılık gösteren özellikleri arasında sertlik, viskozite, şişme ve bozulma yer almaktadır (Cheng vd., 2019; T. Jiang vd., 2018). Baskı için uygun viskoziteye sahip olması, baskı sırasında ve baskıdan sonra içerisindeki hücrelerin canlılığını ve istenilen 3B modelin şeklini koruyabilmesi biyomürekkeplerin sahip olması gereken en temel fonksiyonlarındandır. Bu nedenle kullanılan polimerlerin oranı, basınç, sıcaklık gibi değişkenler üzerinde çok sayıda optimizasyon çalışması yapılması gerekmektedir (Mandrycky vd., 2016). ECM'nin dinamikleri, çok bileşenli bioink tasarımının önemli bir yönüdür. pH, ışık, manyetik ve elektrik alanı gibi uyaranlara tepki olarak hidrojellerdeki tersinir değişiklikler ve sıcaklık, hücre yayılımı, matris mekaniği ve biyokimyasal ligand sunumu için gerekli olan dinamik özellikleri yeniden özetlemek için kullanılabilir (Ashammakhi vd., 2019).

3B kültür yöntemlerinden bir diğeri de sferoid üretimidir. Birçok hücre tipi birbirine tutunma yeteneğine sahiptir. Sferoidler hücrelerin bu özelliklerini kullanarak elde edilen küresel hücre kümeleridir. Sferoidler de *in vivo* ortamı daha iyi taklit ettikleri için, ilaç ve nanopartiküllerin test edilmesinde ve hastalıkların modellenmesinde kullanılabilmektedir (Białkowska vd., 2020).

Yukarıda belirtilen avantajlarına rağmen, 3B kültürlerin kullanılmasında 2B kültürlere göre, maliyet ve kullanılabilecek analizlerin sınırlı olması gibi güçlükler bulunmaktadır. Maliyet kısmı, bu tip kültürlerde hidrojel yapısını oluşturacak biyouyumlu polimerik malzemelerin kullanımını gerektirmesinden kaynaklanmaktadır. Analiz güçlüğü ise, 2 boyutta, kültür kabının yüzeyinde, mikroskop yardımıyla kolayca görüntülenebilen hücrelerin 3B kültürde hidrojellerin yarattığı netlik kaybından dolayı görüntülenmesinde yaşanan sıkıntılar, hücrelerin jel içerisinden izole edilmesinde karşılaşılan güçlükler, genetik analizler için jelden RNA/DNA izolasyonunun zorluğu gibi sıkıntılardan kaynaklanmaktadır. 3B kültürlerin standart hale gelmesi ve gelecekte tüm bilim insanlarınca ilaç geliştirme, hastalık modelleme gibi durumların daha doğru şekilde gerçekleştirilebilmesi için bu problemlerin çözülmesi ve standardizasyonun sağlanması gerekmektedir. Bu süreçteki aşamalardan biri olan mikroskobik analizlerde

yaşanan güçlüklerin giderilmesi, çalışmamızın temel hedeflerinden birini oluşturmaktadır.

4.1.3. 4B Hücre Kültürü

3B kültürdeki hücreleri etkileyen faktörlerden sıcaklık, elektrik ve manyetik alan ve nem gibi değişiklikleri analiz etmede zaman faktörü de oldukça önemlidir (Ashammakhi vd., 2019). Fizikte 4. boyut olarak kabul edilen zaman boyutunun eklenmesi, hücresel analizlerin, belli bir zaman aralığı boyunca yapılıyor olması anlamına gelmektedir (Bissell, 2017).

Birçok hücresel biyolojik çalışma, mikroskobik görüntüleme ile büyük hücre popülasyonlarının analizine dayanmaktadır. Yüksek hassasiyet ve özgüllük ile canlı hücre deneyleri yapmalarına izin verdiği için, bu tür çalışmalar için floresan mikroskobu sıklıkla kullanılmaktadır. Canlı hücrelerin zaman atlamalı çalışmaları, büyüme kontrolü, proliferasyon, adezyon, hücre göçünü, hücre döngüsünü incelemeyi amaçlamıştır (Dzyubachyk vd., 2010). Hücrelerin farklı pasaj numaralarında migrasyon, çoğalma gibi davranışlarını izlemek için in vitro çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan biri de son yıllarda mezenkimal kök hücrelerin 3B kültürde floresan mikroskop kullanılarak video çekimi ile gerçekleştirilmeye başlanmıştır (C. F. Jiang vd., 2020).

4.1.4. Görüntüleme Sistemi

Floresan etiketleme yöntemleri, floresan proteinleri kullanarak genetik etiketlemeyi ve türleri antikorlarla hedefleyerek kimyasal etiketlemeyi içerir. Yayılan ışığın farklı dalga boylarını yeterince filtreleyerek, etiketli özellikler görüntülenebilir ve tanımlanabilir (Mannam vd., 2020). Hücrelerde florasan görüntüler, DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole), hücrede spesifik DNA ve RNA seviyesi ekspresyonunu lokalize eden floresan in sitü hibridizasyon (FISH) probları ve GFP kullanılarak da elde edilebilir (Nketia vd., 2017).

Floresan mikroskobu görüntülerine dayanan canlı hücrelerin doğru otomatik kantitatif analizi, deneysel sonuçların ve hücre kültürü protokollerinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesi için çok yararlı olabilir. Yapılan bir çalışmada apoptoz ile ilgili morfolojik değişiklikleri, yani bir hücrenin sınırının eğriliğini ve uzunluğunu

hesaplamanın mümkün olduğu sınır boyunca, segmentli hücresel bölgelerin olasılıksal bir tanımını sağladığı gösterilmiştir (Du vd., 2016).

Hücre popülasyonlarının bir bütün olarak analizi, ortalama hücre özellikleri ve gelişimi hakkında bilgi sağlamaktadır. Tek tek hücreler üzerinde analiz yapma yeteneği, bilgiyi hassaslaştırır ve hücrenin işlevselliğinin daha iyi anlaşılmasına yol açabilecek nadir olayların tespit edilmesini de sağlar. Her bir hücrenin tanımlanması ve sınırlarının kesin olarak tanımlanması eşit öneme sahiptir. Analiz edilen görüntü verilerinin boyutunun artmasıyla bu tanımlamaların karmaşıklığı artmaktadır. Bu tür verilerin manuel olarak işlenmesi öznel ve hataya eğilimli olmasının yanı sıra çok zaman alıcıdır. Bu durum, bilgisayar yazılımları için güçlü bir istek yaratmaktadır (Dzyubachyk 2010).

Yukarıda da bahsedildiği gibi, hücre yapısı ve morfolojik davranışlarının anlaşılması, biyolojik araştırmalarda önemli ancak bir o kadar da analizi zor, pahalı ve zaman gerektiren bir alandır. Bu zorlukların üstesinden gelmek için, son yıllarda, hücre bilimlerinde farklı disiplinleri ve teknoloji dallarını bir araya getiren çeşitli hesaplamalı nesne izleme yöntemleri geliştirilmiştir (Emami vd., 2021).

4.1.5. Yapay Zeka

Yapay zeka teknolojisi, alanında uzman ya da uzman olmayan araştırmacılara mikroskobik analizin zorluklarının giderilmesini sağlayan potansiyele sahiptir (von Chamier vd., 2019). Yapay zekanın avantajı, ilgili görüntü özelliklerine spesifik öğrenme kapasitesidir. Sınıflandırma bu nedenle özellikle büyük eğitim gruplarını uzman düzeyinde yüksek verim ile tanımayı daha mümkün hale gelmiştir (von Chamier vd., 2019). Yapay zeka, geniş uygulamaları nedeniyle son zamanlarda önemli hale gelmiştir. Örnekler arasında tıbbi teşhis, yüz yanıma, robotik, internet uygulamaları, veri madenciliği, endüstriyel uygulamalar sayılabilir (Górriz vd., 2020). Sayısallaştırılmış veri toplama, makine öğrenimi altyapısındaki son ilerlemelerle büyük dataların analizi mümkün hale gelmiştir. Ayrıca MRI, Bilgisayarlı tomografi (BT), Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve ultrasonda çeşitli lezyonların ve anatomik yapıların radyolojik olarak tanımlanması uygulamlarında, makine öğrenmesi modelleri denenmiştir (Senders vd., 2018).

Mikroskobik görüntülerin içeriklerine göre farklı sınıflara ayrıldığı segmentasyon sürecinin arkasındaki ana fikir, hücrelerin sınırını tespit etmek ve hücreleri arka plandan ayırmaktır. Piksel değerlerindeki belirsizlikten kaynaklanan küçük ölçüm hataları, segmentasyon prosedürlerinin sonuçlarında önemli değişikliklere neden olabilir. Görüntü segmentasyon algoritmalarının sağlamlığını artırmak amacıyla, görüntülerin kantitatif analizi için belirsizlik ölçümü önerilmiştir (Chan ve Shen, 2005) (Du vd., 2016).

Yapay zeka algoritmaları, geleneksel algoritmalardan farklı olarak, sinir ağları tarafından gerçekleştirilen işlevleri kullanmaktadır. Sinir ağları; katmanlar halinde düzenlenmiş bağlı nöronların karmaşık ağlarıdır. Sinir ağı üzerinde çalışmaların öngörülmesi 1950'lerde başlasa da 2000'li yıllarda gelişmiş, 2010'lu yılların başında da derin öğrenme algoritmalarının geliştirilemesiyle önemli bir ilerleme kaydetmiştir (von Chamier vd., 2019). Son zamanlarda, derin öğrenme, bilgisayar görüşünde önde gelen bir makine öğrenme aracı olarak ortaya çıkmakta ve biyomedikal görüntü analizinde giderek daha önemli yer tutmaktadır. Derin öğrenmeyi kullanan mikroskop görüntü analizlerinin biyolojik araştırmaların zorluklarının aşılmasında yüksek potansiyeli bulunmaktadır (Xing vd., 2017).

Mikroskobik görüntülerin analizinde kullanmak üzere geliştirilen Phyton gibi programlama dillerini kullanan çeşitli yazılımlar bulunmaktadır. Hücre/spheroid takibi çalışmalarının sonucunda analizler manuel olarak ya da Matlab ile yapılmaktadır. Manual olarak girilen formüllerle analizler yapılmaya çalışılmakta fakat bu işlem için hem özel çaba hem zaman harcamak gerekmektedir (König vd., 2020; Richards vd., 2018). Otomatik görüntü işleme araçlarına olan artan talep nedeniyle de açık kaynak kodlu bir yazılım olan ImageJ geliştirilmiştir (Carpenter vd., 2006; Du vd., 2016). Yine ALEXNET ve ImageNet gibi yazılımlar çoğu deneyde hücre sınıflandırılması amacıyla kullanılan sinir ağları içeren yazılımlarıdır (von Chamier vd., 2019). ImageJ ile analiz yapılan bir çalışmada *in vitro* tümör örneklerinde anti kanser ilaç denemesi yapılmıştır. 3B kültürde sferoid yapılar inverted mikroskopta incelenmiş, hücre canlılığı testi olan Alamar blue ile yapılmış ve analiz için formüller geliştirilmiştir. (Ferreira vd., 2018).

Zeiss firmasının mikroskoplarına entegre çalışan Zen yazılımına eklenebilen bir modül olan Intellesis yazılımı da mikroskobik görüntülerin işlenebilmesi için geliştirilmiş, piksel sınıflandırması ve derin öğrenme gibi Python tarafından desteklenen

yerleşik makine öğrenme teknikleri kullanan bir yazılımdır. Intellesis, kolayca eğitilebilen, tekrarlanabilir segmentasyon sonuçları oluşturma olanağı sunmaktadır. Yazılım bir kez eğitildikten sonra yüzlerce görüntüyü otomatik olarak segmentlere ayırabilmektedir. Böylece hızlı ve doğru analizler yapılarak sayısal datalar elde edilebilir (Manser vd., 2018).

Çalışmamızda yapay zeka kullanımına itici unsur olan bir diğer nokta, hücresel analizlerde, özelikle time-lapse görüntülerde elde edilen çok sayıda fotoğrafın analiz edilmesi olmuştur. Hücrelerin 3B ortamda kültüre alındıktan sonraki süreçte gerçekleşen değişimlerin görüntülenmesi, hem 3B kültürlerin standardizasyonu için önemli bir adım olmuş, hem de hücrelerin vücut içini taklit eden ortamda nasıl davrandıklarına dair fikir vermiştir.

Bu doğrultuda, daha önce 2209 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirdiğimiz, şu anda yayın aşamasında olan yara iyileşme (scratch assay) modelinde kullanıdığımız ve mevcut yöntemlere göre üstünlüklerini gözlemlediğimiz yapay zeka destekli analiz yöntemini, 3B kültürlerdeki hücre davranışını görüntülemede kullandık.

Çalışmada elde edilen time-lapse görüntüler, Zeiss Axio.Observer.Z1 model floresan mikroskopta X, Y, Z pozisyonları ve uygun zaman komutları ayarlanarak elde edildi. Hücrelerin deneyler süresince canlı kalabilmeleri için mikroskoba monte edilmiş, CO_2 ve sıcaklık kontrolü olan inkübatör sistemi kullanıldı (Şekil 10). Hazırlanan çeşitli 2 ve 3 boyutlu örnekler mikroskop-inkübatör sistemine yerleştirilerek görüntüler alındı. Yapılan ön denemelerimizde 6-10 dk zaman aralıklı fotoğrafların gerçekleşen hücresel olayları yakalamakta yetersiz kaldığı, 4 dk ve daha düşük aralıklı fotoğrafların ise çok fazla data oluşmasına neden olduğu için 5 dk aralıklı çekimin en uygun olduğu sonucuna varıldı. Bu nedenle çalışmamızdaki tüm deneyler 5 dk zaman atlayarak elde edildi.

Florasan ve görünür ışık kaynakları ile elde edilen görüntüler, herhangi bir fotoğraf işleme işleminden geçirilmeden analiz yazılımına alındı. Elde edilen görüntülerin boyutları birkaç yüz MB ile 17 GB arasında değişmekte idi. Görüntüleri içeren dosya tipi ise mikroskobun çıktı formatı olan ve Intellessis programının da tanıdığı "czi" formatında elde edildi. Ancak bu format üzerinden normal resim ve video

görüntüleme programlarında da açılabilen “jpeg” ve “mp4” formatında fotoğraf ve videolar da izole edildi.

