

T.C. DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

**ÜÇ BOYUTLU DERMAL FİBROBLAST İÇEREN
TERMOPLASTİK POLİÜRETAN VE POLİDİMETİL SİLOKSAN
DOKU İSKELELERİNİN YARA YATAĞINDA OLUŞTURDUĞU
MİKROVASKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Safa Eren ATALMIŞ

İZMİR 2025

T.C. DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

**ÜÇ BOYUTLU DERMAL FİBROBLAST İÇEREN
TERMOPLASTİK POLİÜRETAN VE POLİDİMETİL SİLOKSAN
DOKU İSKELELERİNİN YARA YATAĞINDA OLUŞTURDUĞU
MİKROVASKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Safa Eren ATALMIŞ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

İZMİR 2025

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim süresince kazanımlarımda büyük pay sahibi olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım için kendimi şanslı hissettiğim başta danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Yılmaz olmak üzere hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Fatih Alp Öztürk ve Dr. Öğr. Üyesi Alper Geyik'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık tezimin cerrahi ve değerlendirme aşamalarının gerçekleşmesinde büyük yardımları olan, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım Dokuz Eylül Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi asistan ekibine ve kliniğin diğer sağlık çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Son olarak eğitim ve meslek hayatımda gelişimimi maddi ve manevi olarak sürekli destekleyen annem ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarken tüm imkanlarımı ve yeteneklerimi borçlu olduğum maalesef bu borcu ödeme imkânım kalmayan babamı yad ederim.

Dr. Safa Eren ATALMIŞ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Yara İyileşmesi	6
2.1.1. Koagülasyon ve Hemostaz Fazı	7
2.1.2. Enflamatuar Faz	8
2.1.3. Proliferasyon Fazı	11
2.1.4. Yeniden Şekillenme (Remodelling) ve Matürasyon Fazı	15
2.2. Mikrotia Rekonstrüksiyonunda Kullanılan Ameliyat Teknikleri.....	15
2.2.1. Otojen Kostal Kıkırdak Grefti ile Rekonstrüksiyon	16
2.2.2. Kıkırdak Grefti	20
2.2.3. Epitez ile Yapılan Kulak Rekonstrüksiyonu	21
2.2.4. Alloplastik Materyaller ile Rekonstrüksiyon	22
2.2.4. 3D Biyobaskı ile Doku Mühendisliği Yaklaşımları	26
2.2.5. Kişiyeye Özel Dış Kulak Rekonstrüksiyonunda 3D Baskı ile Üretilen PDMS ve TPU İçeren Kompozit Doku İskeleleri.....	29
2.3.Doku iskelelerine hücre ve biyolojik bileşen eklenmesi.....	31
3.MATERYAL ve METOT.....	35
4.BULGULAR.....	62
5. TARTIŞMA.....	77
6. SONUÇLAR.....	94

KAYNAKLAR	95
EKLER	110



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: TPU, PDMS ve PDMS-TPU doku iskelelerinin sertlik, kohezyon ve yayılabilirlik değerleri.	45
Tablo 2: Deney gruplarının operasyon öncesi ve sonrasındaki dönemdeki tartımlarının ortalama değerleri.....	56
Tablo 3: Skafold Hücresiz ve Skafold Hücreli doku iskelelerinde 8. ve 12. haftalarda pozitif CD31 ve VEGF vasküler yapı sayılarının değerlendirilmesi	76



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Hemostaz mekanizmasının şematik olarak gösterimi.....	8
Şekil 2: Yara iyileşmesinin enflamatuvar fazı.	9
Şekil 3: Yara iyileşmesinde görev alan hücreler ve etkileri.....	10
Şekil 4: Yara iyileşmesinin proliferasyon fazı.	13
Şekil 5: 3D Modellenmiş PDMS kalıp.....	37
Şekil 6: PLA kalıptan PDMS'in çıkarılması işleminin sonucu elde edilen yapı.	38
Şekil 7: PVA kalıp ve PDMS uygulaması.	38
Şekil 8: PVA kalıbından çıkan PDMS doku iskelesi.	39
Şekil 9: Elde edilen TPU doku iskeleleri.	40
Şekil 10: Üretilen PDMS-TPU doku iskelelerinin a)yandan b)üstten ve c)alttan görüntüsü.....	41
Şekil 11: TPU, PDMS ve PDMS-TPU doku iskelesinin üstten (a) ve alttan (b) SEM görüntüleri.	42
Şekil 12: TPU ve PDMS doku iskelelerinin FTIR spektrumları.....	43
Şekil 13: TPU, PDMS ve PDMS-TPU doku iskelelerinin kuvvet-zaman grafikleri.	44
Şekil 14: PDMS, TPU, PDMS+TPU malzemelerinin mekanik özellikleri.	45
Şekil 15: Rat dermal fibroblast preparatı.	46
Şekil 17: Doku iskeleleri.....	49
Şekil 18: İşlem öncesi tıraşlama.....	50
Şekil 19: Cerrahi sahanın betadin ile temizliği.	50
Şekil 20: Cerrahi işlem için kullanılan cerrahi set.	51
Şekil 21: Doku iskelelerinin implantasyonu öncesi cerrahi insizyon.	52
Şekil 22: PDMS-TPU kompozit doku iskelesinin horizontal olarak oluşturulan subkütan cebe yerleştirilmesi.	53
Şekil 23: İnsizyonun kapatılması.	54
Şekil 24: İşlem sonrası idame sıvının subdermal olarak uygulanması.	55

Şekil 25: Deney gruplarının operasyon öncesi ve sonrasındaki dönemde tartımlarının ortalama değerlerinin çizgi grafiği halinde gösterilmesi.....	56
Şekil 26: Doku örneklerinin alınmasından önce inhale anestezi altında cerrahi saha temizliği.....	57
Şekil 27: Doku örneklerinin alınması.	58
Şekil 28: Örneklerin alınması-doku iskelelerinin kapsül benzeri yapıyla kaplanmış olduğu görülmektedir.	59
Şekil 29: Elde edilen örnekler.	60
Şekil 30: 8. hafta S doku iskelelerinde H&E boyaması	62
Şekil 31: 8. hafta SH doku iskelelerinde H&E boyaması	62
Şekil 32: 12. hafta S doku iskelelerinde H&E boyaması	63
Şekil 33: 12. hafta S doku iskelelerinde H&E boyaması	63
Şekil 34: 12. hafta SH doku iskelelerinde H&E boyaması	64
Şekil 35: 12. hafta SH doku iskelelerinde H&E boyaması	64
Şekil 36: 8. hafta S doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması	65
Şekil 37: 8. hafta S doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması	66
Şekil 38: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması	66
Şekil 39: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması	67
Şekil 40: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması	67
Şekil 41: 8. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	68
Şekil 42: 8. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	69
Şekil 43: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	70
Şekil 44: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	70

Şekil 45: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	71
Şekil 46: 12. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması	72
Şekil 47: 12. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması	72
Şekil 48: 12. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	73
Şekil 49: 12. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	73
Şekil 50: 12. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	74
Şekil 51: 12. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	74
Şekil 52: 12. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması	75
Şekil 53: S ve SH doku iskelelerinde 8. ve 12. haftalarda CD31 ve VEGF antikorların immünohistokimyasal skorlanması	76

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

3D	: Üç Boyutlu
ABC	: Avidinbiyotin-Peroksidaz Yöntemi
ABS	: Akrilonitril-Bütadien-Stiren
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
BYM	: Birleşim Yığılma Modelleme
CD31	: Cluster of Differentiation 31
CGF	: Konsantre Büyüme Faktörü
DAB	: 3,3' Diaminobenzidine
FDM	: Kaynaşmış Biriktirme Modelleme
GFA	: Glial Fibrilik Asit
GO	: Grafen Oksit
H&E	: Hematoksilen-Eozin
IGF-1	: Insulin-Like Growth Factor 1
IL-1	: İnterlökin-1
PCL	: Poli-ε-Kaprolakton
PDMS	: Polidimetil Siloksan
PEA-s	: Süngerimsi Poliester
PRP	: Trombositten Zengin Plazma
SOX-9	: SRY-box Transkripsiyon Faktörü 9
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TGF-β(TBF-β)	: Transforming Growth Factor-beta
TPU	: Termoplastik Poliüretan
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
PLA	: Polilaktik asit
PGA	: Poliglikolik asit

ÖZET

Üç Boyutlu Dermal Fibroblast İçeren Termoplastik Poliüretan ve Polidimetil Siloksan Doku İskelelerinin Yara Yatağında Oluşturduğu Mikrovasküler Değişikliklerin İncelenmesi

Amaç; Bu çalışma, 3D baskı ile PDMS ve TPU içeren ve dermal fibroblast ile kaplanan kompozit doku iskelelerinin in vitro ve in vivo biyouyumluluklarını değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bu sayede, dış kulak rekonstrüksiyonunda uzun ömürlü ve yüksek biyomekanik dayanıklılığa sahip çözümler sunulması hedeflenmektedir. Oluşturulması hedeflenen PDMS-TPU kompozit doku iskelelerinin yara yatağı ve yerleştirildiği doku ile uyumu araştırılacaktır.

Materyal ve Metot; Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 02/10/2024 tarih ve 04/17 sayılı etik kurul onayı alındıktan sonra başlanmıştır. Çalışmada 6 adet 250-300 gram ağırlığında wistar albino erkek rat kullanıldı. Denekler cilt altı doku planına dermal fibroblast ile kaplanmamış PDMS-TPU kompozit doku iskelesinin yerleştirildiği (Skafold hücresiz) ve dermal fibroblast ile kaplanmış PDMS-TPU kompozit doku iskelesinin yerleştirildiği (Skafold Hücreli) gruplar olarak ikiye ayrıldı. 8. hafta ve 12. haftada sakrifiye edilen deneklerden elde edilen doku iskeleleri anti-CD31 ve anti-VEGF boyamaları ile histolojik olarak incelendi.

Bulgular; CD31 pozitif vasküler yapılar açısından 12. haftada skafold hücresiz grupta $16,33 \pm 3,06$ adet, skafold hücreli grupta ise $36,33 \pm 4,16$ adet olarak ölçülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,043$). VEGF pozitif vasküler yapılar açısından, 8. haftada skafold hücresiz grupta ortalama $16,00 \pm 12,29$ adet, skafold hücreli grupta ise $37,67 \pm 3,06$ adet damar yapısı mevcut olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,041$). İmmünohistokimyasal olarak CD31 ve VEGF antikörlerinin immünreaktivite şiddetlerinin semi kantitatif skorlamasında, her iki farklı haftada doku iskeleleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Sonuç; Çalışmamız, biyomateryal tabanlı doku mühendisliği yaklaşımlarının potansiyelini göstermektedir. Ancak, in vivo uzun dönem stabilite, biyouyumluluk ve fonksiyonel iyileşme açısından daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler; Üç Boyutlu Doku İskeleleri, Mikrovasküler Değişiklikler, Fibroblast İçeren Biyomalzemeler

ABSTRACT

Investigation of Microvascular Changes Induced by Three-Dimensional Dermal Fibroblast-Containing Thermoplastic Polyurethane and Polydimethylsiloxane Tissue Scaffolds in Wound Beds

Aim: This study aims to evaluate the in vitro and in vivo biocompatibility of composite tissue scaffolds composed of PDMS and TPU fabricated via 3D printing and coated with dermal fibroblasts. The goal is to offer long-lasting and biomechanically robust solutions for auricular reconstruction. The compatibility of the designed PDMS-TPU composite tissue scaffolds with the wound bed and surrounding tissue will be investigated.

Materials and Methods: The study began after obtaining approval from the Dokuz Eylul University Multidisciplinary Laboratory Animal Experiments Local Ethics Committee, dated 02/10/2024, approval number 04/17. Six male Wistar albino rats weighing 250–300 grams were used. The animals were divided into two groups: one received subcutaneous implantation of PDMS-TPU composite scaffolds without dermal fibroblasts (cell-free scaffolds), and the other received scaffolds coated with dermal fibroblasts (cell-seeded scaffolds). Tissue scaffolds obtained from sacrificed animals at weeks 8 and 12 were examined histologically using anti-CD31 and anti-VEGF staining.

Results: At week 12, the number of CD31-positive vascular structures was measured as 16.33 ± 3.06 in the cell-free group and 36.33 ± 4.16 in the cell-seeded group, showing a statistically significant difference ($p=0.043$). For VEGF-positive vascular structures, the cell-free group showed an average of 16.00 ± 12.29 , while the cell-seeded group had 37.67 ± 3.06 at week 8, also indicating a statistically significant difference ($p=0.041$). Semi-quantitative scoring of immunoreactivity intensity of CD31 and VEGF antibodies revealed no significant differences between the scaffold groups at either time point.

Conclusion: Our study demonstrates the potential of biomaterial-based tissue engineering approaches. However, further research is needed to assess long-term in vivo stability, biocompatibility, and functional recovery.

Keywords: Three-Dimensional Tissue Scaffolds, Microvascular Changes, Fibroblast-Containing Biomaterials.

1.GİRİŞ

Doğumsal veya travmatik kulak kayıplarının tedavisinde kıkırdak greftler veya alloplastik materyaller kullanılarak çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Ancak, kıkırdak greftlerin rezorpsiyonu, yapının tam olarak oluşturulamaması, cilt fleplerinde nekroz gelişmesi gibi komplikasyonlar, rekonstrüksiyonun başarısını sınırlamaktadır (1). Bu nedenle, kişiye özel olarak modelleme ile tasarlanan, biyouyumlu ve toksik olmayan biyomalzemelerden üretilen doku iskelelerine ihtiyaç vardır. Bu özelliklerin yanı sıra, üretilcek doku iskelelerinin kulak kıkırdağının elastikiyetini taklit edebilecek kadar esnek olması da gerekmektedir. Günümüzde 3D baskı teknolojisi, biyomalzemelerin kontrollü bir şekilde şekillendirilmesine olanak tanımakta ve kulak rekonstrüksiyonu için umut vaat etmektedir (2, 3).

Mikrotia, dış kulağın doğuştan gelen bir gelişim bozukluğudur ve hafif deformitelerden kulağın tamamen yokluğuna kadar geniş bir yelpazede görülebilir. Bu durum, çocuklarda konuşma, dil gelişimi ve öğrenme güçlüklerine neden olabilir ve psikolojik açıdan olumsuz etkiler yaratabilir (4). Mikrotia veya travma sonucu oluşan kulak deformiteleri plastik cerrahlar tarafından tedavi edilmektedir (5).

Dış kulağın doğumsal veya kazanılmış defektlerinin rekonstrüksiyonu, zor ve yüksek düzeyde teknik beceri gerektiren bir işlemdir. En yaygın yöntem, hastanın kendi kaburga kıkırdağından alınan greftlerin şekillendirilmesidir. Bu işlem birkaç aşamada gerçekleştirilir ve genellikle 4-6 ay sürebilir (6). Ancak, bu süreçte hemopnömotoraks, kıkırdak rezorpsiyonu ve greft kaybı gibi komplikasyonlar yaşanabilir (7). Ayrıca, vücutta elastik kıkırdak kaynağının olmaması ve kaburga kıkırdağının yeterince esnek olmaması nedeniyle öngörülemeyen estetik sonuçlar ortaya çıkabilir (8).

Alternatif olarak kıkırdak yerine kullanılan alloplastik materyaller ile de rekonstrüksiyon yöntemleri yapılabilmektedir. 20. yüzyılın başlarından itibaren cerrahlar, otolog kıkırdak yerine alloplastik materyaller kullanarak mikrotia tedavisini geliştirmeye çalışmışlardır. İlk denemelerde selüloz, tantal tel kafes, naylon meş, polietilen ve akrilik gibi materyaller kullanılmış ancak biyouyumluluk sorunları ve yüksek komplikasyon oranları nedeniyle başarısız olmuştur. Silikon, ilk standart

alloplastik materyal olarak kullanılsa da sık sık istenmeyen reaksiyonlar, skar oluşumu ve ekstrüzyon gibi sorunlarla karşılaşmıştır. 1980'lerden itibaren poröz polietilen (Medpor) kullanımıyla önemli bir ilerleme kaydedilmiş ve bu malzeme, doku iç büyümesini teşvik ederek komplikasyon oranlarını önemli ölçüde azaltmıştır. Özellikle temporoparietal fasya flebi ile implantın tamamen kaplanması, dışa atılım riskini belirgin şekilde düşürmüştür. Ancak implantın ek bir fasya flebiyle kaplanma gerekliliği hem ameliyat süresini uzatmakta hem de kulak üstündeki pariyetal bölgede alopesik skar bırakmaktadır. Aynı zamanda poröz polietilen de yeterince esnek olmayıp kulak kıkırdığını taklit etmekte başarısızdır ve uzun vadede ekstrüzyon ve enfeksiyon riski taşır (9, 10).

Doku mühendisliği, doku yenilenmesi ve organ fonksiyonlarının düzenlenmesi için mühendislik ilkelerinin yaşam bilimlerine uygulandığı bir alandır ve kulak rekonstrüksiyonu, doku mühendisliğinin güncel araştırma konularından biridir. Doku mühendisliği ile geliştirilen kulak kıkırdak yapıları, hayvan modellerinde, kulağın şekil, büyüklük, biyomekanik ve histolojik özelliklerini taklit etme açısından başarılı sonuçlar göstermiş olsa da bazı zorluklar devam etmektedir (11). Başarılı bir kulak rekonstrüksiyonu için, dış kulağın karmaşık üç boyutlu yapısının kişiye özel olarak modellenmesi, kullanılan greft veya biyomalzemelerin yeterli esnekliğe sahip olması ve uzun süre dayanıklılık göstermesi gerekmektedir. Ancak, hücre kaynağı, şeklin kontrolü, mekanik dayanıklılık, biyogüvenlik ve uzun dönem stabilitesi gibi teknik zorluklar nedeniyle klinikte henüz bu özellikleri sağlayan bir kulak kıkırdak yapısı kullanılamamaktadır.

3D biyobaskı, doku yapılarını üç boyutlu olarak üretmek için biyoyumlu materyal kullanarak yapılan bir baskı teknolojisidir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta yaygın olarak kullanılan 3D baskı teknolojileri, kişiye özel ve anatomik olarak uygun dış kulak rekonstrüksiyonu sağlama potansiyeline sahiptir. 3D baskı ile üretilen gözenekli ve karmaşık geometrik yapılar, hücre adezyonu ve proliferasyonu için birçok avantaj sunmaktadır (12).

Son yıllarda, polimerik malzemelerden 3D baskı ile kompleks şekillerin üretilmesi mümkün hale gelmiştir. 3D baskı mürekkebi olarak termoplastik polimerlerden polilaktik asit (PLA) ve akrilonitril-butadien-stiren (ABS) kopolimeri

yaygın olarak kullanılmaktadır ve diğer polimerlerin de baskı materyali olarak kullanımını araştırılmaktadır. Bu polimerlerin düşük toksisite, yüksek biyouyumluluk ve esneklik gibi özellikleri sayesinde polidimetilsiloksan (PDMS) ve termoplastik poliüretan (TPU) gibi polimerler de tercih edilmektedir (13, 14). TPU iyi aşınma direnci gösterirken, PDMS yüksek termal dayanıklılığa sahiptir.

Chen ve arkadaşları, esnek TPU/PLA/grafen oksit (GO) kompozit doku iskelelerini, kaynaşmış biriktirme modelleme (FDM) adı verilen bir 3D baskı yöntemi ile üreterek, grafen oksit eklenmesinin nanokompozitin mekanik özelliklerini ve termal kararlılığını artırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, bu 3D baskılanmış nanokompozit iskeleler, biyouyumlu olup hücrelerle başarılı bir uyum göstermiştir (14).

Özbolat ve ekibi, PDMS elastomerinin 3D baskı ile üretilmesi üzerine bir çalışmada, PDMS mürekkeplerinin dökme muadillerine kıyasla daha yüksek mekanik özellikler sunduğunu ve hücre tutunma ile yayılmasını daha iyi desteklediğini bulmuşlardır. PDMS'nin 3D baskısı, sadece doku ve organ modellerinin üretilmesi için değil, aynı zamanda yüzey mühendisliğinde hücre kültürü çalışmaları için yeni bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (13). Ancak PDMS ile üretilen doku iskelelerinin de doğal haliyle hücre yapışmasını çok iyi desteklemediği bilinmektedir. Shie ve çalışma arkadaşları, ışığa duyarlı su bazlı poliüretanı su bazlı TPU ve hyaluronik asit ile karıştırarak 3D yazıcıda dijital ışık işleme tekniği ile gözenekli bir kıkırdak doku iskelesi üretmişlerdir. Bu doku iskelelerinin hücre tutunması, çoğalması ve kondrojenik farklılaşmayı desteklediği görülmüştür (15). TPU'nun hücre tutunmasını destekleyen yapısı göz önünde bulundurulduğunda PDMS ve TPU'nun birlikte yer aldığı bir kompozit doku iskelesinin üretimi PDMS ve TPU'nun tek başlarına sunduğu dezavantajları giderir ve aynı zamanda daha esnek yapıda ve hücrelerin tutunma ihtimalinin daha güçlü olduğu bir alternatif sunar. PDMS ve TPU kullanılarak üretilcek kompozit doku iskelelerinin üretim sonrası biyolojik materyaller ile kaplanması doku iskelelerinin in-vivo şartlarda karşılaçağı sorunları azaltacaktır (16).

3D baskı ile üretilen doku iskelelelerinin biyolojik materyaller ile kaplandığı farklı çalışmalar literatürde yer almaktadır. Zopf ve arkadaşları, görüntü tabanlı tasarım ve lazer sinterleme sistemi kullanarak anatomik olarak gerçekçi kulak yapıları ürettirler. Gözenekli polikaprolakton polimerinden üretilen bu iskelelere, hyaluronik asit/kollajen hidrojel ile kondrositler ekilerek kıkırdak oluşumu gözlediler. Bu iskelelerin deri altına yerleştirilmesi sonrasında, ön ve arka kulak yüzeylerinde doğal bir görünüm elde edildiği ve kıkırdak büyümesi olduğunu gözlemlediler (17).

Liao ve arkadaşları, içi boş 3D baskılanmış bir kalıp kullanarak trombosit zengin plazma (PRP) ile karıştırılmış doğranmış kıkırdak ile kulak şekilleri ürettirler. Bu greftlerin dört ay boyunca şeklini koruduğu, biyomekanik uyum gösterdiği ve kıkırdak matriks oluşumunu sağladığı tespit edildi (18).

Srivastava ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, biyobozunur polimerlerden üretilen 3D baskılı iskelelerin kulak rekonstrüksiyonunda kullanılabilirliği araştırılmış ve bu tür yapıların cerrahi implantasyon için uygun olabileceği sonucuna varılmıştır (2). Esnek yapıya sahip, biyouyumlu ve toksik olmayan polimerik malzemelerin 3D baskıda mürekkep olarak kullanılması, doğumsal veya travmatik kulak kayıplarının rekonstrüksiyonu için büyük önem taşımaktadır. PDMS ve TPU kullanılarak üretilen kompozit doku iskeleleri, esnekliği ve biyouyumluluğu ile dokuların orijinal dokulara benzer yapılarla rekonstrükte edilmesi amacıyla hizmet etmektedir.

3D baskı tekniğiyle kişiye özel tasarlanacak doku iskeleleri ile yapılacak rekonstrüksiyonda bu iskelelerin biyouyumluluğu önem arz eder. Bu noktada tercih edilecek polimerik malzemelerle üretilen doku iskeleleri de benzerleri olan diğer alloplastik materyaller gibi vücuda yerleştirildikten sonra immün yanıtla karşılaşacak ve immün yanıt sonrasında en nihayetinde fibrotik kapsül dokusuyla kaplanacaktır. Bu fibröz kapsül dokusunun damarlanma kapasitesi ise var olan kapsülün dokularla entegrasyonunda temel adımı oluşturur. 3D baskı ile üretilen bu doku iskelelerine üretim süreci sonrasında eklenecek biyolojik katkılar bu damarlanma kapasitesini olumlu anlamda değiştirebilir (19).

3D baskı teknolojisi kullanılarak üretilen doku iskelelerine, doku rejenerasyonunu desteklemek amacıyla çeşitli biyomalzemeler eklenmektedir. Bu bağlamda, PRF (Platelet-Rich Fibrin), kollajen hidrojel ve hyaluronik asit gibi biyomalzemeler, doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılan bileşenler arasında yer almaktadır. Yapılan araştırmalar, hyaluronik asit içeren 3D baskılı hidrojel iskelelerin doku iyileşmesini hızlandırabileceğini, inflamasyonu azaltarak pro-anjiyogenik etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur (20). Aynı şekilde, PRF içeren biyomalzemelerin yara iyileşmesini desteklediği ve hücresel proliferasyonu artırarak doku bütünlüğünü sağladığı bildirilmiştir. Kollajen hidrojel bazlı iskeleler de hücre adezyonu ve büyümesini destekleyerek, biyomalzemelerin biyouyumluluğunu artıran önemli bir bileşen olarak ön plana çıkmaktadır (21).

Öte yandan, fibroblast kültürü eklenmiş biyomalzemeler ile anjiyogenezin artıp artmadığını inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan araştırmalara göre, fibroblastlar tarafından salgılanan büyüme faktörleri, özellikle vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF), anjiyogenezi teşvik eden temel unsurlar olarak öne çıkmaktadır (22). Ayrıca, fibroblast eklenmiş biyomalzemelerin, endotel hücreleri ile birlikte kullanıldığında damar ağlarının daha etkin bir şekilde gelişimini sağladığı gösterilmiştir (23). Bu bağlamda, fibroblast eklenmiş doku iskeleleri, hücrelerin oksijen ve besin maddelerine erişimini artırarak doku rejenerasyonunu destekleyen önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir.

Dermal fibroblast eklenmiş, üç boyutlu baskı ile oluşturulmuş PDMS ve TPU içeren kompozit doku iskelelerinin in vivo yerleştirilerek takip eden süreçte anjiyogenezin histolojik belirteçleriyle değerlendirildiği ve klinik çalışmalar ile desteklendiği takdirde kulak rekonstrüksiyonu kişiye özel kılınp standartlaştırılabilir, cerrahi komplikasyon önlenabilir, ameliyat süreleri kısaltılabilir ve hasta memnuniyeti sağlanabilir düşüncesi ile bu çalışmayı gerçekleştirdik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara İyileşmesi

Yara iyileşme süreci, oldukça entegre ve birbiriyle örtüşen hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon adı verilen dört temel aşamadan oluşan karmaşık bir biyolojik olaydır (24). Bu aşamalar, doku onarımının optimal şekilde ilerlemesi için belirli bir zaman diliminde ve uygun yoğunlukta gerçekleşmelidir. Ancak, çeşitli endojen ve eksojen faktörler bu süreci olumsuz etkileyerek doku onarımının yetersiz kalmasına veya bozulmasına neden olabilmektedir. Yara iyileşme sürecinde gecikme veya kronikleşmiş yaralar genellikle normal iyileşme aşamalarında ilerleyememe sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu tür yaralar, koordinasyon eksikliği, eksik biyokimyasal sinyaller veya kronik inflamasyon gibi faktörlerle patolojik bir sürece girebilmektedir (25).

Yara iyileşmesi, yalnızca hasarlı dokunun onarılmasıyla sınırlı kalmayan, tüm organizmayı etkileyen hücresel, biyokimyasal ve fizyolojik olayların bir bütünüdür. Tüm dokular, benzer temel mekanizmalarla iyileşme sürecine girer, ancak bu süreç, dokunun tipine ve iyileşme koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Yara iyileşme sürecinde karmaşık ve kendi içinde düzenli ilerleyen çok sayıda hücresel ve moleküler mekanizma görev almaktadır. Keratinositler, fibroblastlar, endotelial hücreler, kollajen lifleri, sitokinler, makrofajlar ve trombositler bu süreçte etkin rol oynayan temel bileşenler arasındadır (26). Bu mekanizmalar, hücreler arası etkileşimler ve sitokin sinyalleri aracılığıyla düzenlenerek doku bütünlüğünün yeniden sağlanmasını mümkün kılar.

Yara iyileşme süreci dört ana fazdan oluşmaktadır:

Hemostaz fazı: Yara iyileşmesinin ilk aşamasıdır ve yaranın oluşmasından hemen sonra başlar. Temel amacı kanamayı durdurmak ve yara iyileşme sürecini başlatmaktır. Bu faz, genellikle dakikalar içinde tamamlanır.

İnflamasyon fazı: İlk 3-6 gün boyunca devam eder. Kanamanın durdurulması ve inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu bu aşamada gerçekleşir.

Proliferatif faz: 4-21 gün süren bu aşamada fibroblast aktivitesi, anjiyogenez ve epitelizasyon ön plandadır. Yeni doku oluşumu desteklenir.

Remodeling (yeniden şekillenme) fazı: Yaklaşık 21 gün ila 6 ay arasında devam eder. Kollajen maturasyonu, doku yeniden yapılanması ve mekanik dayanıklılığın artırılması bu süreçte gerçekleşir (27). Bu aşamalar, hücreler ve biyokimyasal faktörler arasındaki hassas denge ile koordineli bir şekilde ilerler ve herhangi bir aksama, yara iyileşme sürecini geciktirebilir veya anormal bir iyileşme sürecine neden olabilir.

2.1.1. Koagülasyon ve Hemostaz Fazı

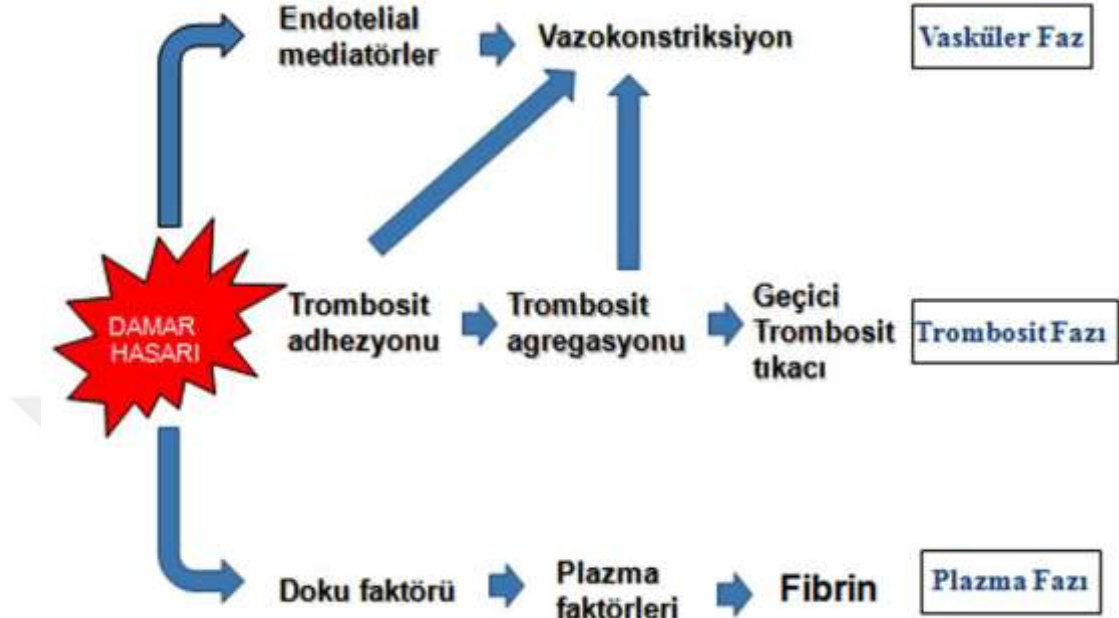
Yara iyileşmesinin ilk aşaması olan hemostaz, pıhtı oluşumu ve pıhtılaşma sürecinin ilerlemesini içeren temel bir biyolojik süreçtir. Trombositler, bu mekanizmanın ana bileşenleri olup, yaralanmaya karşı ilk tepkiyi veren hücrelerdir. Damar bütünlüğü bozulduğunda, trombositler damar duvarındaki hücre dışı matriks (ECM) ile etkileşime girerek aktive olur. Aktivasyonun ardından trombosit yapışması (adhezyon) ve agregasyonu gerçekleşir. Trombositler, serotonin, adenosin difosfat (ADP) ve tromboksan A₂ gibi kimyasal mediyatörlerin yanı sıra fibrinojen, fibronektin, trombospondin ve Von Willebrand faktörü gibi yapışkan proteinleri salgılar. Bu moleküller, lokal trombin üretimini artırarak trombosit agregasyonunu ve sekresyonunu uyarır, böylece trombosit tıkaçı oluşumu sağlanır. Trombin, fibrinojeni fibrine dönüştürerek stabil bir fibrin ağı oluşturur ve kanamanın durdurulmasına katkıda bulunur (28).

Pıhtılaşma süreci, intrinsik ve ekstrinsik yollar olmak üzere iki temel kaskat mekanizması ile aktive edilir.

- İntrinsik yol, protrombinin trombine dönüşümünü başlatarak, fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlar.
- Ekstrinsik yol, doku faktörünün (TF) hasarlı dokudan salınmasıyla aktive olur. Bu süreçte aktive olmuş monositler ve endotel hücreleri de rol oynar.

Trombositler, sadece hemostazda değil, aynı zamanda inflamasyon, reepitelizasyon, fibroplazi ve anjiyogenez süreçlerinde de kritik roller üstlenir. Lökosit

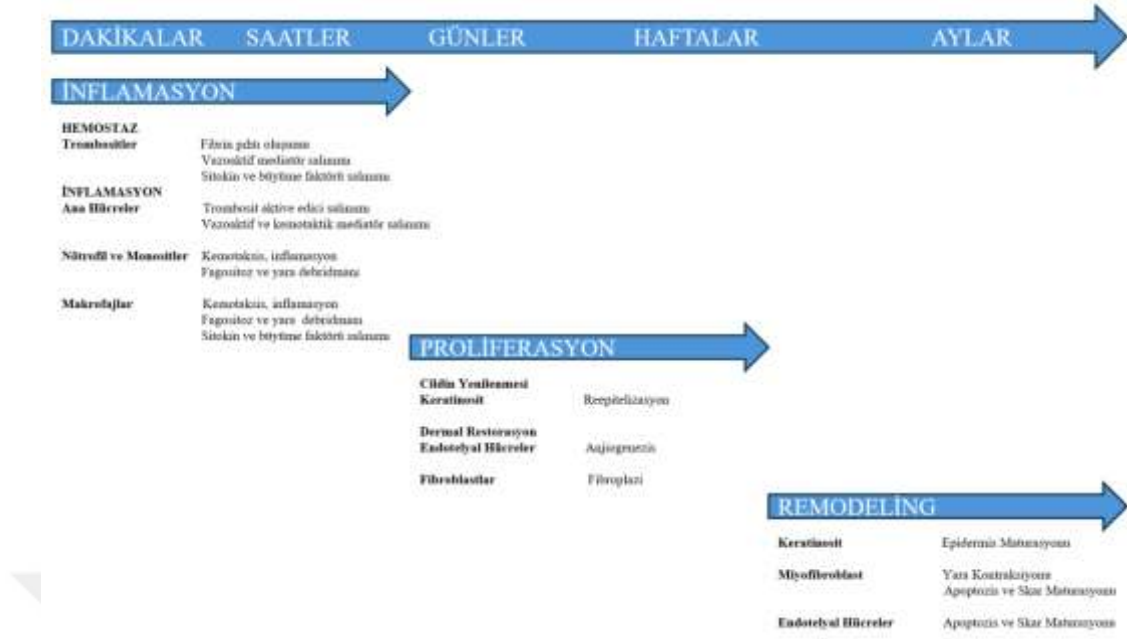
infiltrasyonunu destekleyen kemotaktik faktörleri salgılayarak, yara iyileşmesinin ilerleyen aşamalarına katkıda bulunurlar (29, 30) (Şekil 1).



Şekil 1: Hemostaz mekanizmasının şematik olarak gösterimi.

2.1.2. Enflamatuar Faz

Enflamasyon, doku onarımını ve fonksiyonun restorasyonunu kolaylaştıran, vücudun yaralanmaya karşı verdiği doğal immünolojik ve fizyolojik bir yanıtıdır. Yara iyileşme sürecinin ikinci aşamasını oluşturan bu süreç, yaralanma sonrası hemen başlar ve yaklaşık 3-6 gün sürer. Yaralanmanın erken evrelerinde, lokal vazodilatasyon, artan vasküler permeabilite ve lenfatik drenajın geçici olarak bloke olması nedeniyle kızarıklık (rubor), şişlik (tumor), sıcaklık artışı (calor) ve ağrı (dolor) gibi klasik inflamasyon belirtileri ortaya çıkar. Bu süreç, enfekte dokunun korunmasını ve immün hücrelerin bölgeye ulaşmasını sağlayarak yara iyileşmesini destekler. Enflamasyonun hücresel yanıtı, lökositlerin (beyaz kan hücrelerinin) yara bölgesine göçüyle başlar. Nötrofiller ve monositler, inflamasyonun erken döneminde yara bölgesinde bulunan en baskın hücrelerdir. Yaralanmayı takiben, nötrofiller hızla aktivasyon geçirerek yara bölgesine göç eder ve bakterilere, nekrotik hücrelere ve



Şekil 3: Yara iyileşmesinde görev alan hücreler ve etkileri.