Analizleri gerçekleştirdiğimiz Intellessis yazılımında, mikroskoptan elde edilen czi. formatındaki fotoğrafları ve videolar izlenerek örneğin genelini temsil eden hücre ve bölgeleri içeren kareler belirlendi. Bu kareler kullanılarak yazılıma, analiz edilecek ‘parlak, soluk, arkaplan’ gibi alanlar taranarak eğitim verildi. Eğitim işleminin oldukça kolay olup, yazılımsal açıdan teknik bilgi gerektirmediği, dolayısıyla biyolojik bilimlerde çalışanların kullanımı için de uygun olduğu görüldü. Yazılım, içeriğindeki bilgisayar görüşü, makine öğrenmesi ve yapay zeka algoritmalarını kullanarak bu eğtimi tüm data setini kapsayacak şekilde analiz etti. Analiz (segmentasyon) süresi, kullanılan bilgisayarın işlem gücüne ve datanın büyüklüğüne bağlı olarak 6-24 saat arasında zaman aldı. Analizlerin tamamlanmasının ardından elde edilen segmente edilmiş örnekler, yine Zen yazılımının görüntü alanında renk ayırt eden analiz sistemi ile sayısal hale getirildi.

Deneyler sonrasında gerçekleştirilen bu işlemlerin özellikle segmentasyon aşamasının uzun sürmesinde, çok sayıda olan deney gruplarının analiz ediliyor olmasının yanı sıra, mevcut bilgisayarların işlemci gücünün de çok yeterli olmamasının sürecin uzun sürmesine neden olduğu görüldü. Ancak bu sürecin, araştırmacının sadece aktarım, eğitim ve sayısallaştırma kısımlarında kısa sürelerle görev aldığı, segmentasyon kısmında ise araştırmacının doğrudan takibini gerektirmediği göz önüne alınarak aktif çalışma süresi olarak değerlendirilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca yapılan analizler, YZ yerine manuel olarak yapılacak olsa araştırmacılar için yüzlerce kat daha fazla zaman harcanmasına neden olacağı için, gerçekte büyük bir avantaj olduğunu düşünüyoruz. Ek olarak, teknoloji ilerledikçe artacak bilgisayar işlem gücü ve laboratuvarlada bu tip işler için özelleşmiş analiz bilgisayarlarının bulunmasının gelecekte bu süreçlerin saatlere hatta dakikalara ineceği, geliştirilebilecek yeni yazılımlar ile birlikte, sürecin hücreler halen kültürde iken gerçek zamanlı gerçekleşebileceği, hatta geliştirilen algoritmalar sayesinde geleceğe yönelik hücre çoğalması/ölümü tahminleri yapabileceği de öngörülmüştür.

4.2. Deney Grupları

Çalışmamız, gelecekteki araştırmacılara yararlı olması açısından, mümkün olduğunca farklı deney düzenekleri üzerinden, çeşitli 3B kültür yöntemleri, farklı dalga

boylarında analizler ve YZ analizlerinin kullanılabileceği çeşitli senaryolar test edildi. Bu testler özetle şu şekildedir:

- 2B ve 3B kültür karşılaştırmaları
- Farklı fokus karşılaştırmaları
- Hücre ölümü analizleri
- Hücre hareketi analizleri

4.2.1. 2B ve 3B Kültür Karşılaştırmaları

Farklı 3B doku iskelelerinin denendiği ilk dizi analizde farklı materyallerin 3B biyobaskısı ve kültürü, sferoid oluşumu gibi durumlar test edildi. Bu deneylerde ayrıca görünür ışık, GFP ve her ikisinin birleştiği analiz senaryoları da ayrı ayrı test edildi.

Bunlar arasında yapılan, hücrelerin matriks/kültür kabı yüzeyine ekildiği 02122020, 25122020, 26102020, 28102020 ve t25 numaralı deneylerde hücreler jelin veya kültür kabının yüzeyine ekilirken kitosan ve GelMA deneylerinde 3B biyobaskı kullanıldı. Hücrelerin yüzeye ekildiği deneylerde hücrelerin tabana tutunma, yüzeyden kalkma ve sferoid oluşturma gibi özellikleri incelendi. Hücrelerin jelin içinde konumlandığı deneylerde ise hücre hareketi ve canlılığı takip edildi.

Hücrelerin 3B kültürlerde saptanabilmesi için çözünür GFP ile işaretlenen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çözünür GFP kullanılması ışık saçılması nedeniyle sferoid merkezindeki hücrelerin güvenli takibini kısıtlamıştır (Richards vd., 2018). Bütün bunlar göz önüne alındığında 3B hücre kültürü ve yapay zeka ile analizi üzerine kurduğumuz deney planında hücrelere dışarıdan boya uygulamak yerine genoma entegre olarak stabil GFP üretimi sağlayan viral vektörün aktarımı yöntemini kullandık. Ek bir boyama yapmaya gerek kalmadan hücre canlılığı, sayısı ve hareketi üzerinde çalışmayı planladık.

Çalışmamızda ayrıca hücre yoğunluğunun (konfluensi) hesaplanması üzerine formüller geliştirildi. Burada hücrelerin ışığı kırma ve yansıtma özellikleri ile florasan ışıma miktarlarından faydalanıldı. Bu verilerden, örneğin GFP ışıması miktarı, 2B ve 3B adherent kültürlerde hücre tutunması ve ölümü ile ilgili bilgi verdi. Ancak aynı işlemler homojen olarak ekilen ancak kültür sırasında bir araya gelerek sferoid oluşturan hücreler için uygulandığında, azalan konfluensi ve artan yüksek GFP ışıması hücrelerin ölümünü

değil sferoid oluşumunu gösterdi. Dolayısıyla her ne kadar kullanılan teknik aynı olacak olsa da, elde edilen verilerin yorumlanması deney planına göre değişmekteydi.

Görünür ışıkla yapılan, herhangi bir boyama yapılmamış hücre görüntülerinde genel olarak tüm inverted mikroskoplar faz-kontrast tekniği ile sadece gri tonlarda görüntü vermektedir. İnsan beyni hücrelerin sınırlarının ışığın geliş yönüne göre daha parlak veya daha koyu renkte görünebilmesinden yola çıkarak hücre sınırlarını belirleyebilmek, buna göre de konfluensi oranını belirleyebilmektedir. Ancak bu noktada incelemeyi yapan kişiler arasında subjektif farklar olabilmekte, farklı araştırmacılar farklı sonuçlara varabilmektedir. Bu noktada bilgisayar görüşü destekli sistemler kullanıcılar arası farkları ortadan kaldırma açısından önem kazanmaktadır (Yin vd., 2011). Bilgisayar görüşünün bu noktadaki sıkıntısı ise gri tonlardaki hücreleri yine gri tonlardaki arka plandan ayırt edebilmektedir. Bu durumun etkileri çalışmamıza da yansımıştır. Sitoplazması çok ince olan hücrelerin arkaplanla aynı renk olmalarından dolayı analizde tespit edilememeleri ve ışık yansımaları nedeniyle açık/koyu renkte görülebilen arka planın bazı durumlarda hücre olarak algılanabilmesi durumlarıdır.

Çalışmamızda GFP sinyali üzerinden gerçekleştirdiğimiz analizler, görünür ışık yerine florasan sinyalin avantajı olup olmadığının ve iki dalga boyunun birlikte kullanımının ekstra avantajı olup olmadığının belirlenmesini de hedefledik. Bu doğrultuda hücreler GFP geni taşıyan viral vektörlerle transdükte edildi, hücrelerin çoğunluğunda (>%70) GFP sinyali saptandıktan sonra hücreler 2B ve 3B analizlerde kullanıldı.

Analizlerimiz görünür ışıkta, hücrelerin renklerinin yakın olmasından dolayı arkaplandan ayırt edilemediği durumlarda GFP sinyali ile hücrelerin saptanabildiğini gösterdi. Yine kitosan kullanılan deneyde görüldüğü üzere (Şekil 34), görünür ışığı bloke eden polimerler ile 3B kültür yapılan durumlarda da GFP sinyalinin büyük avantajı olduğu saptanmıştır. Bu noktada GFP ile analiz yapılmasının en önemli dezavantajı, %30'un altında olan GFP negatif hücrelerin bu yöntemle saptanamamasıdır. Şekil 31'de bu durum gösterilmiş olup görünür ışıkta saptanan iki hücreden biri GFP kanalında ışıma vermediğinden saptanamadı. Çalışmamızda bu dezavantajın giderilmesi için her iki kanalın üst üste bindirildiği (merge) analizleri kullanıldı. Birleştirilmiş görüntülerde GFP kanalında saptanamayan hücreler de saptanmış olup toplam hücre miktarına ve konfluensi hesaplarına dahil edildi. Çalışmamızın gelecekte araştırmacıların

kullanılabileceği çıktılarından biri de bu sistem ile transdükte olan ve olmayan hücrelerin oranının da belirlenebilmesi oldu.

GFP ve görünür ışık ile yapılan analizlerimiz hücrelerin şekli konusunda da sayısal bilgi elde etmemize olanak sağladı. Florasan mikroskoplarda pozlama (exposure) süresi genellikle yüksek ışıma veren hücrelere göre otomatik olarak ayarlanmaktadır. Bu nedenle düşük ışıma veren örnekler soluk kalabilmektedir. Ancak time-lapse görüntü toplamada, yapılacak analizlerin anlamlı olabilmesi için ışığın eşit miktarda verilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızdaki tüm analizler bu nedenle sabit pozlama ile gerçekleştirildi. Pozlama miktarı, kültürün 2B veya 3B olmasına, jel kalınlığına, kullanılan kültür kabını tipine ve hücre çeşidine göre değişkenlik göstermekle birlikte, konfluent kültürdeki yüzeye tutunmuş yassı hücrelerin gerek görünür ışıkta, gerekse UV ışıkta görülebileceği şekilde ayarlandı. Bu ayarlamalar sayesinde, hücrelerden sabit uyarım (excitation) ile sabit ışıma (emission) elde edildi. Teorik olarak, hücre içerisinde sentezlenen GFP miktarı genel olarak sabit kabul edilirse, hücrelerin yassı veya yuvarlak şekilli olmasından bağımsız olarak aynı şiddette UV ışık altında aynı şiddette ışıması beklenmektedir. Ancak ışımanın kamerada toplanmasında objektife düştüğü açı önem kazanmaktadır. Yüzeye tutunmuş bir adherent hücredeki GFP proteinleri sitoplazmada geniş bir şekilde dağıldığından, birim alana düşen foton miktarı azalmaktadır. Bu hücreler analizlerimizde soluk renkli (normal/dim) hücreler olarak sınıflandırılmıştır. Diğer yandan henüz tutunmamış yuvarlak bir hücrede, toplam GFP miktarı aynı olsa bile, birim alana düşen foton miktarı artacağından, mikroskop bu bölgeleri yazılımı gereği beyaz renkte ifade etmektedir. Bu hücreler ise sınıflandırmamızda parlak hücreler olarak adlandırılmıştır. Dolayısıyla, bir hücrenin yaydığı foton miktarı aynı olsa bile, bu ışıma küçük bir alana sıkıştığında mikroskop bunun belli bir eşik değerinin üstünde kalan kısmını algılayamamakta ve beyaz olarak sınıflamaktadır. Bu durum, toplam GFP ışımasında yuvarlak hücrelerin daha az ışıma vermesi ile sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda bu nokta sonradan farkedildiği için analizlere dahil edilmedi. Ancak gelecekte yapılacak GFP analizlerinde hücreli alanlar; soluk yeşil, parlak yeşil ve beyaz ışık olarak üç farklı şekilde yapay zeka eğitimine tabi tutulup analiz edilirse daha verimli sonuçların elde edilebileceği sonucuna varıldı.

Bu ayarlamalar sonucunda ışıma miktarı belli bir seviyenin üzerine çıktığında, florasan görüntülerde üst üste bindirilmiş fotoğraflarda olduğu gibi rengin parlak yeşilden beyaza doğru kaydığı görüldü. Analizlerimizde bu yüksek parlaklık seviyesine sahip hücreler 'Bright' hücreler olarak adlandırılırken düşük ışıma veren hücreler 'normal' veya 'dim' olarak adlandırıldı. Bu sınıflandırma sayesinde, yeni ekilip yüzeye tutunmakta olan/tutunan, yüzeyden kalkan veya şekil olarak yuvarlak/yassı olan hücrelerin birbirinden ayırt edilmesi sağlandı.

Bu durum en bariz şekliyle tespit edebildiğimiz hücresel değişimlerden biri olan sferoid oluşumunda algılanabildi. Sferoid oluşturan hücreler başlangıçta tek tek bulunurken verdikleri GFP sinyali, hücreler bir araya gelip üst üste bindikleri durumlarda azalmaktadır. Örnek olarak 02122020 ve 25122020 numaralı deneylerde, hücrelerin sferoid oluşturduğu örneklerde başlangıçtaki GFP ışıma miktarı üzerinden hesaplanan konfluensi oranı yüksek iken, bu sırada parlak ışıma yapan hücrelerin toplam hücrelere oranı düşük kaldı. Ancak videolardaki görüntülerden (Şekil 24, 38, 40) anlaşılacağı üzere hücreler kültür sırasında bir araya gelip üst üste binerek birim alanda çok daha yüksek ışıma verdi. Bu da eşik değerin üzerinde kalan ışımanın algılanamamasına neden oldu. Bunu doğrulayacak şekilde 24 saatlik sürenin ardından örnekteki konfluensi miktarı azalırken ancak parlak hücrelerin oranı ise yükseldi. Bu bulgular kullanılarak elde edilen grafiklerde de konfluensi eğrisinin düşerken parlak hücreleri gösteren eğrinin yükseldiği görülmektedir. Diğer örneklerde hücreler öldüğünde gözlediğimiz konfluensi ile birlikte hem parlak hem soluk GFP miktarlarındaki azalma durumunun aksine, konfluensi azalırken parlak GFP hücre oranının artması, hücrelerin sferoid yaptıklarının sayısal göstergesi olarak kullanılabilir.