Nötrofiller, yara bölgesine hızla göç eden ve patojenlerin etkisiz hale getirilmesini sağlayan ilk bağışıklık hücreleridir. Fagositoz yoluyla bakterileri ve yabancı partikülleri yok ederler, böylece enfeksiyon riskini azaltarak yara iyileşmesini desteklerler. Nötrofil infiltrasyonu genellikle birkaç gün sürer, ancak yarada kontaminasyon gelişirse nötrofiller yara bölgesinde daha uzun süre kalabilir ve bu durum iyileşme sürecini geciktirebilir. Monositler ise kan dolaşımından doku boşluklarına geçerek makrofajlara dönüşen bağışıklık hücreleridir. Enflamasyon sürecinin geç evrelerinde makrofajlar baskın hücre tipi haline gelir ve inflamatuvar yanıtın temel düzenleyicileri olarak görev yaparlar. Makrofajlar, fagositoz yoluyla bakterileri, ölü hücreleri ve dokusal kalıntıları temizleyerek yara iyileşmesini ilerletir ve aynı zamanda nötrofillerin uzaklaştırılmasını sağlar (32).

Makrofajların fagositoz süreci, biyolojik olarak aktif oksijen radikallerinin ve enzimatik proteinlerin salınmasına yol açarak patojen organizmaların ortadan kaldırılmasını sağlar. Bununla birlikte, makrofajlar anjiyogenezi ve granülasyon dokusu oluşumunu uyarak yeni doku oluşumunu desteklerler (33). Aynı zamanda fibroblastları yara bölgesine çeken fibronektin gibi kemotaktik faktörleri salgırlar, böylece yara bölgesine bağ dokusu bileşenleri çekilmiş olur. Hipoksiye maruz kalan makrofajlar, anjiyojenik faktörler salgılayarak yeni damar oluşumuna

(neovaskülarizasyon) katkıda bulunur. Bu süreçte fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), transforming growth factor-beta (TGF- β) ve transforming growth factor-alpha (TGF- α) gibi büyüme faktörlerinin üretim merkezleri olarak görev yaparlar. Bu sitokinler, hücre göçü, hücre proliferasyonu ve hücre dışı matriks sentezi gibi süreçlerde önemli rol oynar. Sonuç olarak, makrofajlar inflamasyon ile iyileşme arasındaki geçiş sürecinde merkezi bir role sahiptir ve yara dokusunun yeniden yapılanmasını destekleyen temel immün hücreler arasında yer alırlar (34).

2.1.3. Proliferasyon Fazı

Proliferasyon aşaması, yaralanmayı takip eden 48 saat içinde başlar ve 15-21 gün boyunca devam eder. Bu süreçte yeniden epitelizasyon, granülasyon dokusu oluşumu ve anjiyogenez gerçekleşir. Enflamatuvar hücrelerin sayısı azalırken, keratinositler, fibroblastlar ve endotelial hücrelerin aktivitesi artar. Fibroblastlar yara bölgesine göç eder ve hücre dışı matriksin (ECM) sentezlenmesi ile geçici bir fibrin ve fibronektin ağı oluşturulur (35).

Yeniden epitelizasyon, IL-1 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler tarafından uyarılır. Trombositler, keratinositler ve anti-inflamatuvar makrofajlar tarafından üretilen keratinosit büyüme faktörü (KGF) ve TGF- α , bu süreci başlatır. Fibroblastlar, KGF-1, KGF-2 ve IL-6 gibi büyüme faktörlerini salgılayarak, epidermiste hücre göçü, proliferasyon ve farklılaşmayı destekler. Keratinositler yara kenarında çoğalır ve ECM üzerinde proteazlar kullanarak ilerler. Yara matriksinin mezenkimal yapısına ulaştıklarında bazal membrana sıkıca bağlanarak yeni epitel dokusunun oluşumunu başlatırlar. Daha sonra epitel hücreleri, yaranın üzerini kapatmak amacıyla çoğalarak defekti doldurur. Göç eden keratinositler, temas inhibisyonu mekanizmasıyla birbirleriyle etkileşime girerek göçlerini durdurur ve ince bir epitel tabakası oluşur. Bu yeni epitel, yara bölgesini mikroorganizma istilasına ve enfeksiyona karşı korur, aynı zamanda elektrolit ve sıvı kaybını önler (36, 37).

Proliferasyonda Fibroblastın Rolü

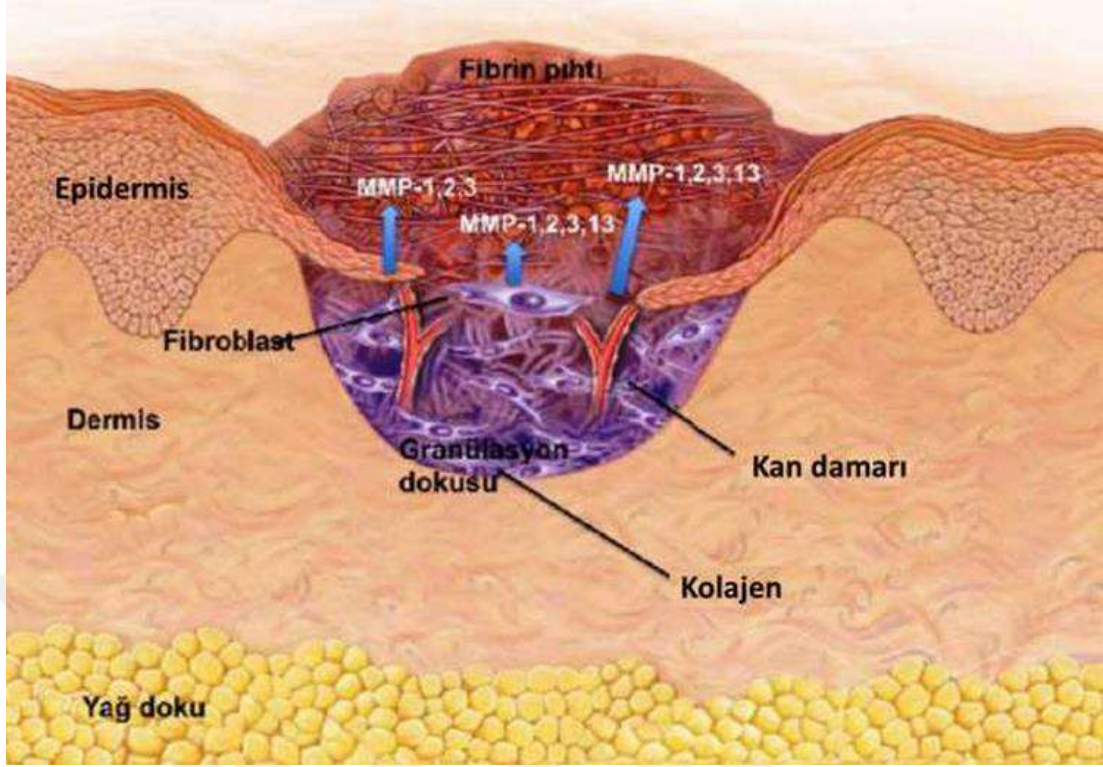
Granülasyon dokusu, yaralanmadan yaklaşık dört gün sonra yara boşluğunu

doldurmaya başlar. Fibroblastlar, fibrinden zengin geçici matriksi granülasyon dokusuyla değiştirerek yara iyileşmesini hızlandıran temel hücrelerdir. Bu süreçte makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücreler yara bölgesine göç eder. Makrofajlar, fibroplaziyi ve anjiyogenezi uyarmak için gerekli büyüme faktörlerini salgılayarak, fibroblastlar geçici ECM'yi sentezler, depolar ve yeniden şekillendirir. Kan damarları ise hücre metabolizması için oksijen ve besin taşır (38). TGF- β ve PDGF gibi büyüme faktörleri fibroblastlar, trombositler, endotel hücreler ve makrofajlar tarafından üretilerek fibroblastları yara bölgesine yönlendirir. Fibroblastlar bölgeye ulaştığında, proteolitik enzimler üreterek geçici ECM'yi parçalar ve yerine fibronektin, olgunlaşmamış tip III kollajen ve proteoglikanlar açısından zengin yeni granülasyon dokusu oluşur (35).

Granülasyon dokusu, hücre göçü ve farklılaşması için uygun bir iskele görevi görerek, yeni damar oluşumunu ve olgun ECM'nin birikmesini destekler. Yara dokusunda yeterli miktarda kollajen biriktiğinde, fibroblastlar kollajen üretimini durdurur ve apoptoza uğrar.

Proliferasyonda Anjiyenez Süreci

Granülasyon dokusunun korunması için anjiyenez süreci devreye girer. Bu süreç, endotel hücrelerinin ve ECM'nin göçünü içerir ve makrofajlar ile endotel hücreleri tarafından salgılanan VEGF, PDGF ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) tarafından tetiklenir. Anjiyenezin, yara iyileşmesinde doğal bir süreç olduğunu vurgulamak önemlidir. İyileşmenin ilk üç gününde bFGF, 4-7 gün arasında ise VEGF granülasyon dokusu oluşumu için kritik bir rol oynar. Anjiyenez, büyüme faktörlerinin endotel hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasıyla başlar. Aktive olan endotel hücreleri, bazal membranı parçalayarak proteolitik enzimler salgılar ve bu süreç, yeni damar oluşumu için uygun mikro çevrenin hazırlanmasını sağlar (35, 36, 39) (Şekil 4).



Şekil 4: Yara iyileşmesinin proliferasyon fazı.

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve Anjiyogenezdeki Rolü

VEGF ailesi, anjiyogenez sürecini düzenleyen temel büyüme faktörlerinden biridir. VEGF, endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, tümör hücreleri, mezenkimal kök hücreler ve perisitler gibi birçok farklı hücre tipi tarafından üretilmektedir. Bu hücrelerin VEGF üretimi, hipoksi, inflamasyon ve doku hasarı gibi çevresel faktörler tarafından düzenlenmektedir. VEGF'in bu hücrelerden salgılanması, anjiyogenez ve doku rejenerasyon süreçlerinin temel mekanizmalarından biridir (40, 41). Bu faktörler, endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu teşvik ederek yeni damar oluşumunu başlatır. VEGF ailesi dört ana alt gruptan oluşur (42): VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D.

VEGF-A: Anjiyogenezde en kritik rolü oynayan büyüme faktörüdür. Endotel hücreleri üzerinde bulunan VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerine bağlanarak damar oluşumunu başlatır. Özellikle hipoksi koşullarında hücrelerel sinyalizasyon mekanizmalarını aktive eder ve yeni damarların büyümesini teşvik eder (42).

VEGF-B: VEGF-A kadar güçlü bir anjiyogenez etkiye sahip olmamakla

birlikte, hücre metabolizmasını ve vasküler homeostazı destekleyerek yeni damar oluşumunu dolaylı yoldan düzenler. Özellikle kas dokusu ve kalp gibi enerji ihtiyacı yüksek dokularda etkindir (40).

VEGF-C: Lenfanjiyogenezi (lenf damarlarının oluşumunu) düzenleyen ana faktördür. Lenfatik endotel hücrelerin proliferasyonunu artırarak, lenf akışını düzenler ve doku ödeminin önlenmesine yardımcı olur (43).

VEGF-D: Hem vasküler hem de lenfatik anjiyogenezi destekleyen bir büyüme faktörüdür. VEGFR-2 ve VEGFR-3 reseptörlerine bağlanarak hem kan damarlarının hem de lenf damarlarının oluşumuna katkıda bulunur (43).

VEGF ailesi, biyomateryal ile desteklenen doku iskelelerinde hücre proliferasyonu ve damarlanmayı hızlandırarak başarılı rejenerasyon süreçlerinin temelini oluşturur. Bu çalışmada biyomateryalin dokuda stabil kalmasını değerlendirmede anti-VEGF markerı kullanmayı bu nedenlerle tercih ettik.

CD31 (PECAM-1) ve Anjiyogenezdeki Rolü

CD31, diğer adıyla Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1), anjiyogenezde rol oynayan önemli hücre yüzey belirteçlerinden biridir. CD31, endotel hücreleri arasında hücre-hücre etkileşimlerini düzenleyen bir adezyon molekülüdür ve yeni damar oluşumu sürecinde kritik bir rol oynar. CD31, vasküler hücreler arasında sinyal iletimini sağlayarak damarların stabilizasyonunu destekler. Anjiyogenez sürecinde endotel hücrelerinin göçünü, birleşmesini ve damarların olgunlaşmasını düzenler (44).

Anti-apoptotik etkileri sayesinde, yeni oluşan damarların korunmasına yardımcı olur. Özellikle hücre stres altında endotel hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen sinyal yollarını aktive eder, CD31, VEGF ile birlikte çalışarak anjiyogenezin etkinliğini artırır. Yapılan çalışmalar, VEGF ve CD31'in birlikte yüksek seviyelerde eksprese edildiği ortamlarda anjiyogenez sürecinin daha hızlı ilerlediğini göstermektedir (45).

CD31'in doku mühendisliği uygulamalarındaki önemi, biyomalzeme içeren

iskelelerde neovaskülarizasyon sürecinin etkinliğini değerlendirmek için bir belirteç olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Özellikle fibroblast veya endotel hücreleri eklenmiş biyomalzemelerin damarlanma kapasitesini ölçmek için CD31 ekspresyonu biyomarker olarak kullanılmaktadır (46).

2.1.4. Yeniden Şekillenme (Remodelling) ve Matürasyon Fazı

Yara iyileşmesinin son aşaması olan yeniden şekillenme (remodeling) süreci, iki yıla kadar devam edebilen uzun vadeli bir süreçtir (36). Bu aşamada, kollajen lifleri yeniden düzenlenir, çapraz bağlar oluşturularak doku mukavemeti artırılır ve granülasyon dokusu skar dokusuna dönüşür. Önceki aşamalarda etkin olan hücresel aktiviteler programlanmış hücre ölümü (apoptoz) yoluyla azalmaya başlar. Fibroblastlar apoptoza uğradığında, yüksek hücre yoğunluğu ve damarlanma içeren granülasyon dokusunun oluşumu durur ve yerini daha az hücre içeren olgun skar dokusu alır (47).

Bu aşama, mekanik gerilim ve TGF- β sinyalleme aracılığıyla fibroblastlardan farklılaşan miyofibroblastlar tarafından yönlendirilir (48). Miyofibroblastlar, matriks metaloproteinazlar (MMPs) salgılayarak proliferatif fazda üretilen geçici ECM ve tip III kollajenin parçalanmasını sağlar. Bu süreçte daha sıkı ve organize bir yapı olan tip I kollajen yara bölgesine hâkim olur. Miyofibroblastların aktivitesi, yara dokusunun kasılmasını sağlayarak yaranın kapanmasına katkıda bulunur. Kollajen sentezi ve organizasyonu, yaranın gerilme mukavemetini ve mekanik dayanıklılığını artırır ancak iyileşmiş doku, hiçbir zaman normal derinin maksimum mukavemetinin %80'ini aşamaz (39, 47). Bazı sistemik hastalıklar ve diyabet, kollajen üretimini ve organizasyonunu bozarak yara mukavemetini zayıflatabilir, bu da iyileşme sürecinin gecikmesine ve skar dokusunun zayıf kalmasına neden olabilir (49).

2.2. Mikrotia Rekonstrüksiyonunda Kullanılan Ameliyat Teknikleri

Mikrotia rekonstrüksiyonu, doğumsal dış kulak deformitelerini düzeltmek için uygulanan cerrahi girişimlerdir. Günümüzde birçok teknik kullanılmaktadır ve bu tekniklerin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. En yaygın olarak kullanılan yöntemler otojen kostal kıkırdak rekonstrüksiyonu, alloplastik implantlar ve doku

mühendisliği ile geliştirilen biyobaskı materyallerinin kullanıldığı tekniklerdir. Her yöntemin etkinliği, hastanın ihtiyaçlarına, cerrahın deneyimine ve bireysel anatomik farklılıklara bağlı olarak değişir (50).

2.2.1. Otojen Kostal Kıkırdak Grefti ile Rekonstrüksiyon

Otojen kostal kıkırdak rekonstrüksiyonu, hastanın kendi kaburga kıkırdağının kullanıldığı en yaygın ve en uzun süredir uygulanan tekniktir. Bu yöntemde kaburga kıkırdağı alınarak modelleme yapılır ve kulak yapısı oluşturulur. Brent tekniği (51) ve Nagata tekniği (52) en yaygın kullanılan tekniklerdir.

2.2.1.1. Kıkırdak Dokusu

Kıkırdak dokusu, çeşitli işlevleri yerine getirme kapasitesine sahip özel bir doku türüdür. Bu işlevler arasında sıkıştırıcı kuvvetlere direnç gösterme, kemiğin esnekliğini artırma ve esneklik gereken kemikli bölgelerde destek sağlama yer alır. Kıkırdak dokusunun sentezinde görev alan başlıca hücreler ise, lakün adı verilen boşluklarda bulunan kondrositlerdir. Kıkırdak matriksi, fibröz doku ve farklı proteoglikanlar ile glikozaminoglikanların bir araya gelmesiyle oluşan bir yapıya sahiptir. Kıkırdak doku sentezlendikten sonra, kan ya da lenf kaynaklarına doğrudan bağlı değildir. Bu nedenle, besinlerin alınması ve metabolizma sonucu oluşan atıkların uzaklaştırılması difüzyon ile gerçekleşir (53).

Kıkırdak matriksinde, glikozaminoglikan oranının tip 2 kolajen liflerinden daha yüksek olması, çevredeki bağ dokudaki kan damarlarıyla matriksteki kondrositler arasında maddelerin difüzyonuna olanak tanır. Bu süreç, dokunun canlılığını koruması açısından kritiktir (54). Kıkırdak doku, kemik gibi fibröz bir zar olan perikondrium ile çevrelenmiştir; ancak bu tabaka rejenerasyon kapasitesi bakımından oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, kıkırdak yaralanmalarında iyileşme süreci genellikle yavaş gerçekleşir. Kıkırdak dokunun kan dolaşımı olmaması, yaralanmaların uzun sürede iyileşmesinin başlıca nedenidir. Ayrıca, kıkırdağın sinir sistemiyle bağlantısı bulunmadığı için hasar durumunda ağrı ya da hassasiyet hissedilmez (55).

Kıkırdak doku kalsifikasyona uğradığında, kondrositler yaşamlarını yitirir ve bu alanlar kıkırdağın yerini alan kemik benzeri bir dokuyla doldurulur. Kemiğin

aksine, kıkırdak matriksinde kalsiyum bulunmaz. Bunun yerine, elastikiyet ve esneklik sağlayan kondroitin gibi maddeler yüksek oranda yer alır (56).