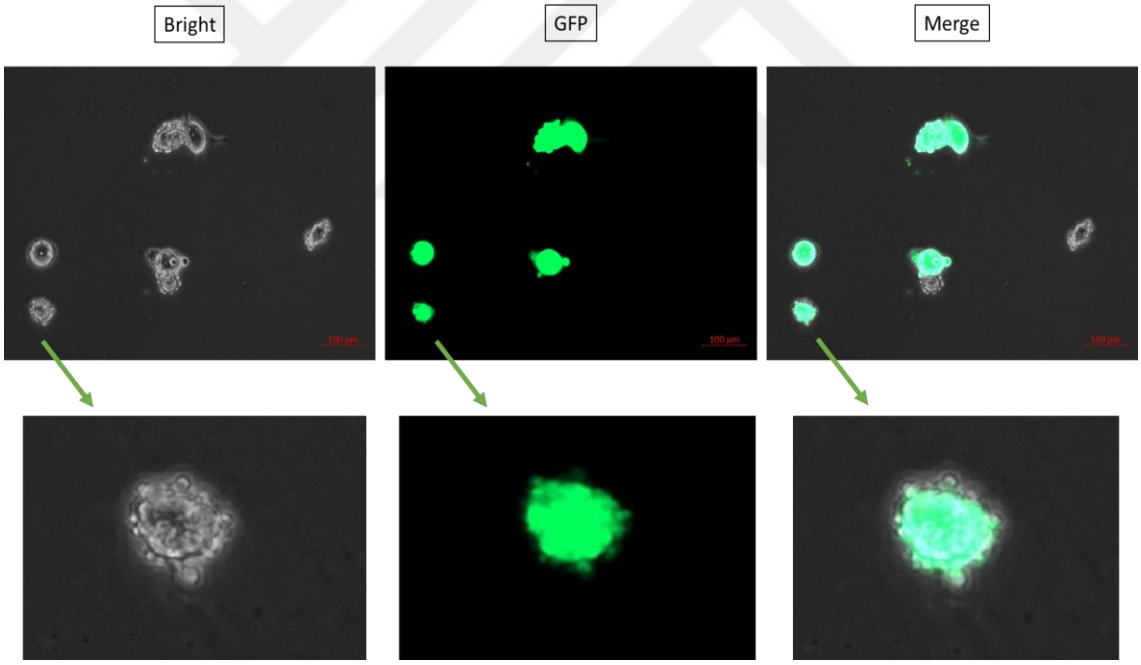
4.2.2. Farklı Fokus Karşılaştırmaları

3B kültürlerde hidrojeller ile çalışırken karşılaşılan bir durum da jelin su çekerek genişlemesidir. Bu durum deney başlangıcında odaklanılan hücrelerin odaktan çıkmasına neden olmaktadır. Bu durumun olası etkilerini incelemek amacıyla jelin içerisinde farklı düzlemlerde bulunan hücreler analiz edildi. Oluşturulan deney düzeneğinde aynı alanda ancak farklı derinliklerde konumlanmış büyük hücre kümeleri farklı sahnelerde, sadece Z ekseni değiştirilerek görüntülendi. Analizler karşılaştırıldığında (Şekil 42) kurduğumuz sistemin, hücreler farklı derinliklerde bile olsa, tüm alanı, tüm Z eksenini de dahil ederek analizini yaptığını ortaya koydu. Bu nedenle Z ekseni üzerinde farklı düzlemlere bile

odaklanılsa, ya da hücreler jelin şişmesi nedeniyle odak dışına çıksa da sonuçlarımızın sabit kaldığını gösterdi.

4.2.3. Hücre Ölümü Analizleri

Çalışmamızda araştırılan bir diğer konu hücre ölümünün YZ kullanılarak tespit edilebilmesidir. Apoptoz, düzenli ve kontrollü bir mekanizması olan programlanmış bir hücre ölümüdür. Apoptoz, bir dizi enzime bağımlı biyokimyasal süreçle birlikte hücrenin yapısında bir dizi karakteristik morfolojik değişiklik ile karakterizedir (D'Arcy, 2019). Hücre küçülür, yoğunlaşır ve sonunda parçalanır. Çekirdekte kromatin yoğunlaşması apoptozun bir özelliğidir. Hücre içeriğini taşıyan apoptotik cisimler adı verilen küçük membranöz veziküller oluşur (D'Arcy, 2019). Şekil 54'de böyle bir hücre ölümündeki apoptotik cisimciklerin görünebildiği, time-lapse sisteminde yakalanmış örnek hücreler görülmektedir.



Şekil 54: Time-lapse görüntülemede yakalanmış ölmekte olan hücreler. Hücrenin çevresindeki küçük parlak noktacıklar apoptotik vezikülleri göstermektedir. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere kıyasla daha parlak olduğu da görülmektedir.

Apoptozun aksine, nekroz; hücrenin kontrolsüz ölümünü tanımlar. Genellikle ciddi bir hasardan sonra, hücre içeriğinin çevre dokulara saçılmasıyla sonuçlanır (D'Arcy, 2019). Aşırı sıcaklık, CO_2, gibi çevresel koşullar, hızlı hücre ve doku hasarı ile birlikte

hücresel ortama zarar verir. Bu nedenle, nekroz pasif, kazara hücre ölümü olarak karakterize edilir. Nekroz sırasında, hücresel içerik hücre dışı ortama salınır ve komşu hücreler üzerinde zararlı etkiler yaratır (Lakna, 2017). Apoptozda hücre büzülmesi ve küçülmesi gerçekleşir, hücre sitoplazma yoğunluğu ve hücre içi Ca+2 konsantrasyonu artar. Nekrozda ise hücre şişer ve boyutu artar, hücre zarı ve organellerinde parçalanma görülür. Son zamanlarda, bir dizi apoptoz alt tiplerinin var olduğu ve apoptoz, nekroz ve otofaji arasında bazı örtüşmeler de olduğu ortaya çıkmıştır (D'Arcy, 2019).

Apoptotik hücreler, mikroskopta, pürüzsüz sınırlar sergileyen normal hücrelere kıyasla düzensiz şekillere ve bulanık sınırlara yol açan kabarma sergilerler. Blebbing, apoptoz meydana geldiğinde hücre iskeletinin membrandan ayrılmasından sonra hücre zarının şişmesinden kaynaklanır, bu da piksel sayılarında ve hücre sınırı boyunca değerlerinde önemli farklılıklar gösterebilir. Apoptoz görüntülerindeki farklılıklar nedeniyle, hücre sınırını tanımlamak için genellikle daha fazla sayıda piksele ihtiyaç vardır. Apoptoza hücre zarının şişmesi eşlik ettiğinden, hücre sınır uzunluğu apoptozun bir göstergesi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, hücre boyutundaki değişkenlik nedeniyle, sınır uzunluğu tek başına yanıltıcı olabilir. (Du vd., 2016).

Adherent hücreler apoptoz sürecinde hücreleri yüzeye tutturan adezyon moleküllerinin ortadan kalkması ve hücre içi stres fibrillerinin (aktin-miyozin ipliklerinin) kasılması sonucunda önce genişçe tutundukları yüzeyde toparlanarak küresel hale gelir, ardından da yüzeyden tamamen koparlar (Kräter vd., 2018). Bu durumun görünür ışıktaki mikroskobik görünüme etkisi, yuvarlaklaşan hücrelerde, küresel şeklin kenarlarından yansıyan ışık nedeniyle parlak/beyaz renk alması şeklindedir. GFP kanalında ise geniş alana yayılmış floresan proteinlerin küresel hale gelmiş hücrede bir araya toplanması sonucu ortaya çıkan parlaklık artışı şeklindedir.

Hücre ölümü ile ilgili süreçlerde hücrelerde tek tek gerçekleşen parlaklık artışı toplu olarak ele alındığında inceleme alanında artan hücre ölümü ile birlikte parlak hücre miktarında da artış gözlenmektedir. Benzer durum GFP+ hücrelerde de gözlenmekle birlikte bu kez sürecin daha farklı ilerlemekte, adherent hücreler başlangıçta küresel hale gelerek parlaklıklarını arttırmakta, ardından tamamen solmaktadır.

Hücreler, stres durumlarında hücreyi korumak adına metabolik süreçleri durdurarak mevcut ATP'yi koruma ve yeni ATP üretim süreçlerini aktive etme yoluna gitmektedir (Dornhof vd., 2017). GFP sentezi de muhtemelen durdurulan bu metabolik süreçlerin sonucu olarak üretilmemekte, mevcut GFP molekülleri de protein

degredasyonu veya solma (photobleaching) nedeniyle ışıma vermeyi kesmektedir. Bu durum, time-lapse videolarda, ölmekte olan hücrelerin, daha kabın yüzeyinden tamamen kopmadan önce GFP sinyalinin kaybolması şeklinde gözlemlememiz bu hipotezimizi doğrulamaktadır. YZ analizlerinde GFP sinyal kaybının ölçülerek, hücre ölümünü GFP sinyalinin azalması şeklinde takip ettik. Bu noktada, incelenen alandaki GFP pozitif miktarı her örnekte farklı olabileceğinden, hücre ölümü ile ilgili bilgi edilmek adına, toplam GFP pozitif hücre popülasyonu içinde yuvarlaklaşmış şekli itibariyle parlak olarak görülen hücrelerin oranı ve GFP sinyalinin kaybı parametreleri kullanıldı.

Hücrelerde apoptozu dışarıdan müdahale ile elde etmek için bazı deney gruplarına literatürde bu amaçla sıklıkla kullanılan H_2O_2 çözeltisi eklendi (Ertaş vd., 2012; Takeda vd., 1999). Bu sayede hücrelerin belirlenen saatte hücre ölümüne gitmesi sağlanarak sürecin analiz edilebilirliği değerlendirildi. Deneylerimiz H_2O_2 eklenen gruplarda yaklaşık bir saat içerisinde hücrelerin öldüğünü time-lapse görüntülerinde ortaya koyarken yaptığımız YZ analizleri de hem görünür ışıkta hem GFP sinyali üzerinden bu durumu doğruladı.

2B kültürlerde görece kolay olarak analiz edilebilen bu süreç, 3B kültürlerde, jel içinde enkapsüle edilmiş hücrelerde ölümün ardından jelin içerisinden yükselme gibi bir durumu olamayacağından 3B kültürde hücre ölümünün spesifik boyama yapmadan anlaşılması mümkün değildir. Ancak çalışmamızda 3B kültürlerde de hücrelerin apoptoz/nekroz sırasında 2B kültürdeki sürece benzer şekilde GFP sinyalini kaybettikleri saptandı. Bu durumdan yola çıkılarak 3B kültürlerde hücre canlılığının GFP ışımasındaki değişim miktarı üzerinden, time-lapse YZ sistemleri kombine edilerek saptanabileceği sonucuna varıldı.

4.2.4. Hücre Hareketi Analizleri

Time-lapse görüntülerde hücre ölümü görüntüleri incelenirken, ölen hücrelerin hareketlerinin yavaşlayıp durduğu görüldü. Bu durumun sayısallaştırılabilmesi amacıyla; normalde canlı hücrelerin kültür kabı üzerinde sürekli hareket halinde olması ve bu hareketin fotoğraf çekilen kareler arasında ışıma farkına yol açtığı gözleminden yola çıkarak, iki ardışık fotoğraf karesi arasındaki ışıma farkı hesaplanarak grafik haline getirildi (Şekil 49-53). Bu grafiklerde, canlı hücrelerde normalde iki kare arası %2-4 civarında olan hareketlilik oranının ölü hücrelerde sıfıra yaklaştığı gözlendi.

Hücre hareketi üzerinden yaptığımız canlılık analizleri, konfluensi ve hücre ölümü grafikleri ile karşılaştırıldığında verilerin birbiri ile örtüştüğü, hücre hareketi azaldığında hücre canlılığının da düştüğü görüldü. Bu süreçte gözlemlediğimiz ilginç bir durum da insan gözüyle yapılan analizlerde hücrelerin öldüğüne işaret eden toparlanıp yüzeyden kalkma davranışlarını sergilemeden daha önce hareketlerinin durduğu ve GFP sinyallerinin kaybolduğu şeklindedir. Bu durum bize, yaptığımız analizlerin, hücre ölümünü, insanların çıplak gözle fark edebildikleri zamandan daha önce belirleyebileceğini işaret etti.

Bu veriler ışığında hücre hareketi üzerinden gerçekleştirilen analizlerimizin gelecekte ilaç araştırmaları gibi süreçlerde toksisite testleri yerine kullanılabileceğini düşündük.

4.3. Limitasyonlar

Çalışmamızda kullanılan hücrelerin ışıması, görüntülerin elde edildiği mikroskop ve inkübatör sistemi ve kullanılan YZ analiz yazılımı gibi çeşitli etkenler açısından bazı dezavantajları bulunduğu da görülmüştür. Çalışmamız bu alanda yapılan ilk çalışma olması nedeniyle ilk etapta olumsuz olarak yansıyan bu etkenler gelecek çalışmalarda diğer araştırmacılara yol göstermesi açısından aşağıda sıralanmıştır.

4.3.1. Hücre hareketi

Analiz için mikroskopta odaklanılan alanda yer alan hücreler normal hücre göçü sırasında alandan çıkabilmekte veya alana yeni hücreler girebilmektedir. Yüksek büyütmede az sayıda hücreye odaklanıldığında bu durum analizlerde yanlış sonuç alınmasına neden olabilmektedir.

Bir diğer nokta da ölen ve yüzeyden kalkan hücrelerin yüzerek görüntü alanından geçerken oluşturduğu görüntü kirliliği ve bu durumun yarattığı parazitlenmedir. Bu durumun en aza indirgenmesi için ölü veya yüzen hücrelerin en az olacağı alanlara odaklanmak veya besiyerini yenilemek yarar sağlayabilir.

4.3.2. Jel hareketi

Jelin tabanı kaplamadığı deneylerde ve beklenen bir durum olarak jel şişmesi gözlemlendiğinde jel hareketinden kaynaklı olarak hücre takibini güçleştirmiştir. Hücreler şişen jel ile birlikte görüntü alanından çıkmışlardır. Bazı durumlarda ise jel

bütün halde yüzeyden kalkarak yüzmeye başlamış ve sağlıklı analiz yapılmasını engellemiştir. Bu durumun önüne geçmek için bazı deneylerimizde jelin kuyucuğun tabanını tamamen kaplamasını sağlayarak hareket etmemesini sağladık.

4.3.3. Odak değişimi

3B biyoyazıcılarda basılan veya diğer benzer yöntemlerle geliştirilen hidrojellerin besiyeri veya doku sıvısı içinde gösterdikleri davranışlardan biri de sıvı alarak şişmeleridir. 3B jellerin mühendislik bilimindeki rutin analizleri arasında yer alan şişme testleri hazırlanan jellerin sıvı içerisine bırakılıp toplam hacimdeki değişiminin ölçüldüğü hacminin Arşimet yöntemi ile yapılan volümetrik analizleri kapsamaktadır (Bociaga vd., 2019). Şişme sırasında genleşen jel ile hücreler de kabın tabanından yukarı ve çevre yönlere hareket etmektedir. Bu durum analizlerde hem X-Y düzleminde hem de Z düzleminde değişimlere neden olmaktadır.

X ve Y düzlemindeki hareket, genellikle genleşme nedeniyle gerçekleştiğinden başlangıçta analiz alanında bulunan hücreler zamanla genleşerek alan dışına çıkabilmektedir. Bu da hücrelerden alınan sinyal miktarında azalmaya neden olacağından programda hücre ölümü şeklinde sonuç verilmesine neden olacaktır. Normalde time-lapse görüntüleri izleyen araştırmacılar bu durumun farkına vararak analiz sonuçlarını uygun şekilde yorumlayabilirler. Diğer yandan, hücrelerdeki bu hareket nedeniyle yaşanan sinyal kaybındaki değişim, aynı zamanda jelin genleşme oranı ile orantılı olacağından şişme deneylerinde daha hassas ve sayısal veriler elde edilmesi amacıyla da kullanılabilir. Bu analizler çalışmamız kapsamında olmamakla birlikte, yöntemimizin kullanım alanlarının genişletilmesi bakımından gelecekte diğer araştırmacılar tarafından değerlendirilebilir.