2.2.1.2. Kıkırdak Dokusu Hücreleri

Kıkırdak dokusu, kondrosit adı verilen hücrelerden ve yoğun miktarda ekstrasellüler matriksten oluşan avasküler bir doku türüdür. Kıkırdak hacminin %95'inden fazlasını oluşturan ekstrasellüler matriks, bu dokunun fonksiyonel bileşenidir. Kondrositler az sayıda bulunmalarına rağmen, kıkırdak matriksinin üretimi ve devamlılığı için gerekli olan temel maddeleri salgırlar. Kondrositler, hücre dışı matriksin korunmasında ve kıkırdak dokusunun yenilenmesinde kritik rol oynarlar. Kollajen liflerle çevrili olan kondrositler, kıkırdağa güç ve esneklik kazandıran maddeler salgılayarak dokunun dayanıklılığını sağlarlar (54).

Kondrositler, genellikle omurlar arası disklerde ve eklem kıkırdağında bulunurlar. Eklem kıkırdağında, eklem hareketleri sırasında tampon görevi görerek homeostazın korunmasına katkıda bulunurlar. Diğer özelleşmiş dokulardaki hücrelerde olduğu gibi, kondrositler de birbirlerinden kıkırdak matriksi aracılığıyla ayrılmıştır. Aynı zamanda kondrositler, kıkırdak dokusunun onarım sürecinde önemli bir rol üstlenirler; rekonstrüktif özellikleri sayesinde doku hasarı durumunda dışsal travmalara yanıt verirler (57).

2.2.1.3. Perikondrium

Perikondrium, fibroblastlara benzer hücrelerden oluşan yoğun bir bağ dokusu tabakasıdır. Çeşitli açılardan bezleri ve birçok organı çevreleyen kapsüllere benzeyen bir yapıya sahiptir. Bunun yanı sıra, yeni kıkırdak hücrelerinin oluşumu için bir kaynak görevi görür (57). Perikondriumun dış kısmı büyük oranda kollajen tip I lifleri ve fibroblastlardan meydana gelirken, iç kısmı kıkırdak matriksine yakın konumlanmış ve bölünerek kondrositlere dönüşebilen mezenkimal kök hücreleri içerir. Bu iç tabaka, kondroblastların oluşumu ve kıkırdak dokunun yenilenmesi için bir hücresel kaynak sunar (58). Hyalin kıkırdak dokusu, perikondrium adı verilen sıkı bağ dokusu ile çevrelenmiştir; ancak eklem yüzeylerinde bulunan hyalin kıkırdak, perikondrium ile kaplanmamıştır (54).

2.2.1.4. Kıkırdak Dokusu Tipleri

Hyalin kıkırdak

Hyalin kıkırdak, organizmada en sık rastlanan kıkırdak türüdür ve erişkinlerde eklem yüzeylerinde, solunum yollarında (burun, larinks, trakea, bronş), kaburgaların ön uçlarında ve epifiz plaklarında bulunur. Eklem yüzeyleri hariç tüm bölgelerde perikondrium ile tamamen çevrelenmiştir (59). Hyalin kıkırdak, fetüsün gelişmekte olan iskeleti için bir yapı modeli oluşturur ve erken fetal dönemde, kemikleşme süreci olan encondral kemikleşme ile gelişen kemiklerin öncüsü olarak görev yapar. Başlangıç aşamasında pek çok uzun kemik, olgun kemiğin şeklini andıran kıkırdak modelleri ile ifade edilir (54).

Kondrosit adı verilen olgun kıkırdak hücreleri, lakuna adı verilen boşluklar içinde yer alır. Bu hücreler canlı dokuda geniş ve oval bir şekle sahip olsalar da histolojik preparat hazırlama sırasında su, lipid ve glikojen kaybına uğrayarak büzülürler. Bu nedenle preparatlarda lakuna duvarları ile kondrositler arasında gerçek olmayan bir boşluk ortaya çıkar. Bu büzülme, kondrositlerin sitolojik özelliklerinin ışık mikroskopunda incelenmesini zorlaştırır. Ayrıca dehidrasyon sırasında kaybolan su ve lipidler nedeniyle sitoplazmaları vakuollü görünür (60).

Kıkırdak matriksini sentezleyen kondroblastlar, gelişmiş bir granüllü endoplazmik retikulum, Golgi kompleksi, sekresyon granülleri, veziküller, lipid, glikojen, ara filamentler, mikrofilamentler ve mikrotübüller gibi hücresel yapılar içerir. Hyalin kıkırdak matriksi, kondrositler tarafından üretilir ve üç ana molekül sınıfından oluşur (54):

1. **Kollajen Molekülleri:** Ana matriks proteini olarak %80 oranında tip 2 kollajen içerir.
2. **Proteoglikanlar:** Hyaluronan, kondroitin sülfat ve keratan sülfat içerir.
3. **Çoklu Yapışkan Glikoproteinler:** Ankörin C II, tenasin ve fibronektin gibi yapışkan glikoproteinler içerir.

Elastik kıkırdak

Elastik kıkırdak, hyalin kıkırdak matriksinin temel bileşenlerine ek olarak bol miktarda dallanan ve birbirine bağlanan elastik lifler içerir. Bu elastik liflerin varlığı, elastik kıkırdağa hyalin kıkırdaktan daha fazla esneklik ve bükülebیلme özelliği kazandırır. Elastik kıkırdak, esnekliğe ihtiyaç duyulan dış kulak, dış kulak yolu, epiglottis, östaki tüpü ve larinkteki bazı yapılar (cuneiform, corniculat ve epiglottis) gibi bölgelerde bulunur. Ayrıca, hyalin kıkırdaktan farklı olarak, elastik kıkırdak yaşlanma sürecinde kalsifikasyona uğramaz (61).

Fibröz kıkırdak

Fibröz kıkırdak, yapısal özellikleri bakımından kıkırdak ve sıkı bağ dokusu arasında yer alır. Kondrositler genellikle hücre dizileri şeklinde sıralanır, ancak nadiren izojen gruplar olarak bulunurlar. Bu kondrosit grupları arasında yer yer fibroblast hücrelerine de rastlanır. Fibröz kıkırdak, intervertebral disklerde, bazı eklemlerde (örneğin, sternoklavikular ve temporomandibular eklemler), symphysis pubis bölgesinde, diz menisküslerinde ve tendonların kemiğe tutunduğu bölgelerde bulunur. Fibröz kıkırdakta bulunan hücrelerin sadece gelişim döneminde değil, aynı zamanda erişkin dönemde de matriks moleküllerini salgılamaya devam etmesi, bu kıkırdağın mekanik basınç, beslenme koşulları ve hormonal değişiklikler gibi çevresel faktörlere uyum sağlamasına katkı sağlar (62).

Fibröz kıkırdağın ekstrasellüler matriksi, tip 1 ve tip 2 kollajen fibrilleri içermesiyle öne çıkar. Bu kollajenlerin oranı farklılık gösterebilir. Örneğin, diz eklemindeki menisküsler yalnızca az miktarda tip 2 kollajen içerirken, intervertebral diskler tip 1 ve tip 2 kollajeni eşit oranda içerir. Fibröz kıkırdakta tip 1 ve tip 2 kollajen oranı yaşla birlikte değişiklik gösterebilir. Yaşlı bireylerde, tip 2 kollajen üreten kondrositlerin sürekli aktivitesi nedeniyle bu kollajen türü daha fazla bulunur. Ayrıca, fibröz kıkırdağın ekstrasellüler matriksi, agrekan yerine fibroblastlar tarafından salgılanan bir proteoglikan monomeri olan versikanı daha yüksek miktarda içerir. Versikan, hyaluronan ile bağlanarak yüksek düzeyde su tutan proteoglikan kümeleri oluşturur (54).

2.2.2. Kıkırdak Grefti

2.2.1.1. Kıkırdak Grefti Elde Edilmesi, Hazırlanılması ve Klinik Uygulanması

Kıkırdak greftleri; estetik burun cerrahisi, doğuştan gelen veya sonradan oluşan burun deformitelerinin düzeltilmesi, mikrotia ve diğer kulak deformasyonlarının rekonstrüksiyonu, temporomandibular eklem ankilozunun tedavisi ve kraniofasial bölgedeki defektlerin onarımı gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Rinoplasti cerrahisinin başlangıcından bu yana, travmatik burun deformitelerinin ve sekonder cerrahi defektlerin onarımında greftler tercih edilmektedir (63). Sekonder rinoplastide otolog greftler için tercih edilen potansiyel donör alanlar arasında septal kıkırdak, kulak kıkırdağı, kaburga, iliak kemik ve kalvaryal kemik bulunmaktadır. En çok tercih edilen donör alan septal kıkırdaktır, çünkü ekstra bir kesi gerekmez, donör bölgede morbidite oluşmaz, septal kıkırdak alınırken burundaki eğrilik düzeltilebilir ve hava yolu açıklığını iyileştirebilir (64).

Kıkırdak greftleri, kulak rekonstrüksiyonunda da önemli bir yere sahiptir. Brent, Nagata, Tanzer, Walton ve Beahm gibi öncüler tarafından geliştirilen teknikler, günümüzde kullanılan kulak rekonstrüksiyon yöntemlerinin temelini oluşturur. 1959'da Tanzer, otolog kaburga kıkırdağı kullanarak kulak rekonstrüksiyonunda önemli bir aşama kaydetmiş ve bu yöntemle kalıcı sonuçlar elde etmiştir. Kulak rekonstrüksiyonu için otojen kaburga kıkırdağı kullanımı, dayanıklılığı ve estetik sonuçlarıyla mikrotia rekonstrüksiyonunda en kalıcı tekniklerden biri olarak kabul edilmektedir (65).

Kıkırdak greftleri, doğuştan gelen kulak deformitelerinde olduğu kadar, travma, yanık ve trafik kazaları gibi durumların sebep olduğu edinilmiş deformitelerin tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, Pearl ve çalışma arkadaşları, parsiyel kulak defekti olan 50 hastada kostal kıkırdak grefti kullanarak başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir (66).

Otojen Kostal Kıkırdak Grefti ile Rekonstrüksiyon Avantajları (67, 68):

Biyouyumluluk: Kendi dokusundan elde edildiği için bağışıklık sistemi

tarafından reddedilme riski yoktur.

Kalıcı ve dayanıklı yapı: Kıkırdak doku zaman içinde stabil kalır ve uzun vadede komplikasyonlarla karşılaşmadığı müddetçe az miktarda değişikliğe uğrar.

Görünüm: Cerrahin deneyimine bağlı olarak estetik sonuçlar oldukça başarılı olabilir.

Gelişmiş cerrahi tekniklerle daha iyi şekillendirme: Cerrahi yöntemlerin ilerlemesiyle daha detaylı ve doğal kulak formları elde edilebilir.

Daha az komplikasyon: Uygun vakalarda iyi planlanmış bir otojen rekonstrüksiyon, alloplastik materyallere kıyasla daha düşük komplikasyon oranına sahiptir.

Otojen Kostal Kıkırdak Grefti ile Rekonstrüksiyon Dezavantajları (69, 70):

Çok aşamalı cerrahi gerektirir: Tipik olarak iki ila üç aşamalı bir operasyon sürecine sahiptir.

Donör saha morbiditesi: Kaburgadan kıkırdak alınması ağrı, skar oluşumu ve göğüs duvarı deformitesine yol açabilir.

Cerrahi zorluk: Kıkırdağın istenilen şekle getirilmesi teknik olarak oldukça zordur.

Çocuk hastalar için sınırlamalar: Kaburga gelişimi tam tamamlanmamış hastalarda bu prosedürün uygulanabilirliği sınırlıdır.

Operasyon zamanlaması: Kostal kartilajın elde edilmesi için uygun hasta yaşı beklenir.

2.2.3. Epitez ile Yapılan Kulak Rekonstrüksiyonu

Epitez (auriküler protez), doğumsal veya travmatik kulak kayıplarında rekonstrüksiyon amacıyla kullanılan alternatif bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

Özellikle cerrahi rekonstrüksiyon için uygun olmayan hastalar veya başarısız otolog rekonstrüksiyon geçiren bireyler için tercih edilmektedir. Epitezler, medikal yapıştırıcılar, implant tabanlı sistemler veya manyetik sabitleme mekanizmaları yerleştirilerek, hastanın yüz yapısına uygun şekilde tasarlanmaktadır. Günümüzde, 3D baskı ve bilgisayar destekli tasarım (CAD/CAM) teknolojileri, epitez üretim süreçlerini daha hassas hale getirmekte ve kişiye özel çözümler sunmaktadır (71).

Epitezlerin en büyük avantajları arasında kozmetik olarak tatmin edici sonuçlar sunması, cerrahi risk taşımaması ve geri dönüşümlü bir tedavi yöntemi olması bulunmaktadır. Bununla birlikte, medikal yapıştırıcı kullanılan epitezlerde deri tahrişi ve yapıştırıcının zamanla dayanıklılığını kaybetmesi gibi dezavantajlar görülebilir. Bu nedenle, osseointegrasyon sağlayan titanyum implantlarla sabitlenen epitezler, stabilite açısından daha başarılı sonuçlar vermektedir (72). Yapılan araştırmalarda, osseointegrasyonlu implant destekli epitezlerin uzun süreli kullanımda güvenilir olduğu ve estetik görünümü en iyi şekilde koruduğu belirtilmektedir. Örneğin, Yenisey ve ark. (73) çalışmasında, yapıştırıcı bazlı epitezlerin kısa vadede tatmin edici sonuçlar sağladığı ancak uzun vadede implant bazlı sistemlerin daha stabil olduğu vurgulanmıştır.

Sonuç olarak, epitezle yapılan kulak rekonstrüksiyonu, özellikle cerrahi işlem görmek istemeyen veya cerrahi için uygun olmayan hastalar için önemli bir seçenektir. Bilgisayar destekli üretim teknikleri, 3D baskı teknolojileri ve osseointegrasyon bazlı implant sistemleri, epitezlerin fonksiyonelliğini ve estetik başarısını artırmakta, bu yöntemin klinik uygulamalardaki yerini güçlendirmektedir (74).

2.2.4. Alloplastik Materyaller ile Rekonstrüksiyon

Alloplastik materyaller, canlı dokularla etkileşime girerek doku onarımı veya yapay doku oluşturma amacıyla kullanılan malzemelerdir. Kıkırdak rekonstrüksiyonu için kullanılan biyomateryallerin belirli özelliklere sahip olması gerekir:

- **Biyouyumluluk:** Kıkırdak dokusunda kullanılacak biyomateryallerin, vücudun bağışıklık sistemi tarafından reddedilmemesi önemlidir. Biyouyumlu materyaller, vücudun savunma mekanizmaları tarafından olumsuz bir tepkiyle

karşılaşmadan dokuyla entegre olur ve bu, tedavi sürecinin güvenli olmasını sağlar. İyi biyouyumluluğa sahip biyomateryaller, inflamasyon riskini en aza indirerek tedavi sürecini daha güvenli hale getirir (75).

- **Biyobozunurluk:** Kıkırdak dokusu yenilenirken biyomateryalin biyolojik olarak çözünebilir olması önemlidir. Biyobozunur malzemeler, iyileşme süreci boyunca vücut tarafından parçalanır ve yerini doğal dokuya bırakır. Bu özellik, dokunun iyileşme süreci sonunda biyomateryal kalıntısının kalmamasını sağlar (75).
- **Mekanik Dayanıklılık:** Kıkırdak dokusu, eklem bölgelerinde olduğu gibi yüksek basınca maruz kalır. Bu nedenle, biyomateryallerin dayanıklı olması gerekmektedir. Yeterli dayanıklılığa sahip materyaller, günlük yaşamda ortaya çıkan stresleri karşılayarak uzun vadeli bir çözüm sunar (76).
- **Esneklik ve Elastikiyet:** Kıkırdak doku gibi esneklik gerektiren yapılar için kullanılan biyomateryaller, doğal dokuya benzer bir esneklik sağlamalıdır. Esnek biyomateryaller, vücut içinde uyumlu hareket edebilir ve rahatlıkla entegre olabilir (77).

Günümüzde kulak rekonstrüksiyonu amacıyla en sık kullanılan alloplastik materyaller arasında **Gözenekli Polietilen (PP)**, **Silikon (Silastic)**, **Metaller (Tantal, Titanyum)**, **Akrilik ve Metil Metakrilat**, **Naylon Mesh** ve **Politetrafloroetilen (PTFE- Teflon)** bulunmaktadır. Her bir materyalin kendine özgü avantajları ve dezavantajları olup, kullanım alanları ve komplikasyon oranları yapılan klinik çalışmalara göre değişmektedir (78).

Poröz Polietilen

Poröz polietilen, günümüzde kulak rekonstrüksiyonunda en yaygın kullanılan alloplastik materyaldir. Biyouyumluluğunun yüksek olması ve doku büyümesine izin vermesi nedeniyle rekonstrüksiyon işlemlerinde sıklıkla tercih edilir. Özellikle Medpor gibi ticari isimlerle bilinen gözenekli polietilen implantlar, stabil yapısı ve enfeksiyon riskinin düşük olması sayesinde avantajlıdır. Yapılan çalışmalarda, poröz polietilen implantların otolog kıkırdak rekonstrüksiyonuna kıyasla daha az cerrahi aşama gerektirdiği ve komplikasyon oranlarının düşük olduğu gösterilmiştir (79).

Ayrıca, Kadah ve arkadaşları (80) tarafından yapılan bir araştırmada, gözenekli polietilen implantların iyi fonksiyonel sonuçlar sunduğu ve düşük oranda ciddi komplikasyonlar ile karşılaşıldığı bildirilmiştir.

Silikon (Silastic)

Silikon, ilk kullanılan alloplastik materyallerden biri olup, başlangıçta kulak protezi yapımında yaygın olarak kullanılmıştır. Yumuşak ve kalıplanabilir yapısı sayesinde kolay şekillendirilebilmesine rağmen, skar dokusu oluşumu, implant ekstrüzyonu ve enfeksiyon riski gibi komplikasyonlar nedeniyle zamanla klinik kullanımda azalmaya gitmiştir. Yapılan araştırmalarda, silikon implantların yüksek ekstrüzyon oranları ve yetersiz doku entegrasyonu nedeniyle günümüzde kulak rekonstrüksiyonu için önerilmediği belirtilmiştir (81).