Z düzlemindeki hareket ise jellerde, başlangıçta odaklanılan hücrelerin zamanla yükselerek objektifin odağından çıkmasına, dolayısıyla netlik kaybına neden olmaktadır. Ancak şekil 38 ve 40'da da görüldüğü üzere, Zen Intellesis, farklı odaklarda veya odak dışında yer alan örneklerde de GFP ışıması üzerinden analiz yapıldığında, aynı sonucu vermiştir. Bu durum geliştirdiğimiz analiz yönteminin, hücrelerin odak dışına çıkması durumlarında bile kullanılabileceği anlamına gelmektedir.

4.3.4. Fototoksisite

Fototoksisite tam zamanlı floresan mikroskobu görüntüleme sırasında ortaya çıkan olumsuz bir durumdur. Fototoksisite, yüksek UV gücü ile veya uzun süre aydınlatıldığında, görüntülenen organizmaların/hücrelerin hasar gördüğü bir süreçtir (Hagen vd., 2021). Yüksek reaktif fotokimyasal ürünler, ısıtma ve DNA hasarı üretebilen dalga boyuna bağlı fotofiziksel mekanizmalardan oluşan karmaşık bir olgudur. Floresan uyarma zarar veren serbest radikalleri üretir, bu yüzden gerçek zamanlı görüntüleme verimliliğini azaltılabilir. Hücrelerin serbest radikaller ile başa çıkmak için kullandığı yollar bulunmakta ve bu savunma mekanizmaları aşırı yüklenmediği sürece, hücreler floresan uyarımını tolere edebilmektedir (Laissue vd., 2017). Floresan ışığın hücresel bileşenlerle etkileşimleri, hücrelerin makromoleküllerini ve fizyolojisini bozarak, hücreyi ölüme götürebilir.

Hücre ölümüne götüren faktörler; UV ışığın Fas reseptör aracılı sinyal yollarını indüklemesi, iplikçik kırılmasına veya timidin dimerizasyonuna neden olarak DNA'ya doğrudan zarar vermesi, mutasyonlara neden olması ile DNA hasar tepkilerini indüklemesi olarak sıralanabilir (Robinson vd., 2020). Fototoksisite, bir deneyden elde edilen sonuçları değiştirebilir. Elde edilen görüntü verilerinin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği ve bunlardan elde edilen biyolojik sonuçlar olumsuz etkilenebilir. Bu nedenle, fototoksisiteyi sınırlamak, biyolojik süreçler hakkında tekrarlanabilir nicel veriler elde etmek için şarttır (Icha vd., 2017). Fototoksisite farklı kaynaklardan köken alabilir. Örneğin, hücrelerde doğal olarak bulunan flavinler ve porfirinler gibi organik moleküller, görünür dalga boylarında ışığı emer ve sonrasında oksijen ile reaksiyona girerek bozulabilirler. Bu işlem reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. Süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve ROS, hücrelere çeşitli şekillerde zarar verebilir. ROS etkisini indirgemek icin antioksidanlar yani ROS temizleyicileri örneğin askorbik asit kullanılabilir. Ek antioksidanlar, Riboflavin veya piridoksal vitaminlerinin görüntüleme ortamından çıkarılması kullanılarak fototoksisite azaltılabilir. Fotobleaching, bir floresan yayan molekülün, geri dönüşü olmayan bir şekilde floresan yapamayacak şekilde kimyasal olarak değiştirildiği süreçtir. Bu durum, yüksek yoğunluklu floresan veya uzun süreli ışık maruziyetinden kaynaklanır. Fotobleaching ile ilgili hücresel süreçler de fototoksisitede rol oynar (Icha vd., 2017).

Fototoksisitenin azaltılması için kullanılan farklı yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan ilki daha az toksik boyaların kullanılması olmakla birlikte, hücreler üzerine düşen ışıma miktarında bir değişim olmadığından toksisitede önemli bir değişim yaratmamaktadır. Teknik olarak geliştirilen diğer bir yöntem de örnek üzerine sadece ince bir düzlemde ışık düşmesine ve minimal fototoksisiteye neden olan light-sheet yöntemidir. Bu yöntemle geliştirilen mikroskoplar daha az fototoksisiteye ve dolayısıyla daha az hücre ölümüne neden olmaktadır (Ichikawa vd., 2013; Richards vd., 2018; ZEISS, 2020). Bir diğer yöntem ise canlı hücre görüntüleme için uygun olarak uzun dalga boyu seçilerek floresan uyarımı yapılması hücre canlılığı için uygun olacaktır (Icha vd., 2017). Aydınlatma yükünü azaltmak adına; dinamik bir işlem için maksimum görüntü pozlama süresini belirleme, uyarma ışık yoğunluğunu optimize etme ve mitokondriyal belirteçlerle hücre sağlığını değerlendirme konusunda çalışılmalıdır (Kiepas vd., 2020).

Bizim çalışmamızda da özellikle DAPI ve GFP ışıması için analiz edilen, dolayısıyla UV ışımaya da maruz kalan bazı örneklerde fototoksisite gözlenmiştir. Bu bağlamda normalde inkübatörde sağlıklı olarak çoğalan hücreler time-lapse analiz sisteminde görüntüleniyorken hücre ölümünde artış izlenmiştir. Bu durum, mikroskoba ait inkübatör sisteminin optimal şartları sağlayamamasından kaynaklı olabileceği gibi, sadece görünür ışık ile analiz yaptığımızda daha az hücre ölümü gözlememiz, fototoksisite kaynaklı olabileceğini işaret etmektedir. Çalışmanın bu noktası, proje kapsamında olmadığı için incelenmemiştir ancak, ilerleyen çalışmalarda hücre ölümü üzerine yapılacak immün boyamalar ve spektrofotometrik analizler gibi ek testler ile daha ayrıntılı incelenerek aydınlığa kavuşturulabilir.

Bu tez projesinde özetle 3B kültür yöntemleri kullanılan çalışmaları, standardize etmek analizleri kolaylaştırmak ve hızlandırmak için yeni çözümler geliştirmek ve hızla gelişen 3B biyobaskı sektöründe hücrelerin analizini doğru bir şekilde anlamak için yapay zeka kullanıldı. Bu çalışmada geliştirilen yöntemler ile 3B biyobaskı sonrası analizler için standart bir protokol elde etmek amacıyla makine öğrenimi stratejileri ile ilerleyen aşamalarda baskı doğruluğunu artırmak ve biyobaskı teknolojisinde hücre-hücre ve hücre-jel etkileşimini izlemek ve geliştirmek için optimizasyon yaklaşımlarını kullanımı amaçlandı.

Çalışmamız bilgisayarlı görüntü analizi sisteminin kullanılması ile kullanıcıdan bağımsız objektif analizler yapılabildiği gösterildi. Kesin ve net sayısal değerlerin elde edilmesi ile sonuçların güvenilirliği artırılırdı. Görüntü analizi kullanılmadan önce yapılması mümkün olmayan veya yapılması çok zor görünen işlemler makine öğrenmesi ile kolayca yapılabileceği saptandı. Görüntü analizinin kullanımı zamandan kazanç sağlamış, güçlükle uzun sürede uygulanan işlemler daha kısa sürede ve daha kolay ve daha doğru sonuçlar ile gerçekleştirildiği sunuldu.

5. SONUÇ

İki boyutlu (2B) konvansiyonel hücre kültür sistemleri ve daha üstün özelliklere sahip 3B kültür sistemleri hücreleri incelemek ve vücut içerisindeki doğal ortamlarını taklit etmek amacıyla geliştirilen yöntemlerdir. Bu çalışma, standart 2B ve 3B kültür yöntemlerinin yanı sıra, kültür sonrasında zamana bağlı olarak değişen 4B hücre davranışlarının incelenmesi süreçlerinin yapay zeka ile analizi için yeni yöntemler geliştirilmesini içermektedir.

Çalışmamızda, hücre kültürü yapan kişilerin mikroskopta gözlemlediği ancak sayısal veri elde edemediği veya elde etmek için özel cihazlar veya işaretleme teknikleri kullanılmasını gerektiren yöntemler yerine alternatif olarak kullanılabilecek bir yöntem geliştirdik. Bu yöntem ile hücreleri, araştırmacıların da genellikle sınıfladığı şekilde, hücre şekline, rengine, parlaklığına ve kaba tutunmasına göre sınıflayabilen ve bu verilerin zamana bağlı değişimlerini sayısal olarak gösteren bir sistem oluşturduk. Elde ettiğimiz formüller sayesinde hücre ölümünün, 4 boyutlu kültürlerde henüz hücre kabın yüzeyinden kalkmadan tespit edilebileceğini, hücrelerin tutunma ve ölüm hızlarının hesaplanabileceğini, sferoid oluşumunun belirlenebileceğini, hücrelerin mikro hareketlerinin, dolayısıyla aktifliklerinin belirlenebileceğini gördük. Ek olarak bu yöntemlerle, normalde insan emeği ile haftalar sürecek analizlerin saatler içerisinde, binlerce fotoğrafta uygulanabileceğini ve oldukça hassas sonuçlar elde edilebileceğini ortaya koyduk.

Çalışma sonuçlarımız ilerleyen yıllarda, hem hücre kültürü konusunda çalışan araştırmacılara hücre migrasyonu, canlılığı ve ölümü ile ilgili sayısal bilgi vermek için etkili bir yöntem olarak, hem de bu teknolojiyi kullanacak YZ bazlı cihazlar geliştirmek amacıyla kullanılabilir.

KAYNAKÇA

Aljohani, W., Ullah, M. W., Zhang, X., ve Yang, G. (2018). Bioprinting and its applications in tissue engineering and regenerative medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*(PartA), 261–275. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.171

Aras, Y., Sabanci, P. A., Kabatas, S., Duruksu, G., Subasi, C., Erguven, M., ve Karaoz, E. (2016). The effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation during the acute and subacute phases following spinal cord injury. *Turkish Neurosurgery*, *26*(1), 127–139. https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.15724-15.0

Aroguz, A. Z., Baysal, K., Adiguzel, Z., ve Baysal, B. M. (2014). Alginate/polyoxyethylene and alginate/gelatin hydrogels: Preparation, characterization, and application in tissue engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *173*(2), 433–448. https://doi.org/10.1007/s12010-014-0851-0

Ashammakhi, N., Ahadian, S., Xu, C., Montazerian, H., Ko, H., Nasiri, R., Barros, N., ve Khademhosseini, A. (2019). Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs. *Materials Today Bio*, *1*(February). https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100008

Benke, K., ve Benke, G. (2018). Artificial intelligence and big data in public health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(12). https://doi.org/10.3390/ijerph15122796

Benoit, D. S. W., Durney, A. R., ve Anseth, K. S. (2006). Manipulations in hydrogel degradation behavior enhance osteoblast function and mineralized tissue formation. *Tissue Engineering*, *12*(6), 1663–1673. https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1663

Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., ve Miłowska, K. (2020). Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–17. https://doi.org/10.3390/ijms21176225

Biggs, M. J. P., Richards, R. G., Gadegaard, N., Wilkinson, C. D. W., Oreffo, R. O. C., ve Dalby, M. J. (2009). The use of nanoscale topography to modulate the dynamics of adhesion formation in primary osteoblasts and ERK/MAPK signalling in STRO-

1+ enriched skeletal stem cells. *Biomaterials*, *30*(28), 5094–5103. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.049

Bissell, M. J. (2017). Goodbye flat biology - time for the 3rd and the 4th dimensions. *Journal of Cell Science*, *130*(1), 3–5. https://doi.org/10.1242/jcs.200550

Blaeser, A., Duarte Campos, D. F., Puster, U., Richtering, W., Stevens, M. M., ve Fischer, H. (2016). Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Advanced Healthcare Materials*, *5*(3), 326–333. https://doi.org/10.1002/adhm.201500677

Bociaga, D., Bartniak, M., Grabarczyk, J., ve Przybyszewska, K. (2019). Sodium alginate/gelatine hydrogels for direct bioprinting-the effect of composition selection and applied solvents on the bioink properties. *Materials*, *12*(7), 1–19. https://doi.org/10.3390/ma12172669

Bolhaqueiro, A. C. F., van Jaarsveld, R. H., Ponsioen, B., Overmeer, R. M., Snippert, H. J., ve Kops, G. J. P. L. (2018). Live imaging of cell division in 3D stem-cell organoid cultures. *Methods in Cell Biology*, *145*, 91–106. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.03.016

Bratt-Leal, A. M., Carpenedo, R. L., Ungrin, M. D., Zandstra, P. W., ve McDevitt, T. C. (2011). Incorporation of biomaterials in multicellular aggregates modulates pluripotent stem cell differentiation. *Biomaterials*, *32*(1), 48–56. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.113

Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., Golland, P., ve Sabatini, D. M. (2006). CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology*, *7*(10). https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100

Castilho, M., de Ruijter, M., Beirne, S., Villette, C. C., Ito, K., Wallace, G. G., ve Malda, J. (2020). Multitechnology Biofabrication: A New Approach for the Manufacturing of Functional Tissue Structures? *Trends in Biotechnology*, *38*(12), 1316–1328. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.04.014

Chandrasekaran, A., Avci, H. X., Ochalek, A., Rösingh, L. N., Molnár, K., László, L., Bellák, T., Téglási, A., Pesti, K., Mike, A., Phanthong, P., Bíró, O., Hall, V., Kitiyanant, N., Krause, K. H., Kobolák, J., ve Dinnyés, A. (2017). Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, *25*, 139–151.

https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.10.010

Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Ruotti, V., Probasco, M. D., Smuga-Otto, K., Howden, S. E., Diol, N. R., Propson, N. E., Wagner, R., Lee, G. O., Antosiewicz-Bourget, J., Teng, J. M. C., ve Thomson, J. A. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature Methods*, *8*(5), 424–429. https://doi.org/10.1038/nmeth.1593

Cheng, L., Yao, B., Hu, T., Cui, X., Shu, X., Tang, S., Wang, R., Wang, Y., Liu, Y., Song, W., Fu, X., Li, H., ve Huang, S. (2019). Properties of an alginate-gelatin-based bioink and its potential impact on cell migration, proliferation, and differentiation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *135*, 1107–1113. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.017

Cidonio, G., Glinka, M., Dawson, J. I., ve Oreffo, R. O. C. (2019). The cell in the ink: Improving biofabrication by printing stem cells for skeletal regenerative medicine. *Biomaterials*, *209*(November 2018), 10–24. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.009

Cui, X., Breitenkamp, K., Finn, M. G., Lotz, M., ve D'Lima, D. D. (2012). Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Engineering - Part A*, *18*(11–12), 1304–1312. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0543

Cui, X., Breitenkamp, K., Lotz, M., ve D'Lima, D. (2012). Synergistic action of fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 enhances bioprinted human neocartilage formation. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(9), 2357–2368. https://doi.org/10.1002/bit.24488

Cui, X., Dean, D., Ruggeri, Z. M., ve Boland, T. (2010). Cell damage evaluation of thermal inkjet printed chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *106*(6), 963–969. https://doi.org/10.1002/bit.22762

Cui, X., Gao, G., ve Qiu, Y. (2013). Accelerated myotube formation using bioprinting technology for biosensor applications. *Biotechnology Letters*, *35*(3), 315–321. https://doi.org/10.1007/s10529-012-1087-0

D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, *43*(6), 582–592. https://doi.org/10.1002/cbin.11137

Dai, A., Baspinar, O., Yesilyurt, A., Sun, E., Inci Aydemir, C., Oztel, O. N., Capkan, D. U., Pinarli, F., Agar, A., ve Karaoz, E. (2018). Efficacy of stem cell therapy in

ambulatory and nonambulatory children with Duchenne muscular dystrophy vendash; Phase Ivendash;II. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, *Volume 8*, 63–77. https://doi.org/10.2147/dnnd.s170087

Daly, A. C., Pitacco, P., Nulty, J., Cunniffe, G. M., ve Kelly, D. J. (2018). 3D printed microchannel networks to direct vascularisation during endochondral bone repair. *Biomaterials*, *162*, 34–46. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.057

Datta, L. P., Manchineella, S., ve Govindaraju, T. (2020). Biomolecules-derived biomaterials. *Biomaterials*, *230*. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119633

Dimiduk, D. M., Holm, E. A., ve Niezgoda, S. R. (2018). Perspectives on the Impact of Machine Learning, Deep Learning, and Artificial Intelligence on Materials, Processes, and Structures Engineering. *Integrating Materials and Manufacturing Innovation*, *7*(3), 157–172. https://doi.org/10.1007/s40192-018-0117-8

Dolati, F., Yu, Y., Zhang, Y., Jesus, A. M. D., Sander, E. A., ve Ozbolat, I. T. (2014). In vitro evaluation of carbon-nanotube-reinforced bioprintable vascular conduits. *Nanotechnology*, *25*(14). https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/14/145101

Dornhof, R., Maschowski, C., Osipova, A., Gieré, R., Seidl, M., Merfort, I., ve Humar, M. (2017). Stress fibers, autophagy and necrosis by persistent exposure to PM2.5 from biomass combustion. *PLoS ONE*, *12*(7), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180291

Du, Y., Budman, H. M., ve Duever, T. A. (2016). Classification of Normal and Apoptotic Cells from Fluorescence Microscopy Images Using Generalized Polynomial Chaos and Level Set Function. *Microscopy and Microanalysis*, *22*(3), 475–486. https://doi.org/10.1017/S1431927616000702

Dzyubachyk, O., Van Cappellen, W. A., Essers, J., Niessen, W. J., ve Meijering, E. (2010). Advanced level-set-based cell tracking in time-lapse fluorescence microscopy. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, *29*(3), 852–867. https://doi.org/10.1109/TMI.2009.2038693

Emami, N., Sedaei, Z., ve Ferdousi, R. (2021). Computerized cell tracking: Current methods, tools and challenges. *Visual Informatics*, *5*(1), 1–13. https://doi.org/10.1016/j.visinf.2020.11.003

England, J. R., ve Cheng, P. M. (2020). Artificial intelligence for medical image processing. *Technology and Health Care*, *March*, 1–2. https://doi.org/10.3233/thc-202658

Ertaş, G., Ural, E., Ural, D., Aksoy, A., Kozdağ, G., Gacar, G., ve Karaöz, E. (2012). Comparative analysis of apoptotic resistance of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow and adipose tissue. *The Scientific World Journal*, *2012*. https://doi.org/10.1100/2012/105698

Fernandes, L. F., Costa, M. A., Fernandes, M. H., ve Tomás, H. (2009). Osteoblastic behavior of human bone marrow cells cultured over adsorbed collagen layer, over surface of collagen gels, and inside collagen gels. *Connective Tissue Research*, *50*(5), 336–346. https://doi.org/10.3109/03008200902855909

Ferreira, L. P., Gaspar, V. M., ve Mano, J. F. (2018). Bioinstructive microparticles for self-assembly of mesenchymal stem Cell-3D tumor spheroids. *Biomaterials*, *185*, 155–173. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.007

Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Langer, R., ve Peppas, N. A. (2010). Bioinspired materials for controlling stem cell fate. *Accounts of Chemical Research*, *43*(3), 419–428. https://doi.org/10.1021/ar900226q

Frausin, S., Viventi, S., Verga Falzacappa, L., Quattromani, M. J., Leanza, G., Tommasini, A., ve Valencic, E. (2015). Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochemica*, *117*(4–5), 329–338. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.005

Górriz, J. M., Ramírez, J., Ortíz, A., Martínez-Murcia, F. J., Segovia, F., Suckling, J., Leming, M., Zhang, Y. D., Álvarez-Sánchez, J. R., Bologna, G., Bonomini, P., Casado, F. E., Charte, D., Charte, F., Contreras, R., Cuesta-Infante, A., Duro, R. J., Fernández-Caballero, A., Fernández-Jover, E., … Ferrández, J. M. (2020). Artificial intelligence within the interplay between natural and artificial computation: Advances in data science, trends and applications. *Neurocomputing*, *410*(June), 237–270. https://doi.org/10.1016/j.neucom.2020.05.078

Griffith, L. G., ve Swartz, M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(3), 211–224. https://doi.org/10.1038/nrm1858

Gu, Z., Fu, J., Lin, H., ve He, Y. (2020). Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *15*(5), 529–557. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.003

Hagen, G. M., Bendesky, J., Machado, R., Nguyen, T. A., Kumar, T., ve Ventura, J.

(2021). Fluorescence microscopy datasets for training deep neural networks. *GigaScience*, *10*(5), 1–6. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab032

Hamann, A., Nguyen, A., ve Pannier, A. K. (2019). Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: A review of nonviral methods and applications. *Journal of Biological Engineering*, *13*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s13036-019-0140-0

Hessler, G., ve Baringhaus, K. H. (2018). Artificial intelligence in drug design. *Molecules*, *23*(10). https://doi.org/10.3390/molecules23102520

Hu, Y., Wu, Y., Gou, Z., Tao, J., Zhang, J., Liu, Q., Kang, T., Jiang, S., Huang, S., He, J., Chen, S., Du, Y., ve Gou, M. (2016). 3D-engineering of cellularized conduits for peripheral nerve regeneration. *Scientific Reports*, *6*(April), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep32184

Icha, J., Weber, M., Waters, J. C., ve Norden, C. (2017). Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays*, *39*(8), 1–15. https://doi.org/10.1002/bies.201700003

Ichikawa, T., Nakazato, K., Keller, P. J., Kajiura-Kobayashi, H., Stelzer, E. H. K., Mochizuki, A., ve Nonaka, S. (2013). Live Imaging of Whole Mouse Embryos during Gastrulation: Migration Analyses of Epiblast and Mesodermal Cells. *PLoS ONE*, *8*(7), 4–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064506

Irvine, S. A., ve Venkatraman, S. S. (2016). Bioprinting and differentiation of stem cells. *Molecules*, *21*(9). https://doi.org/10.3390/molecules21091188

Jessop, Z. M., Al-Sabah, A., Gardiner, M. D., Combellack, E., Hawkins, K., ve Whitaker, I. S. (2017). 3D bioprinting for reconstructive surgery: Principles, applications and challenges. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, *70*(9), 1155–1170. https://doi.org/10.1016/j.bjps.2017.06.001

Jiang, C. F., Hsu, S. hui, Sun, Y. M., ve Tsai, M. H. (2020). Quantitative Bioimage Analysis of Passaging Effect on the Migratory Behavior of Human Mesenchymal Stem Cells During Spheroid Formation. In *Cytometry Part A* (Vol. 97, Issue 4, pp. 394–406). https://doi.org/10.1002/cyto.a.23985

Jiang, F., Jiang, Y., Zhi, H., Dong, Y., Li, H., Ma, S., Wang, Y., Dong, Q., Shen, H., ve Wang, Y. (2017). Artificial intelligence in healthcare: Past, present and future. *Stroke and Vascular Neurology*, *2*(4), 230–243. https://doi.org/10.1136/svn-2017-000101

Jiang, T., Munguia-Lopez, J., Flores-Torres, S., Grant, J., Vijayakumar, S., de Leon-

Rodriguez, A., ve Kinsella, J. M. (2018). Bioprintable alginate/gelatin hydrogel 3D in vitro model systems induce cell spheroid formation. *Journal of Visualized Experiments*, *2018*(137), 1–11. https://doi.org/10.3791/57826

Kabataş, S., Civelek, E., İnci, Ç., Yalçınkaya, E. Y., Günel, G., Kır, G., Albayrak, E., Öztürk, E., Adaş, G., ve Karaöz, E. (2018). Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Patient with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Pilot Study. *Cell Transplantation*, *27*(10), 1425–1433. https://doi.org/10.1177/0963689718786692

Kan, A. (2017). Machine learning applications in cell image analysis. *Immunology and Cell Biology*, *95*(6), 525–530. https://doi.org/10.1038/icb.2017.16

Kang, H. W., Lee, S. J., Ko, I. K., Kengla, C., Yoo, J. J., ve Atala, A. (2016). A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology*, *34*(3), 312–319. https://doi.org/10.1038/nbt.3413

Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sarıboyacı, A. E., Kaymaz, F., ve Kasap, M. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: Ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and Cell Biology*, *132*(5), 533–546. https://doi.org/10.1007/s00418-009-0629-6

Karaoz, E., Ayhan, S., Gacar, G., Aksoy, A., Duruksu, G., Okçu, A., Demircan, P. Ç., Sariboyaci, A. E., Kaymaz, F., ve Kasap, M. (2010). Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: Pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy*, *12*(3), 288–302. https://doi.org/10.3109/14653240903580296

Karaöz, E., Demircan, P. Ç., Erman, G., Güngörürler, E., ve Sarıboyacı, A. E. (2017). Kemik İliği, Wharton Jölesi ve İnsan Yağ Doku-Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünsüpresif Özelliklerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. *Turkish Journal of Hematology*, *34*(3), 213–225. https://doi.org/10.4274/tjh.2016.0171

Karaöz, E., Doğan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., Genç, Z. S., Yürüker, S., Duruksu, G., Demircan, P. Ç., ve SarIboyacI, A. E. (2010). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology*, *133*(1), 95–112. https://doi.org/10.1007/s00418-009-0646-5

Khalil, S., ve Sun, W. (2007). Biopolymer deposition for freeform fabrication of hydrogel

tissue constructs. *Materials Science and Engineering C*, *27*(3), 469–478. https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.023

Kiepas, A., Voorand, E., Mubaid, F., Siegel, P. M., ve Brown, C. M. (2020). Optimizing live-cell fluorescence imaging conditions to minimize phototoxicity. *Journal of Cell Science*, *133*(4). https://doi.org/10.1242/JCS.242834

Kim, J., McKee, J. A., Fontenot, J. J., ve Jung, J. P. (2020). Engineering Tissue Fabrication With Machine Intelligence: Generating a Blueprint for Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*(January), 1–9. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00443

Knight, E., ve Przyborski, S. (2015). Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy*, *227*(6), 746–756. https://doi.org/10.1111/joa.12257

Kolesky, D. B., Truby, R. L., Gladman, A. S., Busbee, T. A., Homan, K. A., ve Lewis, J. A. (2014). 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Advanced Materials*, *26*(19), 3124–3130. https://doi.org/10.1002/adma.201305506

Kolios, G., ve Moodley, Y. (2012). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, *85*(1), 3–10. https://doi.org/10.1159/000345615

König, A. I., Sorkin, R., Alon, A., Nachmias, D., Dhara, K., Brand, G., Yifrach, O., Arbely, E., Roichman, Y., ve Elia, N. (2020). Live cell single molecule tracking and localization microscopy of bioorthogonally labeled plasma membrane proteins. *Nanoscale*, *12*(5), 3236–3248. https://doi.org/10.1039/c9nr08594g

Korurer, E., Kenar, H., Doger, E., ve Karaoz, E. (2014). Production of a composite hyaluronic acid/gelatin blood plasma gel for hydrogel-based adipose tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *102*(7), 2220–2229. https://doi.org/10.1002/jbm.a.34901

Kraehenbuehl, T. P., Langer, R., ve Ferreira, L. S. (2011). Three-dimensional biomaterials for the study of human pluripotent stem cells. *Nature Methods*, *8*(9), 731–736. https://doi.org/10.1038/nmeth.1671

Kräter, M., Sapudom, J., Bilz, N., Pompe, T., Guck, J., ve Claus, C. (2018). Alterations in Cell Mechanics by Actin Cytoskeletal Changes Correlate with Strain-Specific Rubella Virus Phenotypes for Cell Migration and Induction of Apoptosis. *Cells*, *7*(9), 136. https://doi.org/10.3390/cells7090136

Krittanawong, C., Zhang, H. J., Wang, Z., Aydar, M., ve Kitai, T. (2017). Artificial Intelligence in Precision Cardiovascular Medicine. *Journal of the American College of Cardiology*, *69*(21), 2657–2664. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.03.571

Laissue, P. P., Alghamdi, R. A., Tomancak, P., Reynaud, E. G., ve Shroff, H. (2017). Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nature Methods*, *14*(7), 657–661. https://doi.org/10.1038/nmeth.4344

Lakna. (2017). Difference Between Apoptosis and Necrosis Main Difference – Apoptosis vs Necrosis. *Pediaa*, *April*. https://pediaa.com/difference-between-apoptosis-and-necrosis/

Lane, S. W., Williams, D. A., ve Watt, F. M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature Biotechnology*, *32*(8), 795–803. https://doi.org/10.1038/nbt.2978

Leberfinger, A. N., Dinda, S., Wu, Y., Koduru, S. V., Ozbolat, V., Ravnic, D. J., ve Ozbolat, I. T. (2019). Bioprinting functional tissues. *Acta Biomaterialia*, *95*(xxxx), 32–49. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.009

Lee, J., Oh, S. J., An, S. H., Kim, W. D., Kim, S. H., ve Kim, S. H. (2020). Machine learning-based design strategy for 3D printable bioink: Elastic modulus and yield stress determine printability. *Biofabrication*, *12*(3). https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab8707

Lee, S. J., Esworthy, T., Stake, S., Miao, S., Zuo, Y. Y., Harris, B. T., ve Zhang, L. G. (2018). Advances in 3D Bioprinting for Neural Tissue Engineering. *Advanced Biosystems*, *2*(4), 1–18. https://doi.org/10.1002/adbi.201700213

Li, Y. C., Zhang, Y. S., Akpek, A., Shin, S. R., ve Khademhosseini, A. (2017). 4D bioprinting: The next-generation technology for biofabrication enabled by stimuli-responsive materials. *Biofabrication*, *9*(1), 1–16. https://doi.org/10.1088/1758-5090/9/1/012001

Liu, F., Chen, Q., Liu, C., Ao, Q., Tian, X., Fan, J., Tong, H., ve Wang, X. (2018). Natural polymers for organ 3D bioprinting. *Polymers*, *10*(11), 1–26. https://doi.org/10.3390/polym10111278

Madl, C. M., ve Heilshorn, S. C. (2018). Engineering Hydrogel Microenvironments to Recapitulate the Stem Cell Niche. In *Annual Review of Biomedical Engineering* (Vol. 20, Issue 1, pp. 21–47). https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-120954

Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., ve Kim, D. H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, *34*(4), 422–434. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011

Mannam, V., Zhang, Y., Yuan, X., Ravasio, C., ve Howard, S. S. (2020). Machine learning for faster and smarter fluorescence lifetime imaging microscopy. *ArXiv*.