Metaller (Tantal, Titanyum)

Geçmişte metaller, özellikle tantal ve titanyum, kulak rekonstrüksiyonunda denenmiş ancak çeşitli nedenlerle yaygın kullanımdan kaldırılmıştır. 1940’larda tantal tel kafesler kullanılmış ancak korozyona uğrama ve vücut tarafından iyi tolere edilmemesi nedeniyle bu yöntem zamanla terk edilmiştir. Titanyum ise biyouyumluluğu ve mekanik dayanıklılığı nedeniyle bazı özel implantlarda kullanılmaktadır. Özellikle osseointegrasyon yeteneği sayesinde çene ve yüz rekonstrüksiyonlarında başarıyla uygulanmaktadır (82). Bununla birlikte, Mevio ve ark. (83) tarafından yapılan bir çalışmada, osseointegre titanyum implantların kulak protezlerinin stabilizasyonunda etkili olduğu ancak doğrudan doku rekonstrüksiyonu için uygun olmadığı belirtilmiştir.

Akrilik ve Metil Metakrilat

Akrilik ve metil metakrilat geçmişte kulak rekonstrüksiyonunda kullanılmış ancak yüksek komplikasyon oranları ve biyouyumluluk problemleri nedeniyle günümüzde büyük ölçüde terk edilmiştir. Metil metakrilatın mekanik dayanıklılığı yüksek olmasına rağmen, implant sonrası inflamasyon ve doku reddi gibi olumsuzluklara neden olduğu bildirilmiştir. Kauke-Navarro ve ark. (84) tarafından yapılan bir incelemede, metil metakrilatın uzun vadede biyouyumluluk eksiklikleri

nedeniyle kullanımdan kaldırıldığı ve daha güvenli alternatiflerin geliştirildiği belirtilmiştir.

Naylon Mesh ve Politetrafloroetilen (PTFE- Teflon)

Naylon mesh ve PTFE (Teflon), geçmişte kulak rekonstrüksiyonunda alternatif olarak kullanılmış ancak yetersiz doku entegrasyonu ve sık komplikasyonlara yol açması nedeniyle günümüzde büyük ölçüde terk edilmiştir. PTFE implantlarının, enfeksiyon riskinin yüksek olması ve uzun vadede implant ekstrüzyonuna yatkın olması nedeniyle güvenilir bir seçenek olmadığı belirlenmiştir. Özkaya ve Erçöçen (85) tarafından yapılan bir çalışmada, PTFE bazlı implantların rekonstrüksiyon sonrasında yetersiz doku bütünleşmesi nedeniyle uzun vadede başarısız olabileceği ifade edilmiştir.

Alloplastik materyaller, kulak rekonstrüksiyonunda önemli bir seçenek olarak kullanılmaktadır. Günümüzde en yaygın tercih edilen materyal gözenekli polietilen olup, doku büyümesine izin vermesi, düşük enfeksiyon riski ve uzun süre stabil kalması gibi avantajlar sunmaktadır. Silikon, metaller, akrilik ve PTFE gibi diğer alloplastik materyaller ise yüksek komplikasyon oranları, biyouyumluluk eksiklikleri veya ekstrüzyon riskleri nedeniyle günümüzde sınırlı olarak kullanılmaktadır. Gelecekte, biyouyumlu polimerlerle yapılan yeni nesil implantların ve 3D baskı teknolojisinin bu alanda daha fazla kullanılacağı öngörülmektedir (3).

Alloplastik materyaller ile yapılan rekonstrüksiyonun avantajları;

Alloplastik materyaller, özellikle poröz polietilen(Medpor) gibi biyouyumlu implantlar, otojen kıkırdak yerine kullanıldığında çeşitli avantajlar sunar. En önemli avantajlardan biri, bu yöntemlerin genellikle tek aşamalı cerrahi ile tamamlanabilmesidir, bu da hem cerrah hem de hasta için operasyonel konfor sağlar (86).

Ayrıca, bu tekniklerde kaburgadan kıkırdak alınmasına gerek kalmaz, bu da donör saha morbiditesini ortadan kaldırır (79). Bu durum hastalar açısından hem daha az ağrı hem de daha hızlı iyileşme süreci anlamına gelir (68).

Son yıllarda geliştirilen yüksek yoğunluklu poröz polietilen implantlar sayesinde biouyum ve estetik uyum artmıştır. Bu implantlar yumuşak doku içine entegrasyon göstererek daha stabil ve doğal görünümlü kulak yapılarının elde edilmesini mümkün kılmaktadır (87). Bu avantajlar, özellikle hasta memnuniyetini olumlu yönde etkileyebilir.

Dezavantajları:

Her ne kadar pratik avantajlar sunsa da alloplastik materyallerle yapılan kulak rekonstrüksiyonu bazı riskleri de beraberinde getirir. Literatürde en sık bildirilen komplikasyonlar arasında enfeksiyon ve ekstrüzyon yer alır. Örneğin, Medpor ile yapılan rekonstrüksiyonlarda %15 oranında enfeksiyon veya ekstrüzyon komplikasyonu bildirilmiştir, bu oran otojen kıkırdak kullanılan olgularda yalnızca %2'dir (68).

Biyolojik entegrasyon eksikliği, alloplastik materyallerin en önemli dezavantajlarından biridir. Otojen dokularla karşılaştırıldığında, implantlar genellikle yeterli düzeyde damarlanma ve doku uyumu gösteremez. Bu durum, zaman içinde implantın yer değiştirmesi, kırılması veya cilt altından görünür hale gelmesi gibi sorunlara yol açabilir (88).

Ayrıca, bazı serilerde uzun dönem takiplerde implantın formunun bozulduğu ve deformasyon geliştiği rapor edilmiştir (89). Bu nedenle, uzun vadeli stabilite açısından dikkatli hasta seçimi ve teknik planlama gerekmektedir.

2.2.4. 3D Biyobaskı ile Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Doku mühendisliği, hücreler, biyomateryaller ve biyolojik faktörler kullanılarak doğal dokuların fonksiyonel ve yapısal özelliklerini yeniden yaratmayı amaçlar. Kıkırdak yenilenmesinde doku mühendisliği; biyomateryaller, büyüme faktörleri ve kök hücreler gibi biyolojik bileşenleri bir araya getirerek yeni ve işlevsel kıkırdak dokusu oluşturmayı hedefler (90).

- **Hücre Kaynakları:** Kıkırdak yenilemede en yaygın hücre kaynağı olan kondrositler, yeni kıkırdak dokusu oluşumunda anahtar rol oynar. Ayrıca,

mezenkimal kök hücreler gibi çok yönlü hücreler de farklılaşarak kondrositlere dönüşebilmekte ve yeni kıkırdak dokusu oluşumunu desteklemektedir (91).

- **Büyüme Faktörleri ve Biyoaktif Moleküller:** Hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik eden büyüme faktörleri, kıkırdak doku mühendisliğinde sıkça kullanılmaktadır. Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) ve Bone Morphogenetic Protein (BMP) gibi faktörler, kondrositlerin sağlıklı bir şekilde çoğalmasını ve kıkırdak benzeri bir doku oluşturmasını sağlar (92).
- **Hücre İskelesi Kullanımı:** Doku mühendisliğinde, hücrelerin büyümesi ve kıkırdak dokusu oluşturması için biyomateryallerden yapılan hücre iskeleleri kullanılır. Hücre iskeleleri, hücrelerin organizasyonunu sağlar ve doğal yapıya uygun bir doku oluşumu teşvik eder (92).

Günümüzde kulak rekonstrüksiyonu için 3D biyobaskı ile üretilen malzemeler üç ana grupta incelenmektedir: biyobaskıya uygun biyomalzemeler, canlı hücre kaynakları ve destekleyici biyoaktif bileşenler. Bu malzemeler, biyobaskı tekniğiyle kişiye özel tasarlanarak üretilen doku iskelelerinin biyomekanik ve biyolojik özelliklerini optimize etmeye yönelik seçilmektedir (3).

- Biyobaskıya uygun biyomalzemeler arasında polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polidimetilsiloksan (PDMS), termoplastik poliüretan (TPU) ve hidrojel bazlı materyaller (metakrilat modifiye jeller, aljinat, fibrin, kollajen, hyaluronik asit) yer almaktadır. PCL, biyobozunur ve termoplastik bir polimer olup, yavaş bozunma özelliği sayesinde uzun süre mekanik destek sağlayarak doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir (93). PLA ve PGA, biyoyumlu polimerler olup, PGA'nın hızlı bozunma özelliği nedeniyle doku rejenerasyonunu teşvik edebildiği belirtilmiştir. Hidrojel bazlı materyaller, hücre kültürleri için uygun bir ortam sunarak yumuşak doku mühendisliğinde kullanılır ve yüksek su içeriği sayesinde hücrelerin büyümesini destekler (94).
- Canlı hücre kaynakları ise kıkırdak hücreleri (kondroblastlar/kondrositler), mezenkimal kök hücreler (MSC) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler

(iPSC) olarak gruplandırılmaktadır. Hastanın kendi kıkırdak hücrelerinden laboratuvar ortamında çoğaltılan kondrositler, biyobaskı yöntemiyle doku iskelesine eklenerek yeni kulak kıkırdağının oluşturulmasını sağlar. Mezenkimal kök hücreler (MSC), adipoz dokudan veya kemik iliğinden elde edilerek kıkırdak ve bağ dokusunun rejenerasyonunu destekler. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC) ise kişiye özel hücresel tedavilerde umut vadeden bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (95).

- Destekleyici biyoaktif bileşenler arasında büyüme faktörleri (TGF- β , VEGF, FGF), nanopartiküller (hidroksiapatit, grafen oksit, gümüş nanopartiküller) ve dokuya özgü biyomateryaller bulunmaktadır. Büyüme faktörleri, kıkırdak ve damar oluşumunu destekleyerek doku iskelesinin canlı dokularla bütünleşmesini hızlandırmaktadır. Özellikle VEGF'nin anjiyogenezi artırarak vaskülarizasyonu teşvik ettiği gösterilmiştir (96). Hidroksiapatit ve grafen oksit gibi nanopartiküller, mekanik dayanıklılığı artırarak biyomalzemelerin uzun ömürlü olmasını sağlar ve antibakteriyel özellik kazandırır (97). Ayrıca, hücresel adezyonu artıran dokuya özgü biyomateryaller, kollajen türevleri ve elastin bazlı polimerler de biyobaskı için geliştirilmektedir (98).

Sonuç olarak, 3D biyobaskı ile üretilen kulak doku iskeleleri, biyomalzemeler, canlı hücre kaynakları ve biyoaktif bileşenlerin entegrasyonu ile kişiye özel tedavi çözümleri sunmaktadır. Biyobaskıya uygun polimerik malzemeler, hücresel büyümeyi destekleyen biyomürekkepler ve biyolojik katkılar sayesinde, kulak rekonstrüksiyonunda daha başarılı sonuçlar elde edilmesi mümkün hale gelmektedir.

3D Biyobaskı ile Doku Mühendisliği Yaklaşımlarının Avantajları:

Kişiye özel tasarım: Bireysel anatomik farklılıklar göz önünde bulundurularak özel üretim yapılabilir.

Daha az cerrahi travma: Kaburga kıkırdağı gerektirmez, böylece iyileşme süreci daha konforlu olabilir.

Biyouyumlu malzemeler: Kullanılan biyopolimerler hücre göçü ve doku entegrasyonuna izin verir.

Uzun vadeli gelişim potansiyeli: Gelişen teknoloji ile ilerleyen yıllarda biyolojik uyumu artırılmış, dayanıklı yapılar üretilebilecektir.

Regeneratif tıbbın ilerlemesi: Gelecekte daha gelişmiş biyoteknolojik çözümler sunma potansiyeli taşır.

3D Biyobaskı ile Doku Mühendisliği Yaklaşımlarının Dezavantajları:

Henüz deneysel aşamada: Uzun süreli klinik sonuçları henüz net değildir.

Mekanik dayanıklılık sorunları: Doku iskeleleri zamanla bütünlüğünü kaybedebilir.

Maliyet: Gelişmiş laboratuvar altyapısı ve ileri teknoloji gerektirir.

Uzun vadeli biyolojik stabilite bilinmiyor: İnsan üzerindeki uzun vadeli başarı oranları henüz belirlenmemiştir.

2.2.5. Kişiyeye Özel Dış Kulak Rekonstrüksiyonunda 3D Baskı ile Üretilen PDMS ve TPU İçeren Kompozit Doku İskeleleri

Dış kulak malformasyonları, doğumsal anomaliler veya travma sonrası meydana gelen deformasyonlar nedeniyle fonksiyonel ve estetik açıdan ciddi problemlere yol açmaktadır. Günümüzde bu tür deformitelerin rekonstrüksiyonu, genellikle otojen kosta kıkırdak greftleri veya alloplastik materyallerin implantasyonu ile gerçekleştirilmektedir (16). Ancak, otojen greftlerin sınırlı esnekliğe sahip olması ve zamanla rezorpsiyona uğraması, alloplastik materyallerin ise enfeksiyon ve ekstrüzyon riski taşıması gibi dezavantajları bulunmaktadır (99). Bu nedenle, biyoyumlu ve uzun ömürlü doku iskelelerinin geliştirilmesi, dış kulak rekonstrüksiyonunda önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir.

Son yıllarda, 3D biyobaskı teknolojisi, kişiyeye özel doku iskelelerinin üretimi için umut verici bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. 3D baskı, gözenekli ve kompleks yapıların üretilmesini sağlayarak hücre tutunmasını, proliferasyonunu ve doku gelişimini destekleyen biyomalzemelerle kombine edilebilmektedir (100).

PDMS ve TPU'nun Kimyasal Özellikleri ve Skafold Yapısındaki Rolü

Polidimetilsiloksan (PDMS)

PDMS, biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan hidrofobik, esnek ve yüksek biyouyumluluk gösteren bir polimerdir. Kimyasal yapısında bulunan Si-O-Si (silikon-oksijen) bağları, PDMS'e yüksek termal stabilite ve mekanik dayanıklılık kazandırmaktadır. Bu özellikler sayesinde PDMS, biyomalzeme skafoldları için ideal bir bileşendir (16).

Ancak, PDMS'in doğal haliyle hücre yapışmasını desteklemediği bilinmektedir. Bu sorunun aşılması için yüzey modifikasyonları, plazma işlemleri, polidopamin kaplamalar ve protein adsorpsiyonu gibi teknikler uygulanmaktadır (101). PDMS'in mikro-gözenekli yapılarla basılması, fibroblast hücrelerinin tutunma kapasitesini artırarak, doku mühendisliği uygulamaları için uygun hale getirilmesini sağlamaktadır (102).

Termoplastik Poliüretan (TPU)

TPU, esnekliği, yüksek aşınma direnci ve hidrofilik yüzey özellikleri sayesinde biyomedikal doku iskeleleri için önemli bir alternatiftir (99). TPU'nun kimyasal yapısı, yumuşak ve sert segmentlerden oluşmaktadır, bu da ona yüksek mekanik dayanım ve esneklik kazandırmaktadır. TPU'nun biyouyumluluğu ve hücre adezyon kapasitesi yüksektir, bu nedenle doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Gözenekli TPU skafoldları, fibroblast hücrelerinin yayılmasını artırarak, kıkırdak doku mühendisliği için umut vadeden bir yapı oluşturur. TPU'nun modifikasyonu ile hücre tutunması artırılabilir ve kondroindüktif özellikler kazandırılabilir (103).

PDMS ve TPU'yu Birleştirmenin Avantajları

Polidimetilsiloksan (PDMS) ve termoplastik poliüretan (TPU), biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan iki önemli biyomalzemedir. PDMS, yüksek biyouyumluluk ve düşük sitotoksisite özellikleri sayesinde doku mühendisliğinde tercih edilirken, esnekliği sayesinde özellikle yumuşak doku uygulamalarında

kullanıma uygundur. Ancak hidrofobik yapısı hücre adezyonunu zorlaştırabilir, bu nedenle modifikasyon gerektirebilir (16). TPU ise yüksek mekanik dayanıklılığı, elastik yapısı ve işlenebilirliği sayesinde doku iskelesi üretiminde önemli bir malzeme olarak kullanılır. Hücrelerin tutunmasını kolaylaştıran yüzey yapısı ile doku mühendisliği uygulamalarında avantaj sağlar (104).

Bu iki malzemenin birleşimi ile oluşturulan kompozit doku iskelesi, tek başına kullanılan malzemelere kıyasla birçok avantaj sunmaktadır. TPU'nun mekanik dayanıklılığı ve PDMS'in esnekliği bir araya getirilerek biyomekanik olarak doğal dokuya daha yakın bir yapı elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra, TPU'nun hidrofilik özellikleri PDMS'in hidrofobik yapısını dengeler, böylece hücre adezyonu ve proliferasyonu artırılır (105). Ayrıca, kompozit yapı sayesinde mikro gözeneklilik oranı optimize edilerek besin ve oksijen difüzyonu iyileştirilmiş olur. Bu sayede, iskelenin hücrelerle daha iyi etkileşime girmesi ve uzun vadede daha başarılı doku entegrasyonu sağlanması hedeflenmiştir (106).

2.3.Doku iskelelerine hücre ve biyolojik bileşen eklenmesi

3D baskı ile üretilen doku iskelelerine farklı amaçlar için biyoaktif bileşenler ve hücreler eklenebilmektedir. Bu amaçlar arasında hücre tutunmasını arttırmak, proliferasyon ve farklılaşmayı desteklemek, mekanik dayanıklılığı arttırmak, antibakteriyel veya antienflamatuar etkileri arttırmak sayılabilir (107).

Eklenecek biyolojik materyaller kaynağına göre doğal veya sentetik olarak ayrılmaktadır. Eklenebilecek doğal biyolojik materyaller; proteinler, (kollajen, fibronectin, laminin, elastin), polisakkaritler (kitosan, aljinat, hyaluronik asit) ve biyoaktif peptidleri içerebilir. Sentetik olarak ise polimerler (PLA, PGA, PLGA) ve biyoseramikler (hidroksiapatit, kalsiyum fosfat) doku iskelelerine eklenebilmektedir. Doku mühendisliği alanında üretilen doku hedefine göre seçilecek bileşen değişiklik gösterecektir (108).

Doku iskelelerine farklılaşmış veya farklılaşmamış hücreler eklenerek de doku iskelelerinin biyolojik olarak daha işlevsel hale gelmesi hedeflenebilmektedir. Bu amaçla eklenecek hücreler iki grupta incelenir.

1.Kök hücreler (109)

- **Embriyonik Kök Hücreler (ESCs):** Pluripotent özellikleri sayesinde birçok farklı hücre tipine dönüşebilirler.
- **Mezenkimal Kök Hücreler (MSCs):** Kemik iliği, yağ dokusu ve göbek kordonu gibi kaynaklardan elde edilir ve kemik, kıkırdak, kas gibi dokuların yenilenmesini destekler.
- **İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPSCs):** Yetişkin hücrelerin genetik olarak yeniden programlanmasıyla elde edilir ve kişiye özel tedavilerde önemli bir potansiyele sahiptir.