Manser, R., Elsässer, R., ve Döring, V. (2018). *ZEISS ZEN Intellesis Machine Learning Approaches for Easy and Precise Image Segmentation*.

McKee, C., ve Chaudhry, G. R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *159*, 62–77. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.051

Merten, O. W. (2015). Advances in cell culture: Anchorage dependence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1661). https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0040

Meyer, M. G., Fauver, M., Rahn, J. R., Neumann, T., Patten, F. W., Seibel, E. J., ve Nelson, A. C. (2009). Automated cell analysis in 2D and 3D: A comparative study. *Pattern Recognition*, *42*(1), 141–146. https://doi.org/10.1016/j.patcog.2008.06.018

Miller, D. D., ve Brown, E. W. (2018). Artificial Intelligence in Medical Practice: The Question to the Answer? *American Journal of Medicine*, *131*(2), 129–133. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.10.035

Murphy, S. V., ve Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, *32*(8), 773–785. https://doi.org/10.1038/nbt.2958

Nagarajan, N., Dupret-Bories, A., Karabulut, E., Zorlutuna, P., ve Vrana, N. E. (2018). Enabling personalized implant and controllable biosystem development through 3D printing. *Biotechnology Advances*, *36*(2), 521–533. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.004

Nair, K., Gandhi, M., Khalil, S., Yan, K. C., Marcolongo, M., Barbee, K., ve Sun, W. (2009). Characterization of cell viability during bioprinting processes. *Biotechnology Journal*, *4*(8), 1168–1177. https://doi.org/10.1002/biot.200900004

Newland, B., Moloney, T. C., Fontana, G., Browne, S., Abu-Rub, M. T., Dowd, E., ve Pandit, A. S. (2013). The neurotoxicity of gene vectors and its amelioration by packaging with collagen hollow spheres. *Biomaterials*, *34*(8), 2130–2141. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.049

Nichols, J. A., Herbert Chan, H. W., ve Baker, M. A. B. (2019). Machine learning:

applications of artificial intelligence to imaging and diagnosis. *Biophysical Reviews*, *11*(1), 111–118. https://doi.org/10.1007/s12551-018-0449-9

Nketia, T. A., Sailem, H., Rohde, G., Machiraju, R., ve Rittscher, J. (2017). Analysis of live cell images: Methods, tools and opportunities. *Methods*, *115*(February), 65–79. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.02.007

Öksüz, S., Alagöz, M. Ş., Karagöz, H., Küçükodac, Z., Karaöz, E., Duruksu, G., ve Aksu, G. (2015). Comparison of Treatments with Local Mesenchymal Stem Cells and Mesenchymal Stem Cells with Increased Vascular Endothelial Growth Factor Expression on Irradiation Injury of Expanded Skin. *Annals of Plastic Surgery*, *75*(2), 219–230. https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000574

Okur, S. Ç., Erdoğan, S., Demir, C. S., Günel, G., ve Karaöz, E. (2018). The effect of Umbilical Cord-derived Mesenchymal stem cell transplantation in a patient with cerebral palsy: A case report. *International Journal of Stem Cells*, *11*(1), 141–147. https://doi.org/10.15283/ijsc17077

Ongsulee, P. (2018). Artificial intelligence, machine learning and deep learning. *International Conference on ICT and Knowledge Engineering*, 1–6. https://doi.org/10.1109/ICTKE.2017.8259629

Ouyang, L., Yao, R., Mao, S., Chen, X., Na, J., ve Sun, W. (2015). Three-dimensional bioprinting of embryonic stem cells directs highly uniform embryoid body formation. *Biofabrication*, *7*(4), 44101. https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/044101

Panch, T., Szolovits, P., ve Atun, R. (2018). Artificial intelligence, machine learning and health systems. *Journal of Global Health*, *8*(2), 1–8. https://doi.org/10.7189/jogh.08.020303

Ribeiro, A., Blokzijl, M. M., Levato, R., Visser, C. W., Castilho, M., Hennink, W. E., Vermonden, T., ve Malda, J. (2018). Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. *Biofabrication*, *10*(1), 0–21. https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa90e2

Richards, R., Mason, D., Kelly, R., Lévy, R., Bearon, R., ve Sée, V. (2018). 4D imaging and analysis of multicellular tumour spheroid cell migration and invasion. *BioRxiv*, *12*. https://doi.org/10.1101/443648

Robinson, J., Xi, K., Kumar, R. V., Ferrari, A. C., Au, H., Titirici, M.-M., Parra Puerto, A., Kucernak, A., Fitch, S. D. S., ve Garcia-Araez, N. (2020). ce pte d M us pt. *J.*

Phys. Energy, *2*, 0–31.

Saito, Y., Nishio, K., Ogawa, Y., Kimata, J., Kinumi, T., Yoshida, Y., Noguchi, N., ve Niki, E. (2006). Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, *40*(6), 619–630. https://doi.org/10.1080/10715760600632552

Sapet, C., Formosa, C., Sicard, F., Bertosio, E., Zelphati, O., ve Laurent, N. (2013). 3D-fection: Cell transfection within 3D scaffolds and hydrogels. *Therapeutic Delivery*, *4*(6), 673–685. https://doi.org/10.4155/tde.13.36

Scheeder, C., Heigwer, F., ve Boutros, M. (2018). Machine learning and image-based profiling in drug discovery. *Current Opinion in Systems Biology*, *10*, 43–52. https://doi.org/10.1016/j.coisb.2018.05.004

Schuurman, W., Khristov, V., Pot, M. W., Van Weeren, P. R., Dhert, W. J. A., ve Malda, J. (2011). Bioprinting of hybrid tissue constructs with tailorable mechanical properties. *Biofabrication*, *3*(2). https://doi.org/10.1088/1758-5082/3/2/021001

Senders, J. T., Zaki, M. M., Karhade, A. V., Chang, B., Gormley, W. B., Broekman, M. L., Smith, T. R., ve Arnaout, O. (2018). An introduction and overview of machine learning in neurosurgical care. *Acta Neurochirurgica*, *160*(1), 29–38. https://doi.org/10.1007/s00701-017-3385-8

Skardal, A., Zhang, J., McCoard, L., Xu, X., Oottamasathien, S., ve Prestwich, G. D. (2010). Photocrosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogels for two-step bioprinting. *Tissue Engineering - Part A*, *16*(8), 2675–2685. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0798

Souza, A. G., Silva, I. B. B., Campos-Fernandez, E., Barcelos, L. S., Souza, J. B., Marangoni, K., Goulart, L. R., ve Alonso-Goulart, V. (2018). Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Current Pharmaceutical Design*, *24*(15), 1689–1694. https://doi.org/10.2174/1381612824666180404152304

Syed, A. B., ve Zoga, A. C. (2018). Artificial Intelligence in Radiology: Current Technology and Future Directions. *Seminars in Musculoskeletal Radiology*, *22*(5), 540–545. https://doi.org/10.1055/s-0038-1673383

Takeda, M., Shirato, I., Kobayashi, M., ve Endou, H. (1999). Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. *Nephron*, *81*(2), 234–238. https://doi.org/10.1159/000045282

Thrall, J. H., Li, X., Li, Q., Cruz, C., Do, S., Dreyer, K., ve Brink, J. (2018). Artificial Intelligence and Machine Learning in Radiology: Opportunities, Challenges, Pitfalls, and Criteria for Success. *Journal of the American College of Radiology*, *15*(3), 504–508. https://doi.org/10.1016/j.jacr.2017.12.026

Tokunaga, T., Hirose, O., Kawaguchi, S., Toyoshima, Y., Teramoto, T., Ikebata, H., Kuge, S., Ishihara, T., Iino, Y., ve Yoshida, R. (2014). Automated detection and tracking of many cells by using 4D live-cell imaging data. *Bioinformatics*, *30*(12), 43–51. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu271

Van Tomme, S. R., Storm, G., ve Hennink, W. E. (2008). In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *355*(1–2), 1–18. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.057

Vijayavenkataraman, S., Yan, W. C., Lu, W. F., Wang, C. H., ve Fuh, J. Y. H. (2018). 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *132*, 296–332. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.004

von Chamier, L., Laine, R. F., ve Henriques, R. (2019). Artificial intelligence for microscopy: What you should know. *Biochemical Society Transactions*, *47*(4), 1029–1040. https://doi.org/10.1042/BST20180391

Wang, H., ve Heilshorn, S. C. (2015). Adaptable Hydrogel Networks with Reversible Linkages for Tissue Engineering. *Advanced Materials*, *27*(25), 3717–3736. https://doi.org/10.1002/adma.201501558

Xing, F., Xie, Y., Su, H., Liu, F., ve Yang, L. (2017). *IEEE TRANSACTIONS ON NEURAL NETWORKS AND LEARNING SYSTEMS 1 Deep Learning in Microscopy Image Analysis: A Survey*. 1–19.

Xiong, Y., Mahmood, A., ve Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(2), 128–142. https://doi.org/10.1038/nrn3407

Yamada, K. M., Collins, J. W., Cruz Walma, D. A., Doyle, A. D., Morales, S. G., Lu, J., Matsumoto, K., Nazari, S. S., Sekiguchi, R., Shinsato, Y., ve Wang, S. (2019). Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis. *International Journal of Experimental Pathology*, *100*(3), 144–152. https://doi.org/10.1111/iep.12329

Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell*, *10*(6), 678–684. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005

Yamanaka, S. (2020). Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and

Challenges. *Cell Stem Cell*, *27*(4), 523–531. https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014

Yilmaz, S., Inandiklioglu, N., Yildizdas, D., Subasi, C., Acikalin, A., Kuyucu, Y., Bayram, I., Topak, A., Tanyeli, A., Duruksu, G., ve Karaoz, E. (2013). Mesenchymal Stem Cell: Does it Work in an Experimental Model with Acute Respiratory Distress Syndrome? *Stem Cell Reviews and Reports*, *9*(1), 80–92. https://doi.org/10.1007/s12015-012-9395-2

Yin, Z., Ker, D. F., Junkers, S., Kanade, T., Chen, M., Weiss, L., ve Campbell, P. (2011). Data-driven prediction of stem cell expansion cultures. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*, 3577–3580. https://doi.org/10.1109/IEMBS.2011.6090597

Young, S., Wong, M., Tabata, Y., ve Mikos, A. G. (2005). Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*, *109*(1–3), 256–274. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.023

Yu, C., ve Jiang, J. (2020). A perspective on using machine learning in 3D bioprinting. *International Journal of Bioprinting*, *6*(1), 4–11. https://doi.org/10.18063/ijb.v6i1.253

Yu, K. H., Beam, A. L., ve Kohane, I. S. (2018). Artificial intelligence in healthcare. *Nature Biomedical Engineering*, *2*(10), 719–731. https://doi.org/10.1038/s41551-018-0305-z

ZEISS. (2020). *ZEISS Lightsheet 7. Your light sheet microscope for Multiview imaging of living ve cleared specimens*. https://www.zeiss.com/microscopy/int/cmp/lsc/20/light-sheet-microscopy/new-zeiss-lightsheet-7.html?utm_medium=cpcveutm_campaign=light-sheet-2020veutm_source=googlevegclid=Cj0KCQiAoab_BRCxARIsANMx4S6RqWf7FxwebDv0qmx-1mV9p65irqU7uJ9eH6eFdApdRIO6K9Vv2EYaAumtEAL

Zhang, S., ve Wang, H. (2019). Current Progress in 3D Bioprinting of Tissue Analogs. *SLAS Technology*, *24*(1), 70–78. https://doi.org/10.1177/2472630318799971

Zhuang, P., Sun, A. X., An, J., Chua, C. K., ve Chew, S. Y. (2018). 3D neural tissue models: From spheroids to bioprinting. *Biomaterials*, *154*, 113–133. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.002

EKLER

EK - 1 : Örnek Excel datası

Aşağıda yapılan analizlerdeki sadece 1 deney grubunun (A549) bir kuyucuğunun bir kanalından (burada BF) elde edilmiş datalar verilmiştir. Çalışmamızda, benzer şekilde hazırlanmış 9 farklı deney düzeneğinden, her düzenekte, 8-24 arası kuyucuktan ve 3 farklı ışık kanalından elde dilmiş 600.000 satırdan fazla data bulunduğundan burada sadece aşağıdaki örnek verilmiştir.

Tablo 4: A549 numaralı deneyin Excel datası.