2. Farklılaşmış Hücreler (110)

Üretilmek istenen doku hedefine göre alternatif seçimler yapılabilmektedir. Bu amaçla osteoblastlar, kondrositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler ve nöronlar farklı alternatifleri oluşturmaktadır.

Hücrelerin doku iskeletine başarılı bir şekilde eklenmesi, iskeletin fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücrelerin uygun bir mikroçevrede bulunmasıyla doğrudan ilişkilidir. Bu süreç şu aşamaları içerir:

1. **Hücre Yükleme:** Hücreler, biyouyumlu doku iskeletleri üzerine doğrudan ekilebilir veya belirli biyomühendislik teknikleri ile homojen dağılımı sağlanabilir.
2. **Hücre Adezyonu:** Hücrelerin iskeleye başarılı bir şekilde tutunmasını sağlamak için yüzey modifikasyonları (RGD peptitleri, kollajen kaplamalar vb.) uygulanabilir.
3. **Hücre Proliferasyonu ve Farklılaşması:** Uygun büyüme faktörleri (VEGF, BMP, FGF) ve biyokimyasal sinyaller kullanılarak hücre çoğalması ve istenilen hücre tipine dönüşümü teşvik edilir.
4. **Biyoreaktör Kullanımı:** Hücrelerin uygun oksijen, besin ve mekanik uyarıları almasını sağlamak için biyoreaktör sistemleri kullanılabilir.

Fibroblast Eklenmiş Doku İskelelerinin Önemi

Fibroblast hücreleri, bağ dokusunun temel bileşeni olup, ekstrasellüler matriks sentezi ve yara iyileşme süreçlerinde önemli rol oynar (111). PDMS ve TPU bazlı skafoldların doku ile etkileşimini arttırmak için fibroblast kültürü kritik bir adımdır (112).

Fibroblastlar, skafold yüzeyinde adezyon, proliferasyon ve hücre dışı matriks (ECM) üretimi ile skafoldun biyoyumlu olup olmadığını gösteren temel hücre tiplerinden biridir. PDMS ve TPU skafoldları üzerine fibroblast eklenmesiyle hücre büyümesi, gözenekler boyunca hücre göçü ve doku entegrasyonu incelenmektedir (113).

Doku mühendisliği uygulamalarında fibroblast hücrelerinin kullanımı oldukça yaygındır. Fibroblastlar, doku yenilenmesini hızlandıran ve ekstrasellüler matriks (ECM) üretiminden sorumlu hücrelerdir. Fibroblastların doku iskelelerine eklenmesinin temel nedenlerinden biri, iskelenin biyoyumluluğunu arttırmak ve hücrelerin iskelenin yüzeyine ne kadar iyi tutunduğunu gözlemlemektir (114). Bunun yanı sıra, fibroblastların salgıladığı kollajen ve elastin gibi matriks proteinleri sayesinde iskelenin doku entegrasyon kapasitesi değerlendirilmektedir (115).

PDMS ve TPU'nun birleştirilmesiyle elde edilen kompozit doku iskelelerine eklenecek fibroblast hücreleri sayesinde iskelelerin doku ile entegrasyonun artışının bir diğer göstergesi de fibroblastlar tarafından yara iyileşme sürecinde salgılanacak VEGF, FGF vb. büyüme faktörleri aracılığıyla artacak anjiyogenezdır. Çalışmamızda 3D baskı ile oluşturulmuş dermal fibroblast ile kaplanmış PDMS ve TPU içeren kompozit doku iskelelerinin in vivo koşullarda oluşturduğu anjiyogeneze artışı yeni oluşan damar endotel hücrelerinden eksprese edilen CD31 ve VEGF reseptörlerinin histolojik boyanmasıyla gösterilecektir.

Sonuç ve Gelecekteki Potansiyel

Biyomateryaller ve doku mühendisliği, kırık dokunun rekonstrüksiyonunda yeni olanaklar sunarak hastaların yaşam kalitesini artırmayı amaçlar. Kırık dokunun zor iyileşme sürecini destekleyen bu teknolojiler, özellikle kırık yaralanmaları ve

deformasyonların tedavisinde büyük umut vaat etmektedir. Gelecekte, biyomateryallerin ve hücre kültürlerinin daha da geliştirilmesiyle, kıkırdak rekonstrüksiyonunda daha etkili ve uzun ömürlü tedavi seçeneklerinin ortaya çıkması beklenmektedir (116)

Sonuç olarak, PDMS ve TPU'nun birleşimiyle oluşturulan kompozit doku iskelesi, biyouyumluluk, mekanik dayanıklılık ve hücre adezyonu açısından üstün özellikler sunmaktadır. Çalışmamızda fibroblast hücreleri kullanılarak iskelenin biyolojik performansının artışı değerlendirilmekte, hücresel entegrasyon kapasitesi ve yara yatağında oluşturduğu anjiogenez değişiklikleri test edilmektedir. Biyomateryallerin hücresel ve vasküler entegrasyon kapasitesini değerlendirmek için anti-VEGF ve anti-CD31 antikorlarıyla yaptığımız histolojik çalışmalar ile kompozit doku iskelelerinin yenileyici tıp ve doku mühendisliği uygulamalarındaki potansiyelini ortaya koymayı amaçladık.

3.MATERYAL ve METOT

Çalışmanın konusu; ‘Üç Boyutlu Dermal Fibroblast İçeren Termoplastik Poliüretan ve Polidimetil Siloksan Doku İskelelerinin Yara Yatağında Oluşturduğu Mikrovasküler Değişikliklerin İncelenmesi’ olarak belirlenmiştir.

Etik Kurul;

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 02 Ekim 2024 tarih ve 04/17 sayılı etik kurul onayı (EK-1) alındıktan sonra başlanmıştır.

Çalışmanın Seyri;

1. PDMS, TPU ve PDMS-TPU kompozit doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonları:

Deney kapsamında kulağın elastik kıkırdak yapısının esnek özellikteki alloplastik materyal olan PDMS ile taklit edilmesi amaçlanmıştır. PDMS, geliştirilen diğer silikon bazlı bileşiklerden oluşan yüksek performanslı silikon bir elastomerdir. Optik şeffaflık, termal kararlılık, mekanik avantajları; oksidasyon ve hidrolize karşı direnci nedeniyle çok sayıda medikal uygulamada kullanılmaktadır. TPU materyali ise biyouyumluluğundan dolayı hücre adezyonunu sağlamak için kullanılmıştır. Bu iki materyalden üretilen doku iskeleleri entegre edilerek PDMS-TPU kompozit doku iskelesi elde edilmiştir.

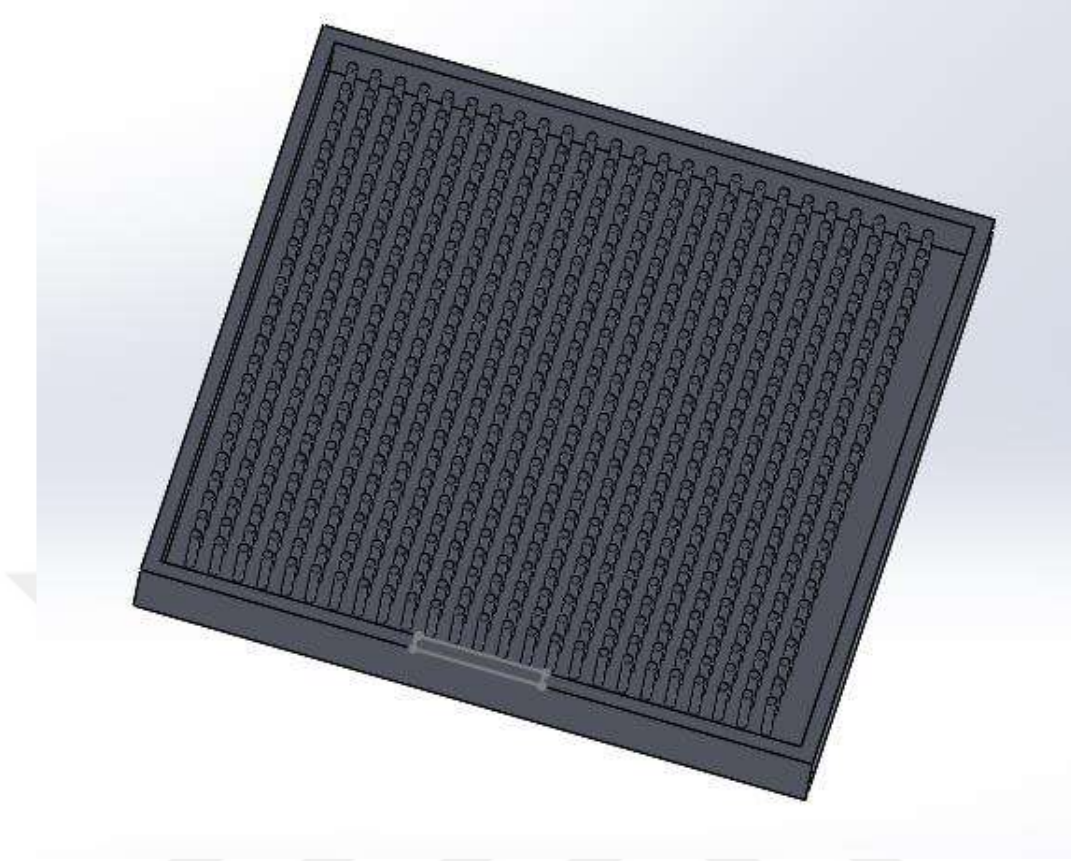
1.1. PDMS doku iskelelerinin üretimi:

PDMS, elastomer reçinesi olarak da adlandırılan bir ön polimer bazının ve sertleştirici olarak da adlandırılan sertleştirici ajanın karıştırılmasıyla üretilmektedir. Karıştırıldıktan sonra, polimer çapraz bağlanmaya uğrar ve 48 saat içinde kürlenir. 10:1 reçinenin sertleştiriciye standart karıştırma oranı, hiperelastiklik, yüksek yüzey yapışması ve düşük Young modülü sergileyen bir malzeme üretse de bu özellikler karıştırma oranını artırarak veya azaltarak çeşitli uygulamalar için değiştirilebilmektedir.

Doku iskelesi üretiminde 3D baskı ile PDMS üretimi başarılı olamamıştır. Bu sebep ile alternatif yöntemler denenmiştir.

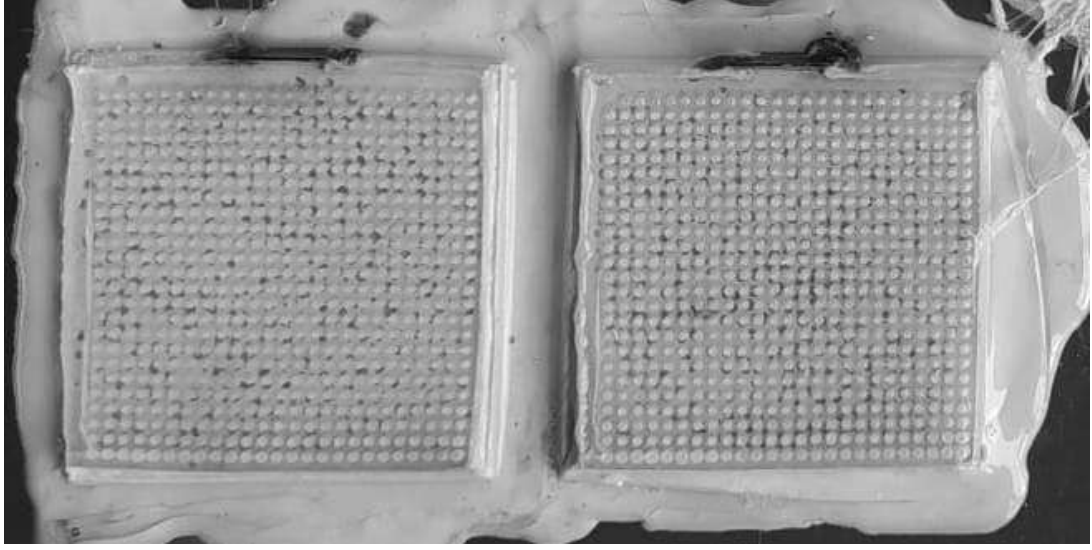
İlk olarak, PLA kalıp malzemesi yardımı ile üretim çalışmaları yapılmıştır. Kalıp tasarımı CAD / CAM yazılımı olan Solidworks 2019 ile Şekil 5'deki gibi modellenmiştir. Model çizimi. stl formatında alınarak, Ultimaker Cura 4.11 programı ile makine dili olan .gcode formatında dilimlenmiştir. Dilimleme işleminden sonra kalıp üretimi; 3D yazıcı kullanılarak PLA malzemesi ile hazırlanmıştır. 300 mikronluk ekstrüzyon nozulu ile 0.2 mm'lik bir tabaka kalınlığı ve 205°C de basımı gerçekleştirilmiştir.

PDMS (Sylgard 184, Dow Corning Corporation) doku iskeleleri 3D yazıcı kullanılarak PLA malzemedan kalıp yardımı ile oluşturulmuştur. PDMS ve sertleştirici ajan ağırlıkça 10:1 oranında karıştırılmış ve 10 dakikalık homojenizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Karışım, PLA kalıp içerisine ve 24 saat 40°C etüvde kürleşmesinin tamamlanması beklenmiştir. 24 saat sonunda PDMS' in kürlenmesi gözlemlendikten sonra PLA kalıp malzemesinin uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. PDMS gözenekli yapısının elde edilmesi için erime noktası 205°C olan kalıp 240°C kadar ısıtılıp sadece PDMS'in kalması için çalışılmıştır. Fakat Şekil 6'te görüldüğü gibi doku iskelesinin gözenekli yapısının düşük olması bakımından verimli olmamıştır.

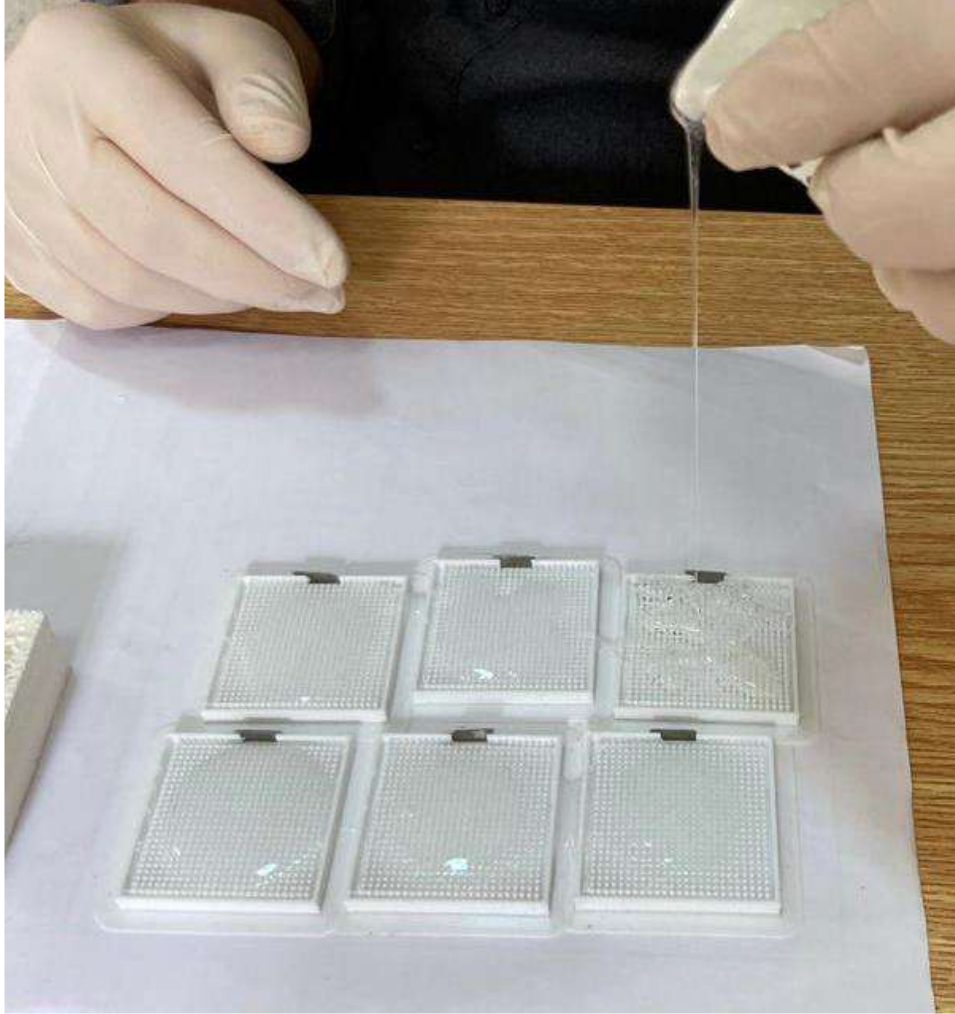


Şekil 5: 3D Modellenmiş PDMS kalıp.

PLA malzemeden istenilen verimin alınamaması sebebiyle üretim yönteminde küçük bir değişiklik yapılarak 3D baskıya uygun polivinil alkol (PVA) malzemesi kullanılarak kalıpların üretimi gerçekleştirilmiştir. 3D basım parametreleri olarak yukarıda belirtilen PLA baskı protokolü izlenmiş, yalnızca malzemeye yönelik baskı sıcaklığı 210°C olarak değiştirilmiştir. Üretilen PVA kalıpların üzerine yine aynı karışıma sahip PDMS malzemesi Şekil 7'deki gibi eklenmiş ve aynı prosedürle kürleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

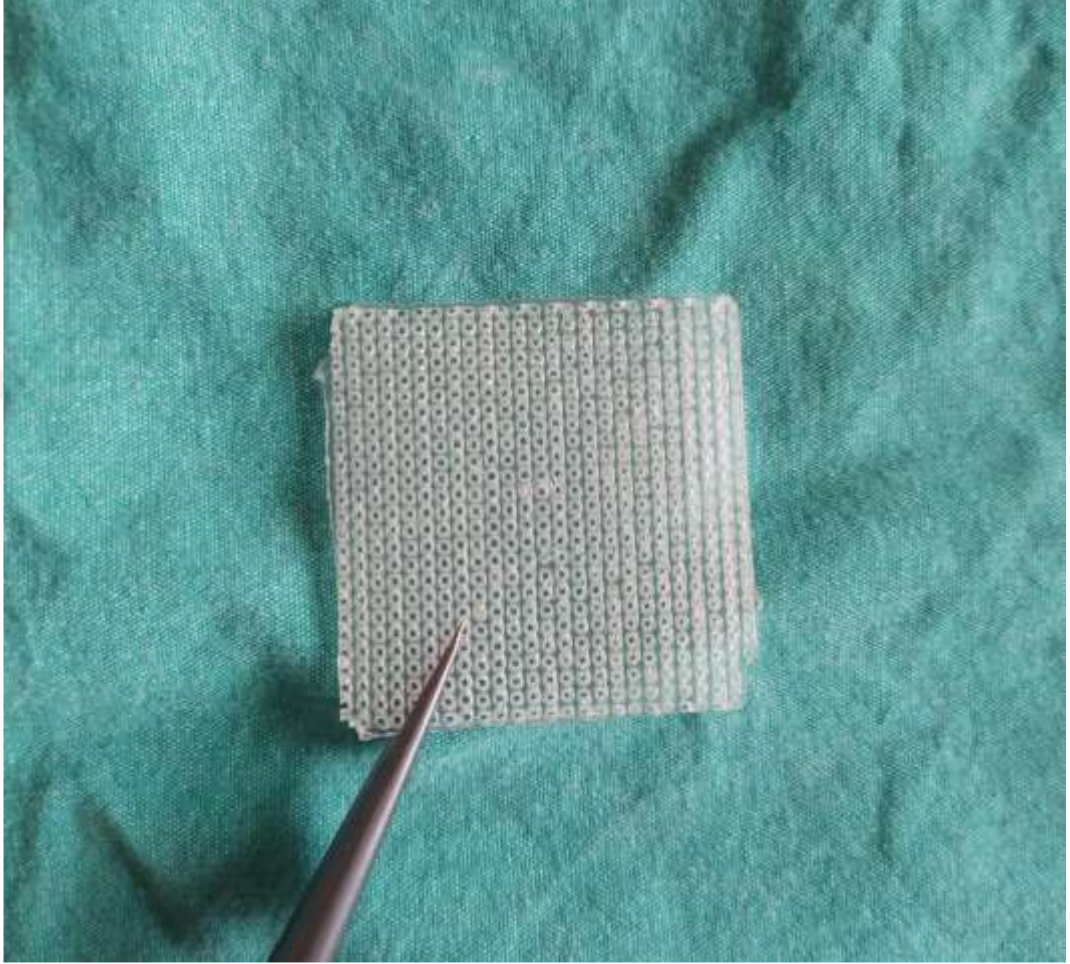


Şekil 6: PLA kalıptan PDMS'in çıkarılması işleminin sonucu elde edilen yapı.



Şekil 7: PVA kalıp ve PDMS uygulaması.

Kürlenme tamamlandıktan sonra PVA kalıp suda çözündürülerek uzaklaştırılmış ve geriye PDMS doku iskelesinin kalması sağlanmıştır. Prosedür sonucunda elde edilen PDMS doku iskeleleri Şekil 8’de görülmektedir.



Şekil 8: PVA kalıbından çıkan PDMS doku iskelesi.

Elde edilen PDMS doku iskeleleri, karakterizasyon ve hücre kültürü uygulamalarında kullanılmak üzere 6 mm lik çap ve 2 mm yükseklik olacak şekilde hazırlanmıştır.

1.2. TPU doku iskelelerinin üretimi:

TPU İskeleler ise, TPU malzemesi ile özel tasarım birleştirmeli yığma modellemesi (BYM) 3D yazıcı kullanılarak hazırlanmıştır. 300 mikronluk ekstrüzyon nozulu ile 0,2 mm'lik bir tabaka kalınlığı oluşturulmuştur. TPU malzemenin 220°C nozul sıcaklığı kullanılarak ekstrüzyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Baskı yatağı

sıcaklığı ise adezyon için 60°C, %80 akış hızı uygulanarak %40'lık bir doluluk oranı ile basım işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen TPU doku iskeleleri Şekil 9'da verilmektedir.

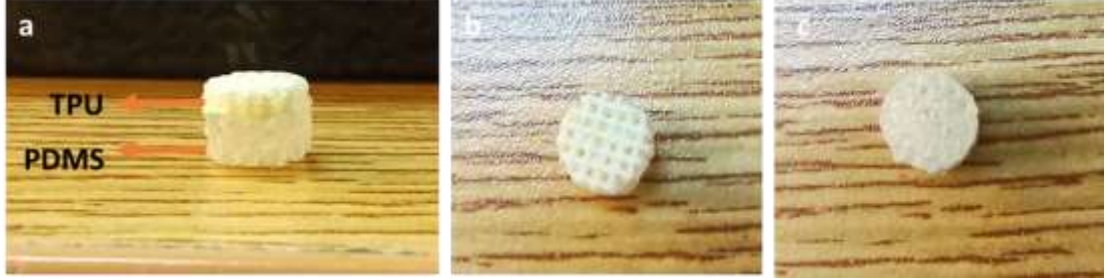


Şekil 9: Elde edilen TPU doku iskeleleri.

1.3. PDMS ve TPU doku iskelelerinin entegrasyonu

PDMS malzemesinin kürleşme özelliğinden yararlanılarak PVA malzemesinden 3D baskı kullanılarak PDMS malzemesinde gözenek yaratacak ve TPU iskeleyi de içine alacak şekilde kalıp tasarlanmıştır. PVA kalıp üzerine üretilen TPU doku iskeleleri yerleştirilmiştir. PDMS ve sertleştirici ajan 10:1 ağırlık oranında karıştırılarak TPU üzerine ilave edilmiştir. Malzemenin kürleşmesi için 48 saat 60°C lik etüvde bekletilmiştir. Böylelikle TPU ve PDMS malzemelerinin birbiri ile entegrasyonu sağlanmıştır. Elde edilen PDMS-TPU doku iskeleleri Şekil 10'da

verilmektedir. Elde edilen yapıda üstte TPU, altta ise PDMS olduğu görülmektedir (Şekil 10a).

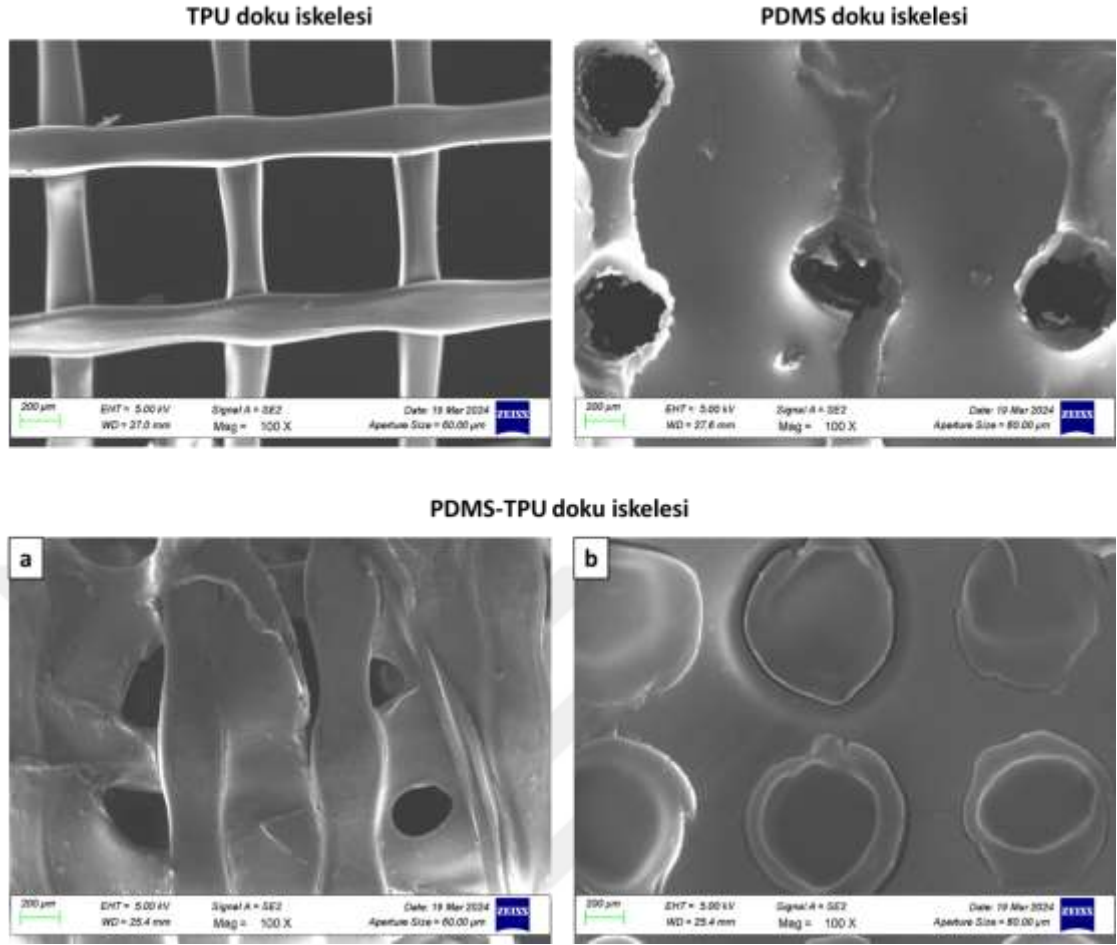


Şekil 10: Üretilen PDMS-TPU doku iskelelerinin a)yandan b)üstten ve c)alttan görüntüsü.

1.4. Morfoloji karakterizasyonu

Doku iskelelerinin morfoloji karakterizasyonları taramalı elektron mikroskobu (SEM) (ZEISS EVO HD15) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler, görüntüleme öncesinde ince bir altın/paladyum tabakası ile kaplanmıştır.

Şekil 11’de doku iskelelerinin 100x büyütmedeki SEM görüntüleri görülmektedir. PDMS doku iskelesindeki gözeneklerin, TPU doku iskelesinde olduğu gibi elde edilmediği sonucuna varılmıştır. PDMS-TPU doku iskelesinin üst tarafında TPU yer aldığı için, doku iskelesinin üstünden alınan SEM görüntüsünde de (Şekil 11a) gözenekli bir yapı olduğu görülmektedir. Ancak, PDMS kısmının SEM görüntüsünde (Şekil 11b) gözeneklerin kapalı olduğu görülmüştür.



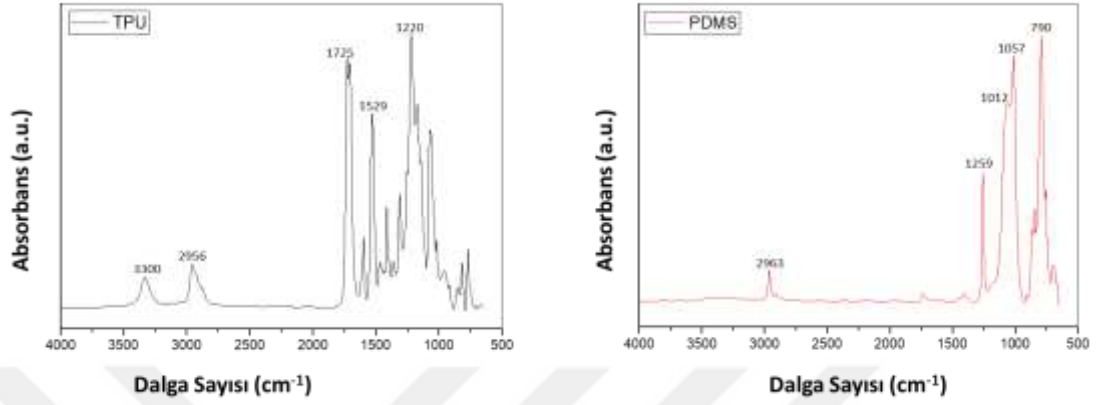
Şekil 11: TPU, PDMS ve PDMS-TPU doku iskelesinin üstten (a) ve alttan (b) SEM görüntüleri.

1.5. Kimyasal yapı karakterizasyonu

Doku iskelelerinin kimyasal yapı analizleri ATR ünitesi eklentili Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) (Perkin Elmer Spectrum BX) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri her örnek için $4000-650\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 25 tarama ile yapılmıştır. TPU ve PDMS doku iskelesine ait FTIR spektrumları Şekil 8’de gösterilmektedir. TPU’nun karakteristik pikleri; $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ ’de O-H ve N-H gerilme bantları, $\sim 2956\text{ cm}^{-1}$ ’de C-H gerilme bandı, $\sim 1725\text{ cm}^{-1}$ ’de C=O gerilme bandı, $\sim 1529\text{ cm}^{-1}$ ’de C-N gerilme bandı ve $\sim 1220\text{ cm}^{-1}$ ’de C-O gerilme bandı olarak sıralanabilir.

PDMS’in karakteristik bandları ise; $\sim 2963\text{ cm}^{-1}$ ’de C-H gerilme bandı, $\sim 1259\text{ cm}^{-1}$ ’de Si-CH₃ teki C-H eğme bandı, ~ 1012 ve 1057 cm^{-1} ’de Si-O-Si gerilme bandı

ve $\sim 790\text{ cm}^{-1}$ 'de $-\text{CH}_3$ asimetrik bükülme ve Si-C asimetrik gerilme bandı olarak gözlenmiştir.



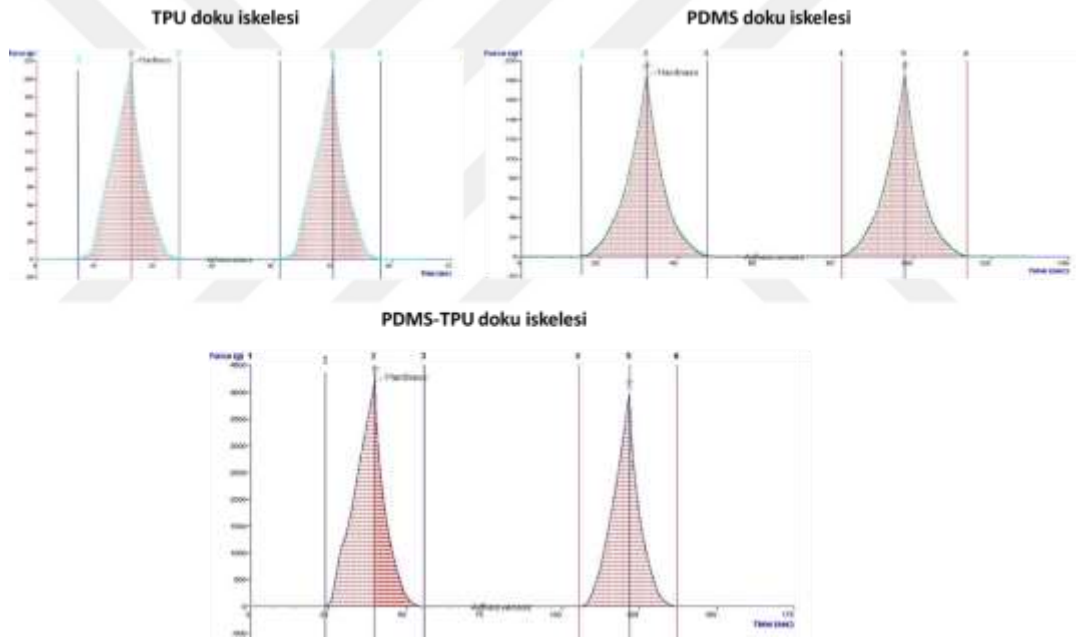
Şekil 12: TPU ve PDMS doku iskelelerinin FTIR spektrumları.

1.6. Yüzey Analizi

Doku iskeleleri 5 kgf'lık yük hücresine (TA. XT Plus) sahip tekstür analiz cihazı tarafından iki döngülü basma testine tabi tutulmuştur. Doku iskeleleri ($n=5$), %40 deformasyona kadar 0,05 mm/s test hızında iki kez sıkıştırılmıştır. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve sertlik, kohezyon ve yaylanabilirlik değerleri elde edilmiştir.

Deney sonucunda elde edilen kuvvet-zaman grafikleri Şekil 13'de görülmektedir. Sertlik, kohezyon ve yaylanabilirlik değerleri grafiklerdeki bazı noktalar (1'den 6'ya kadar numaralandırılmış), bu noktalar arasındaki alanlar (A1-2, A2-3, A1-3, A4-6) ve zaman aralıkları (T1-2, T4-5) yardımı ile elde edilmiştir. Sertlik, önceden belirlenen %40'luk bir deformasyon için gerekli olan kuvvet olarak tanımlanmış ve doku iskelelerinin ilk sıkıştırılmasındaki maksimum kuvvet olarak verilmiştir. Kohezyon değeri, numunenin ilk deformasyon altında nasıl davrandığına göre ikinci bir deformasyona ne kadar iyi direnç gösterdiği ile ilgilidir. Birinci ve ikinci sıkıştırmada genişleyen enerjilerin oranı ($A4-6/A1-3$) olarak hesaplanmıştır. Yaylanabilirlik, numunenin deforme olduktan sonra fiziksel olarak geri yaylanma

kabiliyeti hakkında bilgi verir ve (T4-5/T1-2) olarak hesaplanır. Buna göre doku iskelelerinin elde edilen mekanik sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. TPU ve PDMS doku iskelelerinin sertlik değerleri birbirine yakın olsa da PDMS-TPU doku iskelelerinin sertlik değerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun da iki doku iskelesinin entegrasyonundan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. PDMS-TPU doku iskelesinin kohezyon değerinin diğer doku iskelesine göre daha düşük olduğu görülmüştür. Yaylanabilirlik değerleri arasında ise üç doku iskelesi arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yapışkanlık, numune ile prob arasındaki adezyon kuvvetlerinin üstesinden gelmek için kullanılan gerekli enerji olarak tanımlanır. Yapışkanlık açısından doku iskelelerin hiçbiri, yapışkan bir profil sunmadıkları anlamına gelen herhangi bir negatif kuvvet göstermemiştir.



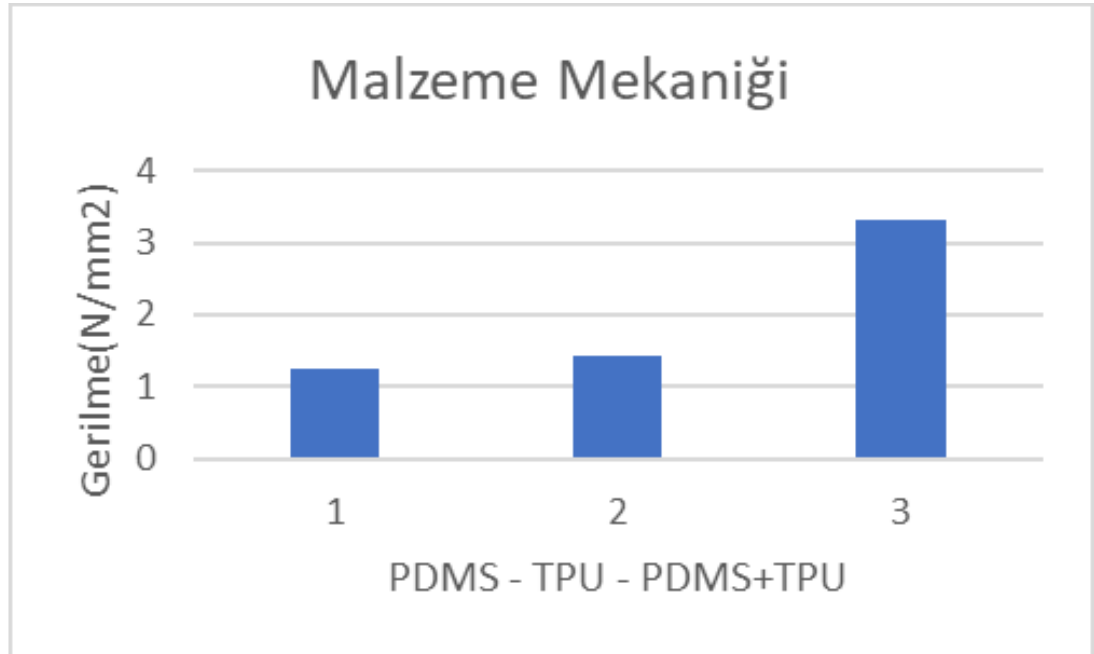
Şekil 13: TPU, PDMS ve PDMS-TPU doku iskelelerinin kuvvet-zaman grafikleri.