	Time	Hour	Scene	Area	Background	High	Normal	Konfluensi	Bright
Rectangle	1	0	1	614107,4513	23,21201956	169,9488617	61,83911877	90,9	66,6
Rectangle	2	0	1	614107,4513	23,17817261	165,8416075	65,98021988	90,9	65
Rectangle	3	0	1	614107,4513	24,9694858	162,9311375	67,09937673	90,2	63,9
Rectangle	4	0	1	614107,4513	25,62950139	160,7391794	68,63131925	89,9	63
Rectangle	5	0	1	614107,4513	26,90428064	157,3482297	70,74748961	89,4	61,7
Rectangle	6	1	1	614107,4513	28,27066742	157,178995	69,5503376	88,9	61,6
Rectangle	7	1	1	614107,4513	27,71697542	156,2257618	71,05726281	89,1	61,3
Rectangle	8	1	1	614107,4513	28,2673563	152,0493421	74,68330159	88,9	59,6
Rectangle	9	1	1	614107,4513	28,51274671	151,8010085	74,68624481	88,8	59,5
Rectangle	10	1	1	614107,4513	29,73822715	150,7466023	74,51517053	88,3	59,1
Rectangle	11	1	1	614107,4513	28,55284799	150,5556614	75,89149065	88,8	59
Rectangle	12	1	1	614107,4513	27,845741	148,5138071	78,64045187	89,1	58,2
Rectangle	13	1	1	614107,4513	28,0679536	146,2129501	80,71909626	89	57,3
Rectangle	14	1	1	614107,4513	28,47632445	144,1008267	82,42284886	88,8	56,5
Rectangle	15	1	1	614107,4513	27,89540772	143,8867079	83,21788435	89,1	56,4
Rectangle	16	1	1	614107,4513	29,76729138	142,6240694	82,6086392	88,3	55,9
Rectangle	17	1	1	614107,4513	29,23788089	139,9457453	85,81637379	88,5	54,9
Rectangle	18	2	1	614107,4513	29,40196503	138,1882791	87,40975589	88,5	54,2
Rectangle	19	2	1	614107,4513	29,27467105	138,8107687	86,91456025	88,5	54,4
Rectangle	20	2	1	614107,4513	29,26436981	138,521598	87,2140322	88,5	54,3
Rectangle	21	2	1	614107,4513	28,5326134	137,0992902	89,36809643	88,8	53,8
Rectangle	22	2	1	614107,4513	27,81778047	135,9757185	91,20650104	89,1	53,3
Rectangle	23	2	1	614107,4513	27,36894044	136,0665902	91,56446936	89,3	53,4
Rectangle	24	2	1	614107,4513	25,68395083	135,7476195	93,56842971	89,9	53,2
Rectangle	25	2	1	614107,4513	25,33959488	133,9640322	95,69637292	90,1	52,5
Rectangle	26	2	1	614107,4513	24,59459401	134,6049169	95,80048909	90,4	52,8
Rectangle	27	2	1	614107,4513	24,14170706	135,0831891	95,77510388	90,5	53
Rectangle	28	2	1	614107,4513	23,65202995	133,9511556	97,3968144	90,7	52,5
Rectangle	29	2	1	614107,4513	23,640625	132,3397464	99,01962864	90,7	51,9
Rectangle	30	3	1	614107,4513	23,79109678	129,2214119	101,9874913	90,7	50,7

Rectangle	31	3	1	614107,4513	23,33894564	128,5279172	103,1331371	90,8	50,4
Rectangle	32	3	1	614107,4513	23,61413608	128,7986929	102,5871711	90,7	50,5
Rectangle	33	3	1	614107,4513	23,33342711	129,2475329	102,41904	90,8	50,7
Rectangle	34	3	1	614107,4513	23,24844183	125,5762422	106,175316	90,9	49,2
Rectangle	35	3	1	614107,4513	22,32390495	125,0321157	107,6439794	91,2	49
Rectangle	36	3	1	614107,4513	22,5998312	125,0151922	107,3849766	91,1	49
Rectangle	37	3	1	614107,4513	23,07295274	125,7215634	106,2054839	91	49,3
Rectangle	38	3	1	614107,4513	22,65317694	124,3467149	108,0001082	91,1	48,8
Rectangle	39	3	1	614107,4513	21,89566742	122,8283847	110,2759479	91,4	48,2
Rectangle	40	3	1	614107,4513	21,37655817	123,6197412	110,0037007	91,6	48,5
Rectangle	41	3	1	614107,4513	21,01307133	123,5145213	110,4724074	91,8	48,4
Rectangle	42	4	1	614107,4513	21,31916551	121,8199662	111,8608682	91,6	47,8
Rectangle	43	4	1	614107,4513	21,24080246	121,1448667	112,6143309	91,7	47,5
Rectangle	44	4	1	614107,4513	21,67419062	119,7736972	113,5521122	91,5	47
Rectangle	45	4	1	614107,4513	21,3154865	117,5552502	116,1292633	91,6	46,1
Rectangle	46	4	1	614107,4513	20,10913695	119,2571633	115,6336998	92,1	46,8
Rectangle	47	4	1	614107,4513	20,04659366	118,6335699	116,3198364	92,1	46,5
Rectangle	48	4	1	614107,4513	20,86223165	117,7414084	116,3963599	91,8	46,2
Rectangle	49	4	1	614107,4513	20,41449533	117,1237015	117,4618032	92	45,9
Rectangle	50	4	1	614107,4513	20,31810509	116,4743551	118,2075398	92	45,7
Rectangle	51	4	1	614107,4513	20,53847819	112,54259	121,9189318	91,9	44,1
Rectangle	52	4	1	614107,4513	19,79568473	113,1345438	122,0697715	92,2	44,4
Rectangle	53	4	1	614107,4513	18,90977753	119,2781337	116,8120888	92,6	46,8
Rectangle	54	5	1	614107,4513	19,00212084	116,2609721	119,736907	92,5	45,6
Rectangle	55	5	1	614107,4513	18,84171572	115,3872057	120,7710786	92,6	45,2
Rectangle	56	5	1	614107,4513	18,25859159	116,160535	120,5808734	92,8	45,6
Rectangle	57	5	1	614107,4513	18,48705852	113,8346607	122,6782808	92,8	44,6
Rectangle	58	5	1	614107,4513	18,13571243	114,4575182	122,4067694	92,9	44,9
Rectangle	59	5	1	614107,4513	17,88296399	113,1316006	123,9854354	93	44,4
Rectangle	60	5	1	614107,4513	16,66447368	111,5507271	126,7847992	93,5	43,7
Rectangle	61	5	1	614107,4513	15,97870499	109,6990781	129,3222169	93,7	43
Rectangle	62	5	1	614107,4513	16,47426852	110,6813755	127,844356	93,5	43,4
Rectangle	63	5	1	614107,4513	17,0882964	113,0278523	124,8838513	93,3	44,3
Rectangle	64	5	1	614107,4513	17,99407029	112,2000736	124,8058561	92,9	44
Rectangle	65	5	1	614107,4513	17,71409713	110,8421485	126,4437543	93,1	43,5
Rectangle	66	6	1	614107,4513	17,38740045	115,8919668	121,7206328	93,2	45,4
Rectangle	67	6	1	614107,4513	16,66336998	115,5457713	122,7908587	93,5	45,3
Rectangle	68	6	1	614107,4513	16,44483639	114,8577952	123,6973684	93,6	45
Rectangle	69	6	1	614107,4513	16,32122143	115,045425	123,6333535	93,6	45,1
Rectangle	70	6	1	614107,4513	17,14679276	110,2461479	127,6070594	93,3	43,2
Rectangle	71	6	1	614107,4513	18,25932739	109,4551593	127,2855133	92,8	42,9
Rectangle	72	6	1	614107,4513	18,75636253	111,0268352	125,2168023	92,6	43,5
Rectangle	73	6	1	614107,4513	17,77075398	110,3079553	126,9212907	93	43,3
Rectangle	74	6	1	614107,4513	19,41417071	109,710483	125,8753463	92,4	43

Rectangle	75	6	1	614107,4513	19,92334661	111,0963686	123,9802848	92,2	43,6
Rectangle	76	6	1	614107,4513	19,99950225	107,5170533	127,4834444	92,2	42,2
Rectangle	77	6	1	614107,4513	19,38621018	106,9133267	128,7004631	92,4	41,9
Rectangle	78	7	1	614107,4513	19,72136859	107,4011643	127,8774671	92,3	42,1
Rectangle	79	7	1	614107,4513	19,64263764	109,5276359	125,8297265	92,3	43
Rectangle	80	7	1	614107,4513	19,40975589	107,9132834	127,6769607	92,4	42,3
Rectangle	81	7	1	614107,4513	19,38657808	108,3617555	127,2516664	92,4	42,5
Rectangle	82	7	1	614107,4513	20,11097645	107,2698234	127,6192001	92,1	42,1
Rectangle	83	7	1	614107,4513	19,94946762	108,6402571	126,4102753	92,2	42,6
Rectangle	84	7	1	614107,4513	19,27767919	107,6936461	128,0286747	92,4	42,2
Rectangle	85	7	1	614107,4513	20,45570031	106,9401835	127,6041162	92	41,9
Rectangle	86	7	1	614107,4513	20,3199446	106,8489439	127,8311115	92	41,9
Rectangle	87	7	1	614107,4513	20,32656683	108,2572715	126,4161617	92	42,5
Rectangle	88	7	1	614107,4513	20,22980869	107,8065919	126,9635994	92,1	42,3
Rectangle	89	7	1	614107,4513	21,3382964	105,9623009	127,6994027	91,6	41,6
Rectangle	90	8	1	614107,4513	22,83087344	106,8555661	125,3135604	91	41,9
Rectangle	91	8	1	614107,4513	22,0479787	107,5196286	125,4323927	91,4	42,2
Rectangle	92	8	1	614107,4513	22,00898113	106,4420447	126,5489742	91,4	41,7
Rectangle	93	8	1	614107,4513	22,866192	106,6024498	125,5313582	91	41,8
Rectangle	94	8	1	614107,4513	23,5085483	105,7463426	125,7451091	90,8	41,5
Rectangle	95	8	1	614107,4513	23,61119287	105,456804	125,9320031	90,7	41,4
Rectangle	96	8	1	614107,4513	24,1060206	105,6227277	125,2712517	90,5	41,4
Rectangle	97	8	1	614107,4513	24,47024325	106,942023	123,5877337	90,4	41,9
Rectangle	98	8	1	614107,4513	22,45377424	105,984375	126,5618508	91,2	41,6
Rectangle	99	8	1	614107,4513	23,00489093	106,1999654	125,7951437	91	41,6
Rectangle	100	8	1	614107,4513	23,77196589	107,8080635	123,4199706	90,7	42,3
Rectangle	101	8	1	614107,4513	24,07106994	108,105696	122,8232341	90,6	42,4
Rectangle	102	9	1	614107,4513	24,57803843	107,2341369	123,1878246	90,4	42,1
Rectangle	103	9	1	614107,4513	25,56511859	107,1211911	122,3136903	90	42
Rectangle	104	9	1	614107,4513	25,8984375	106,0616343	123,0399282	89,8	41,6
Rectangle	105	9	1	614107,4513	26,94474983	103,2218014	124,8334488	89,4	40,5
Rectangle	106	9	1	614107,4513	27,59336046	100,6961565	126,710483	89,2	39,5
Rectangle	107	9	1	614107,4513	27,77620758	102,3910795	124,832713	89,1	40,2
Rectangle	108	9	1	614107,4513	28,13895862	105,2154605	121,6455809	89	41,3
Rectangle	109	9	1	614107,4513	27,92447195	103,9885085	123,0870196	89	40,8
Rectangle	110	9	1	614107,4513	28,57013937	102,8906899	123,5391707	88,8	40,3
Rectangle	111	9	1	614107,4513	28,58779865	102,0147161	124,3974853	88,8	40
Rectangle	112	9	1	614107,4513	28,33578601	102,9885518	123,6756622	88,9	40,4
Rectangle	113	9	1	614107,4513	30,33312413	103,4594659	121,20741	88,1	40,6
Rectangle	114	10	1	614107,4513	30,32723771	103,6342192	121,0385431	88,1	40,6
Rectangle	115	10	1	614107,4513	29,14516967	103,1978878	122,6569425	88,6	40,5
Rectangle	116	10	1	614107,4513	29,04988314	103,5536487	122,3964681	88,6	40,6
Rectangle	117	10	1	614107,4513	30,47550208	100,9452259	123,579272	88	39,6
Rectangle	118	10	1	614107,4513	31,40813279	102,6990132	120,8928541	87,7	40,3

Rectangle	119	10	1	614107,4513	30,45600329	103,7497403	120,7942564	88,1	40,7
Rectangle	120	10	1	614107,4513	29,00794235	104,0348641	121,9571936	88,6	40,8
Rectangle	121	10	1	614107,4513	29,31624394	103,5996364	122,0841196	88,5	40,6
Rectangle	122	10	1	614107,4513	29,98067434	104,7886946	120,2306311	88,2	41,1
Rectangle	123	10	1	614107,4513	29,94351627	103,1143741	121,9421096	88,3	40,4
Rectangle	124	10	1	614107,4513	29,55795533	100,7899714	124,6520732	88,4	39,5
Rectangle	125	10	1	614107,4513	28,90198667	102,2968966	123,8011167	88,7	40,1
Rectangle	126	11	1	614107,4513	28,77432479	103,2019347	123,0237405	88,7	40,5
Rectangle	127	11	1	614107,4513	29,241192	103,0643395	122,6944685	88,5	40,4
Rectangle	128	11	1	614107,4513	28,76623096	102,7313885	123,5023805	88,7	40,3
Rectangle	129	11	1	614107,4513	29,82541984	103,0621321	122,1124481	88,3	40,4
Rectangle	130	11	1	614107,4513	31,31873269	104,1684124	119,5128549	87,7	40,9
Rectangle	131	11	1	614107,4513	32,06557306	102,0820421	120,8523849	87,4	40
Rectangle	132	11	1	614107,4513	33,20606821	100,7152874	121,0786444	87	39,5
Rectangle	133	11	1	614107,4513	33,6453428	99,18444858	122,1702086	86,8	38,9
Rectangle	134	11	1	614107,4513	35,11768525	99,13331025	120,7490045	86,2	38,9
Rectangle	135	11	1	614107,4513	36,06871105	99,01447801	119,9168109	85,9	38,8
Rectangle	136	11	1	614107,4513	35,28728792	99,71717019	119,9955419	86,2	39,1
Rectangle	137	11	1	614107,4513	34,74536877	98,62450225	121,630129	86,4	38,7
Rectangle	138	12	1	614107,4513	34,72734159	99,09063366	121,1820248	86,4	38,9
Rectangle	139	12	1	614107,4513	35,14307046	97,91960267	121,9373269	86,2	38,4
Rectangle	140	12	1	614107,4513	34,8630973	97,15914993	122,9777528	86,3	38,1
Rectangle	141	12	1	614107,4513	36,18496797	96,80559643	122,0094356	85,8	38
Rectangle	142	12	1	614107,4513	36,91782808	95,67098771	122,4111842	85,5	37,5
Rectangle	143	12	1	614107,4513	37,49948061	93,63575571	123,8647637	85,3	36,7
Rectangle	144	12	1	614107,4513	35,62171053	93,18875519	126,1895343	86	36,5
Rectangle	145	12	1	614107,4513	37,85892053	111,7692607	105,3718187	85,2	43,8
Rectangle	146	12	1	614107,4513	39,68224117	107,8937846	107,4239742	84,4	42,3
Rectangle	147	12	1	614107,4513	40,59169408	108,5751385	105,8331674	84,1	42,6
Rectangle	148	12	1	614107,4513	40,51517053	110,5220741	103,9627554	84,1	43,3
Rectangle	149	12	1	614107,4513	38,25846174	110,6747533	106,066785	85	43,4
Rectangle	150	13	1	614107,4513	36,33065703	106,2360197	112,4333232	85,8	41,7
Rectangle	151	13	1	614107,4513	35,30972992	98,36844269	121,3218274	86,2	38,6
Rectangle	152	13	1	614107,4513	35,66365132	88,97775277	130,3585959	86	34,9
Rectangle	153	13	1	614107,4513	35,62428584	79,75151489	139,6241993	86	31,3
Rectangle	154	13	1	614107,4513	36,32035578	73,86251298	144,8171312	85,8	29
Rectangle	155	13	1	614107,4513	36,52049429	70,49437327	147,9851324	85,7	27,6
Rectangle	156	13	1	614107,4513	36,63196849	68,67988227	149,6881492	85,6	26,9
Rectangle	157	13	1	614107,4513	37,51456458	68,00662223	149,4788132	85,3	26,7
Rectangle	158	13	1	614107,4513	37,18087777	68,03163954	149,7874827	85,4	26,7
Rectangle	159	13	1	614107,4513	37,1654259	67,70383916	150,1307349	85,4	26,6
Rectangle	160	13	1	614107,4513	37,23643092	68,15819771	149,6053714	85,4	26,7
Rectangle	161	13	1	614107,4513	37,47703861	68,62616863	148,8967928	85,3	26,9
Rectangle	162	14	1	614107,4513	37,68012033	67,30687327	150,0130064	85,2	26,4

Rectangle	163	14	1	614107,4513	37,19154692	67,08355696	150,7248961	85,4	26,3
Rectangle	164	14	1	614107,4513	37,63302891	68,81085526	148,5561158	85,2	27
Rectangle	165	14	1	614107,4513	37,50978186	68,08314578	149,4070724	85,3	26,7
Rectangle	166	14	1	614107,4513	37,49285838	68,89547265	148,611669	85,3	27
Rectangle	167	14	1	614107,4513	37,50683864	69,57314751	147,9200139	85,3	27,3
Rectangle	168	14	1	614107,4513	37,15365305	69,32297438	148,5233726	85,4	27,2
Rectangle	169	14	1	614107,4513	37,4523892	69,65371797	147,8938928	85,3	27,3
Rectangle	170	14	1	614107,4513	37,15144564	69,9690097	147,8795447	85,4	27,4
Rectangle	171	14	1	614107,4513	36,84535145	71,11612708	147,0385215	85,6	27,9
Rectangle	172	14	1	614107,4513	37,46379415	70,457951	147,0782548	85,3	27,6
Rectangle	173	14	1	614107,4513	37,07308258	72,51783241	145,409085	85,5	28,4
Rectangle	174	15	1	614107,4513	36,90826264	72,09658501	145,9951524	85,5	28,3
Rectangle	175	15	1	614107,4513	36,71290686	71,87768352	146,4094096	85,6	28,2
Rectangle	176	15	1	614107,4513	36,74013158	71,80373528	146,4561331	85,6	28,2
Rectangle	177	15	1	614107,4513	37,04880107	72,1168196	145,8343793	85,5	28,3
Rectangle	178	15	1	614107,4513	36,78244027	72,85004761	145,3675121	85,6	28,6
Rectangle	179	15	1	614107,4513	36,44249913	73,4007964	145,1567045	85,7	28,8
Rectangle	180	15	1	614107,4513	35,94399238	74,39192348	144,6640841	85,9	29,2
Rectangle	181	15	1	614107,4513	35,98556527	74,31760734	144,6968274	85,9	29,1
Rectangle	182	15	1	614107,4513	35,79499221	74,43975069	144,7652571	86	29,2
Rectangle	183	15	1	614107,4513	35,29611756	75,5482384	144,155644	86,2	29,6
Rectangle	184	15	1	614107,4513	35,75967365	75,64242123	143,5979051	86	29,7
Rectangle	185	15	1	614107,4513	35,26778913	74,97063279	144,7615781	86,2	29,4
Rectangle	186	16	1	614107,4513	35,31892746	76,77886946	142,9022031	86,1	30,1
Rectangle	187	16	1	614107,4513	35,92228618	76,83037569	142,2473381	85,9	30,1
Rectangle	188	16	1	614107,4513	35,13460873	77,08606735	142,7793239	86,2	30,2
Rectangle	189	16	1	614107,4513	34,72403047	77,90464855	142,371321	86,4	30,6
Rectangle	190	16	1	614107,4513	34,63168715	78,19271555	142,1755973	86,4	30,7
Rectangle	191	16	1	614107,4513	35,03269997	78,24679709	141,7205029	86,3	30,7
Rectangle	192	16	1	614107,4513	34,19719529	78,81446936	141,9883354	86,6	30,9
Rectangle	193	16	1	614107,4513	34,41204986	79,07899065	141,5089595	86,5	31
Rectangle	194	16	1	614107,4513	34,1769607	79,96416205	140,8588773	86,6	31,4
Rectangle	195	16	1	614107,4513	34,54228705	79,92442867	140,5332843	86,5	31,3
Rectangle	196	16	1	614107,4513	34,10705938	80,1528956	140,740045	86,6	31,4
Rectangle	197	16	1	614107,4513	33,91685422	80,23125866	140,8518871	86,7	31,5
Rectangle	198	17	1	614107,4513	33,64203168	80,96411877	140,3938495	86,8	31,8
Rectangle	199	17	1	614107,4513	33,93708882	80,96448667	140,0984245	86,7	31,8
Rectangle	200	17	1	614107,4513	33,50848338	81,8559124	139,6356042	86,9	32,1
Rectangle	201	17	1	614107,4513	33,01770256	82,59281943	139,389478	87,1	32,4
Rectangle	202	17	1	614107,4513	32,52618594	82,23448321	140,2393309	87,2	32,2
Rectangle	203	17	1	614107,4513	32,99746797	82,29702649	139,7055055	87,1	32,3
Rectangle	204	17	1	614107,4513	32,81793196	83,07035578	139,1117123	87,1	32,6
Rectangle	205	17	1	614107,4513	32,70903307	83,37461046	138,9163565	87,2	32,7
Rectangle	206	17	1	614107,4513	32,92168023	83,95184816	138,1264716	87,1	32,9

Rectangle	207	17	1	614107,4513	32,78849983	83,90622836	138,3052718	87,1	32,9
Rectangle	208	17	1	614107,4513	32,41875866	85,03421485	137,5470265	87,3	33,3
Rectangle	209	17	1	614107,4513	32,36541292	85,54817348	137,0864136	87,3	33,5
Rectangle	210	18	1	614107,4513	32,3172178	86,07243334	136,6103489	87,3	33,8
Rectangle	211	18	1	614107,4513	32,57769217	85,96978878	136,452519	87,2	33,7
Rectangle	212	18	1	614107,4513	32,05527181	86,36417936	136,5805488	87,4	33,9
Rectangle	213	18	1	614107,4513	32,57879588	86,55107341	135,8701307	87,2	33,9
Rectangle	214	18	1	614107,4513	32,36872403	86,60883397	136,022442	87,3	34
Rectangle	215	18	1	614107,4513	31,86653826	87,02529865	136,1081631	87,5	34,1
Rectangle	216	18	1	614107,4513	31,9191482	86,75562673	136,3252251	87,5	34
Rectangle	217	18	1	614107,4513	31,72232081	87,34905211	135,9286271	87,6	34,3
Rectangle	218	18	1	614107,4513	31,67964422	88,4086089	134,9117469	87,6	34,7
Rectangle	219	18	1	614107,4513	31,43682912	88,37696936	135,1862015	87,7	34,7
Rectangle	220	18	1	614107,4513	31,68074792	88,48329294	134,8359591	87,6	34,7
Rectangle	221	18	1	614107,4513	31,23117209	88,21325312	135,5555748	87,8	34,6
Rectangle	222	19	1	614107,4513	31,19658934	89,19371105	134,6096996	87,8	35
Rectangle	223	19	1	614107,4513	30,97216932	89,26103705	134,7667936	87,9	35
Rectangle	224	19	1	614107,4513	31,07407808	89,6936894	134,2322325	87,8	35,2
Rectangle	225	19	1	614107,4513	30,44165512	90,60203861	133,9563063	88,1	35,5
Rectangle	226	19	1	614107,4513	30,56637379	90,86729571	133,5663305	88	35,6
Rectangle	227	19	1	614107,4513	30,72972213	90,64986582	133,620412	87,9	35,5
Rectangle	228	19	1	614107,4513	30,34011427	91,56888418	133,0910016	88,1	35,9
Rectangle	229	19	1	614107,4513	30,00753116	91,38162223	133,6108466	88,2	35,8
Rectangle	230	19	1	614107,4513	29,76692348	91,67704726	133,5560293	88,3	36
Rectangle	231	19	1	614107,4513	30,1267313	91,96585007	132,9074186	88,2	36,1
Rectangle	232	19	1	614107,4513	30,35630194	92,37348511	132,270213	88,1	36,2
Rectangle	233	19	1	614107,4513	30,00605956	93,34952822	131,6444122	88,2	36,6
Rectangle	234	20	1	614107,4513	29,92291378	93,03791551	132,0391707	88,3	36,5
Rectangle	235	20	1	614107,4513	29,14516967	93,36240478	132,4924256	88,6	36,6
Rectangle	236	20	1	614107,4513	29,33905384	93,42163695	132,2393092	88,5	36,6
Rectangle	237	20	1	614107,4513	28,7327519	93,68873355	132,5785145	88,7	36,7
Rectangle	238	20	1	614107,4513	29,13744373	93,8535535	132,0090028	88,6	36,8
Rectangle	239	20	1	614107,4513	29,08189058	94,43520602	131,4829034	88,6	37
Rectangle	240	20	1	614107,4513	29,46892313	93,78990651	131,7411704	88,4	36,8
Rectangle	241	20	1	614107,4513	28,91375952	95,63272593	130,4535145	88,7	37,5
Rectangle	242	20	1	614107,4513	29,07122143	94,79685336	131,1319252	88,6	37,2
Rectangle	243	20	1	614107,4513	28,70552718	94,99110544	131,3033674	88,7	37,3
Rectangle	244	20	1	614107,4513	28,39612188	95,3814491	131,222429	88,9	37,4
Rectangle	245	20	1	614107,4513	28,09407462	96,27692175	130,6290036	89	37,8
Rectangle	246	21	1	614107,4513	27,98076091	96,6220135	130,3972256	89	37,9
Rectangle	247	21	1	614107,4513	28,52709488	96,02858812	130,444317	88,8	37,7
Rectangle	248	21	1	614107,4513	28,16140062	96,95901143	129,879588	89	38
Rectangle	249	21	1	614107,4513	27,34392313	96,67241603	130,9836608	89,3	37,9
Rectangle	250	21	1	614107,4513	27,77841499	96,6878679	130,5337171	89,1	37,9

Rectangle	251	21	1	614107,4513	27,92962258	96,88175208	130,1886253	89	38
Rectangle	252	21	1	614107,4513	28,31518352	97,48878982	129,1960267	88,9	38,2
Rectangle	253	21	1	614107,4513	27,25599463	97,9280644	129,815941	89,3	38,4
Rectangle	254	21	1	614107,4513	27,94544235	97,82358033	129,2309773	89	38,4
Rectangle	255	21	1	614107,4513	27,45429363	98,23195118	129,3137552	89,2	38,5
Rectangle	256	21	1	614107,4513	27,32699965	98,45416378	129,2188366	89,3	38,6
Rectangle	257	21	1	614107,4513	27,74971866	99,07187067	128,1784107	89,1	38,9
Rectangle	258	22	1	614107,4513	27,20264889	98,69550727	129,1018438	89,3	38,7
Rectangle	259	22	1	614107,4513	27,32184903	99,5652268	128,1129242	89,3	39
Rectangle	260	22	1	614107,4513	27,21846866	99,31836479	128,4631666	89,3	38,9
Rectangle	261	22	1	614107,4513	27,16953774	99,33933518	128,4911271	89,3	39
Rectangle	262	22	1	614107,4513	27,12023892	99,75359245	128,1261686	89,4	39,1
Rectangle	263	22	1	614107,4513	27,17763158	99,8087777	128,0135907	89,3	39,1
Rectangle	264	22	1	614107,4513	26,61915686	99,95851368	128,4223295	89,6	39,2
Rectangle	265	22	1	614107,4513	26,52828515	100,2719659	128,199749	89,6	39,3
Rectangle	266	22	1	614107,4513	26,67507791	100,9080679	127,4168542	89,5	39,6
Rectangle	267	22	1	614107,4513	26,43483812	101,1747966	127,3903653	89,6	39,7
Rectangle	268	22	1	614107,4513	26,22623788	100,6619417	128,1118205	89,7	39,5
Rectangle	269	22	1	614107,4513	25,97496105	102,2453904	126,7796485	89,8	40,1
Rectangle	270	23	1	614107,4513	25,88997576	101,7071503	127,402874	89,8	39,9
Rectangle	271	23	1	614107,4513	26,33697628	101,2995152	127,3635085	89,7	39,7
Rectangle	272	23	1	614107,4513	26,1865045	101,6527008	127,1607947	89,7	39,9
Rectangle	273	23	1	614107,4513	25,92308691	100,9415469	128,1353662	89,8	39,6
Rectangle	274	23	1	614107,4513	25,51618767	102,3609115	127,1229008	90	40,1
Rectangle	275	23	1	614107,4513	25,71375087	101,9205332	127,3657159	89,9	40
Rectangle	276	23	1	614107,4513	25,68873355	101,5526316	127,7586349	89,9	39,8
Rectangle	277	23	1	614107,4513	25,78659539	102,5614179	126,6519867	89,9	40,2
Rectangle	278	23	1	614107,4513	25,57909886	102,8836998	126,5372014	90	40,3
Rectangle	279	23	1	614107,4513	26,01027961	102,6854008	126,3043196	89,8	40,3
Rectangle	280	23	1	614107,4513	25,78365218	102,2200052	126,9963426	89,9	40,1
Rectangle	281	23	1	614107,4513	25,64017053	103,4079597	125,9518698	89,9	40,6
Rectangle	282	24	1	614107,4513	24,95918456	102,5603142	127,4805012	90,2	40,2
Rectangle	283	24	1	614107,4513	25,29103186	103,5462907	126,1626775	90,1	40,6
Rectangle	284	24	1	614107,4513	25,4113357	104,0562024	125,5324619	90	40,8
Rectangle	285	24	1	614107,4513	24,85359678	104,1566395	125,9897637	90,3	40,8
Rectangle	286	24	1	614107,4513	25,13945637	104,1386124	125,7219313	90,1	40,8
Rectangle	287	24	1	614107,4513	24,62954467	104,2217581	126,1486972	90,3	40,9

İNTİHAL RAPORU

Ceren Tez 1

ORİJİNALLİK RAPORU

%4	%3	%1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	saglikbilimleri.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	AVCILAR, Hüseyin, SARAYMEN, Berkay, ÖZTURAN, Okan Özgür and KÖKER, Mustafa Yavuz. "Embriyonik Kök Hücreler ve İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler", Bilimsel Tıp, 2018. Yayın	<%1
4	blog.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.nanodev.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	inba.info İnternet Kaynağı	<%1
7	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	