Tablo 1: TPU, PDMS ve PDMS-TPU doku iskelelerinin sertlik, kohezyon ve yaylanabilirlik değerleri.

Doku iskelesi	Sertlik (N)	Kohezyon	Yaylanabilirlik
TPU	$2,14 \pm 0,01$	$0,91 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,06$
PDMS	$1,89 \pm 0,13$	$0,99 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,04$
PDMS-TPU	$32,29 \pm 0,81$	$0,77 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,09$

1.7. Biyomekanik Analiz:

Biyomekanik analizler Shimadzu Autograph AG-IS 5kN üniversal test cihazı (Shimadzu corp., Tokyo, Japan) ile basma testi ile yapılmıştır. Aksiyel basma testlerinde PDMS, TPU, PDMS-TPU malzemelerinin kuvvet ve uzama miktarı anlık olarak kendi yazılım üzerinden (Trapezium, Tokyo, Japan) alınmıştır. Aksiyel basma testleri 2 mm lik deplasman ile sınırlandırılmış olup, 5 mm/dk hızda kuvvet uygulanmıştır. Tüm numuneler altta taban plakası üzerine konumlandırılmış, yukarıdan ise 10mm çapında indenter ile yük uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kıkırdığın poroelastik malzeme özelliklerini elde etmek için en güvenilir yöntem olduğundan, sınırlı basma testi kullanarak kıkırdığın basma özelliklerini değerlendirme seçilmiştir.



Şekil 14: PDMS, TPU, PDMS+TPU malzemelerinin mekanik özellikleri.

Üretilen PDMS, TPU, PDMS+TPU malzemelerinin mukavemet değerleri sırasıyla ortalama 1,26 N/mm, 1,44 N/mm ve 3,30 N/mm olarak bulunmuştur. Literatürle karşılaştırıldığında (MF Griffin ve Ark., 2020) kostal kıkırdağın mukavemet değeri 11,43 N/mm iken auricular kıkırdağın 2 N/mm olarak gözlemlenmiştir. Proje kapsamında geliştirilen malzemenin alınan ortalama değerleri literatürle uygun bulunmuştur.

2. PDMS-TPU kompozit doku iskelelerine RDF ekilmesi

2.1. Sıçan dermal fibroblast (RDF) kültürü:

Bu çalışmada hazır preparatlar olarak iXCells Biyoteknoloji firmasının RDF-a ürünü kullanıldı (Şekil 15).



Şekil 15: Rat dermal fibroblast preparatı.

RDF'ların kültüre edilmesi için yine aynı firmanın ürünleri olan fetal dana serumu (FBS) ve büyüme faktörlerini içeren fibroblast büyüme ortamı (FGM) kullanıldı (Şekil 16).



Şekil 16: Solda fibroblast büyüme ortamı (FGM) sağda fetal dana serumu (FBS).

Hücreler, 25 cm²'lik kültür flasklarına ekildi ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de kültüre edildi. Hücreler %90 sıkışık duruma gelince tripsin/EDTA kullanılarak kaldırılarak 5 dakika 1500rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp, pellet üzerine 1 mL besi ortamı eklenmiş ve hücre süspansiyonu homojen hale getirilip içinden sayım için 100 µL alınmıştır. Sayım sonunda 11x10⁶ hücre tespit edilmiştir.

Ardından PDMS-TPU kompozit doku iskeleleri 96 kuyucuklu plaklara yerleştirilmiş ve hücre ekiminden 24 saat öncesinde %10 FBS, %1 Penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamine ve Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içeren besi ortamından üzerlerine 150 µL eklenmiştir. Bu işlem ile doku iskelelerinin porları arasındaki gazların uzaklaştırılması ve ekilecek hücrelerin adezyonunun artırılması hedeflenmiştir.

2.2. Hücre ekimi:

24 saat porları arasındaki gazların uzaklaştırılması sağlanmış doku iskeleleri üzerinden besi ortamı çekilip iskele başına, 30 µL'de 1,3x10⁵ hücre şeklinde ekim yapılmıştır. Ekim sonrası 96 kuyucuklu plaklardaki doku iskeleleri yatay çalkalayıcıda

5 dakika çalkalanmaya bırakılmış ve hücrelerin doku iskelelerine tutunmaları için %5 CO₂ içeren 37°C’de inkübatörde 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda her kuyucuk besi ortamı ile 150 µL’ye tamamlanmıştır.

3. Hayvan deneyleri

Çalışmada 6 adet 250-300gr wistar albino erkek rat kullanılmıştır. Dermal fibroblast ile kaplanmış ve kaplanmamış şekilde hazırlanan doku iskeleleri denekler iki gruba ayrılarak yerleştirilmiştir. Bu gruplar dermal fibroblast ile kaplanmamış doku iskelesinin yerleştirildiği ratlar (Skafold Hücresiz) ve dermal fibroblast ile kaplanmış olan doku iskelelerinin yerleştirildiği ratlar (Skafold Hücreli) olarak ayrılmıştır. Deney hayvanları internasyonal hayvan deney bakım ve deney kılavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık 23 ±2 °C, nem %45-65, 12 saat gündüz/gece siklusu) kafeslere alınmıştır. Deney Hayvanları, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında standart koşullarda beslenerek takip edilmiştir.

3.1 Cerrahi teknik

3.1.1 PDMS-TPU kompozit doku iskelelerinin sıçanlara implantasyonu

Dermal fibroblast ile kaplanmış ve kaplanmamış şekilde hazırlanan doku iskeleleri (**Şekil 17**) intraperitoneal olarak uygulanan 60mg/kg ketamin hidroklorür ve 6mg/kg ksilazin hidroklorür anestezisi ve dietileter ile sağlanan idame anestezisi altında uygun tıraşlama (**Şekil 18**) ve saha temizliği sonrası (**Şekil 19**) sıçanların cerrahi öncesi hazırlıkları tamamlandı.



Şekil 17: Doku iskeleleri.



Şekil 18: İşlem öncesi tıraşlama.



Şekil 19: Cerrahi sahanın betadin ile temizliği.

Cerrahi işlem sırasında portegü, klemp, penset, makas ve bistüriden oluşan cerrahi set kullanıldı (Şekil 20).



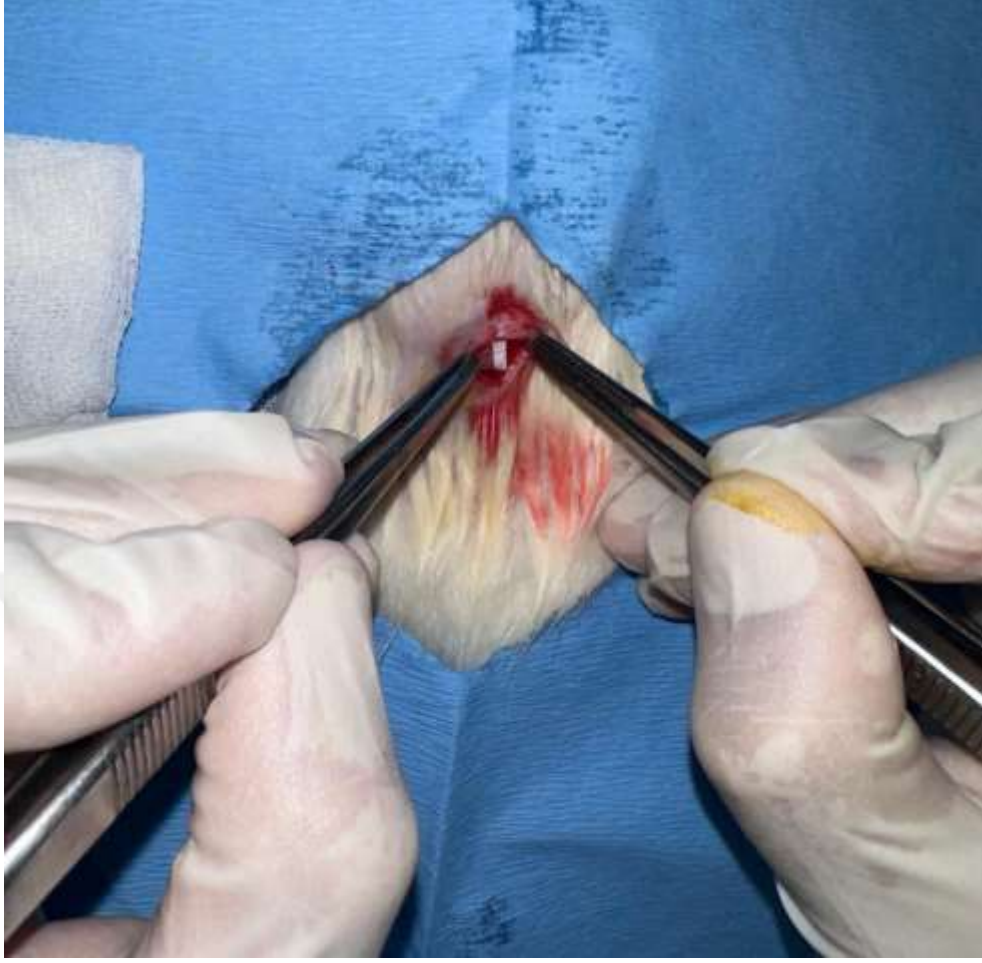
Şekil 20: Cerrahi işlem için kullanılan cerrahi set.

Sırt bölgesinde skapula inferiorunda yaklaşık 1,5 cm'lik insizyon yapıldı (Şekil 21).



Şekil 21: Doku iskelelerinin implantasyonu öncesi cerrahi insizyon.

İnsizyon sonrası pannikulus karnosus görülerek bu plan ve cilt altı doku planı arasında subkütan cep oluşturuldu. Ardından PDMS-TPU kompozit doku iskeleleri materyallerin dermal dokuyla eşit teması açısından hazırlanan ceplere horizontal olarak yerleştirildi (Şekil 22).



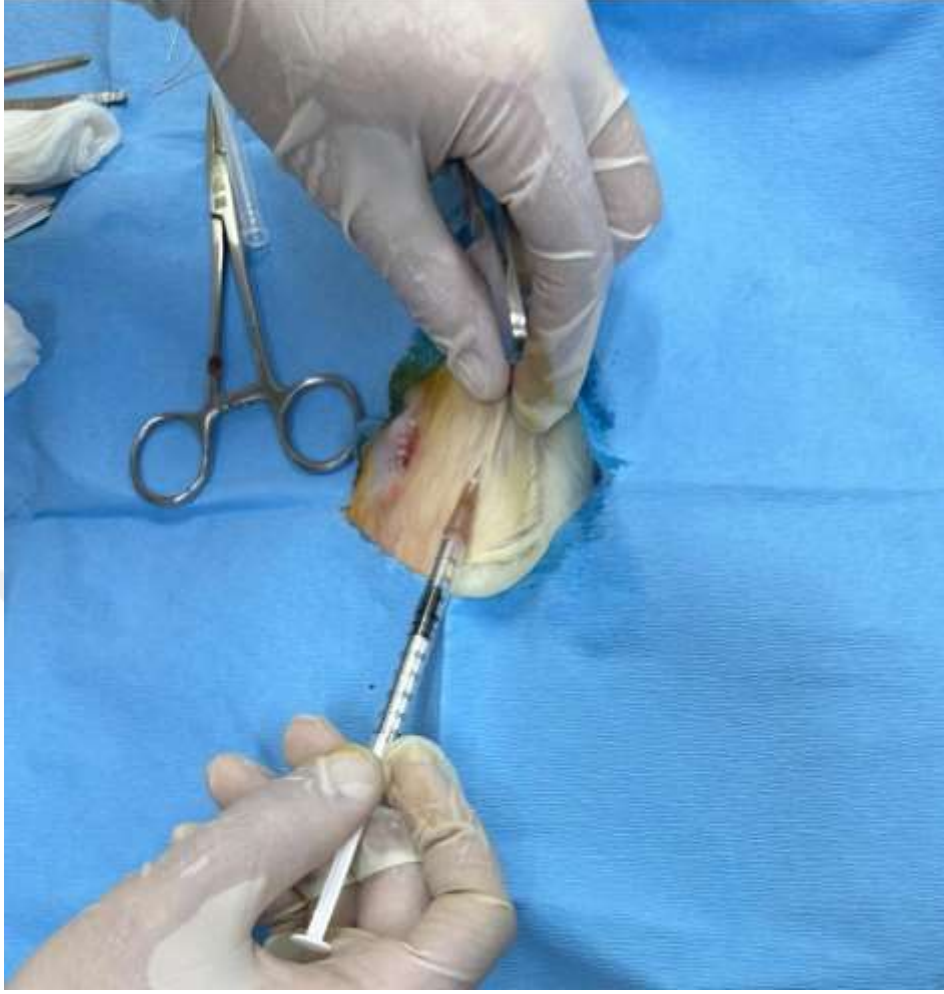
Şekil 22: PDMS-TPU kompozit doku iskelesinin horizontal olarak oluşturulan subkütan cebe yerleştirilmesi.

Doku iskelelerinin yerleştirilmesi ardından kanama kontrolü sağlandı ve insizyon 4-0 poliglaktin 910 (Vicryl) suture ile suture edildi (**Şekil 23**).



Şekil 23: İnsizyonun kapatılması.

Peroperatif dönemde deneklerin idame sıvısı %0,9'luk SF ile subdermal olarak sağlandı (Şekil 24).

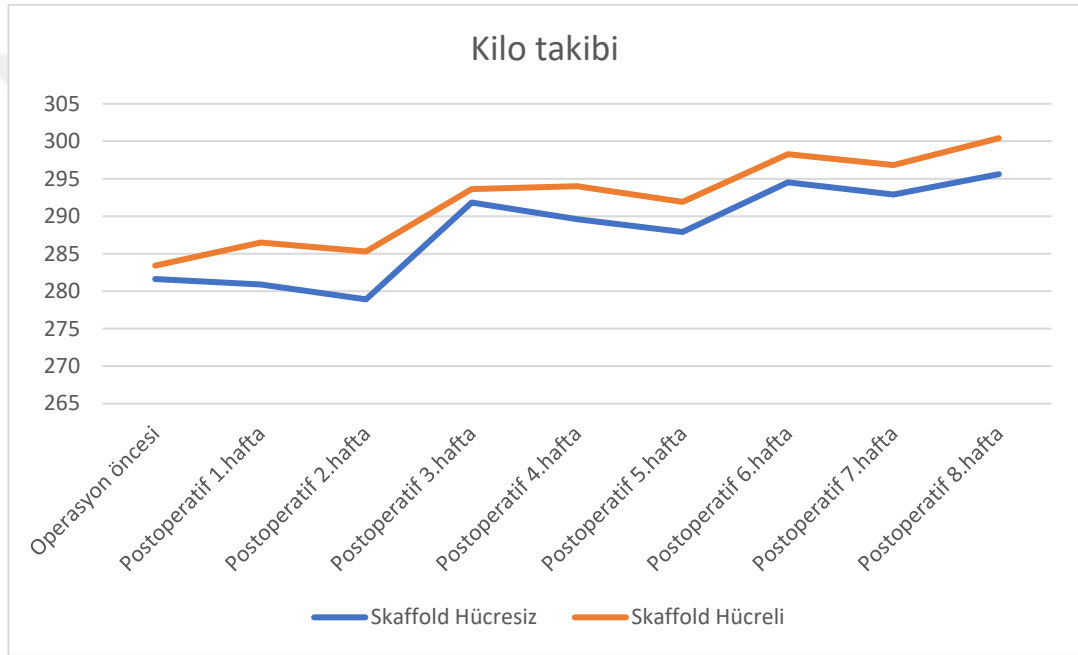


Şekil 24: İşlem sonrası idame sıvının subdermal olarak uygulanması.

Peroperatif dönemde analjezi için 10mg/kg diklofenak sodyum intraperitoneal olarak uygulandı. Preoperatif ve postoperatif antibiyoterapi bir hafta süreyle 1.kuşak sefalosporin (sefazolin) subdermal olarak uygulanarak sağlandı. İki grup için de aynı işlemler uygulandı. Denekler operasyon sonrası günlük yara bakım sağlanarak ve yara iyileşmesinin uygun olarak ilerlerleyişi teyit edilerek yara epitelize olana kadar izlendi. Denekler sakrifikasyon sürecine kadar 8 hafta boyunca kilo kaybı ve genel durum açısından izlendi. **(Tablo 2 ve Şekil 25).**

Tablo 2: Deney gruplarının operasyon öncesi ve sonrasındaki dönemdeki tartımlarının ortalama değerleri.

Grup/ Zaman	Operasyo n öncesi	Postop. 1hafta	Postop. 2hafta	Postop. 3hafta	Postop. 4hafta	Postop. 5hafta	Postop. 6hafta	Postop. 7hafta	Postop. 8hafta
Skafold Hücre si	281,6gr	280,9gr	278,9gr	291,8gr	289,6gr	287,9gr	294,5gr	292,9gr	295,6gr
Skafold Hücreli	283,4gr	286,5gr	285,3gr	293,6gr	294gr	291,9gr	298,2gr	296,8gr	300,4gr



Şekil 25: Deney gruplarının operasyon öncesi ve sonrasındaki dönemdeki tartımlarının ortalama değerlerinin çizgi grafiği halinde gösterilmesi.

3.1.2 Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu ve Doku Örneklerinin Alınması

Üç aylık izlem süresi sonunda dietileter ile sağlanan inhale anestezi altında yeniden saha temizliği yapıldı (Şekil 26).



Şekil 26: Doku örneklerinin alınmasından önce inhale anestezi altında cerrahi saha temizliği.

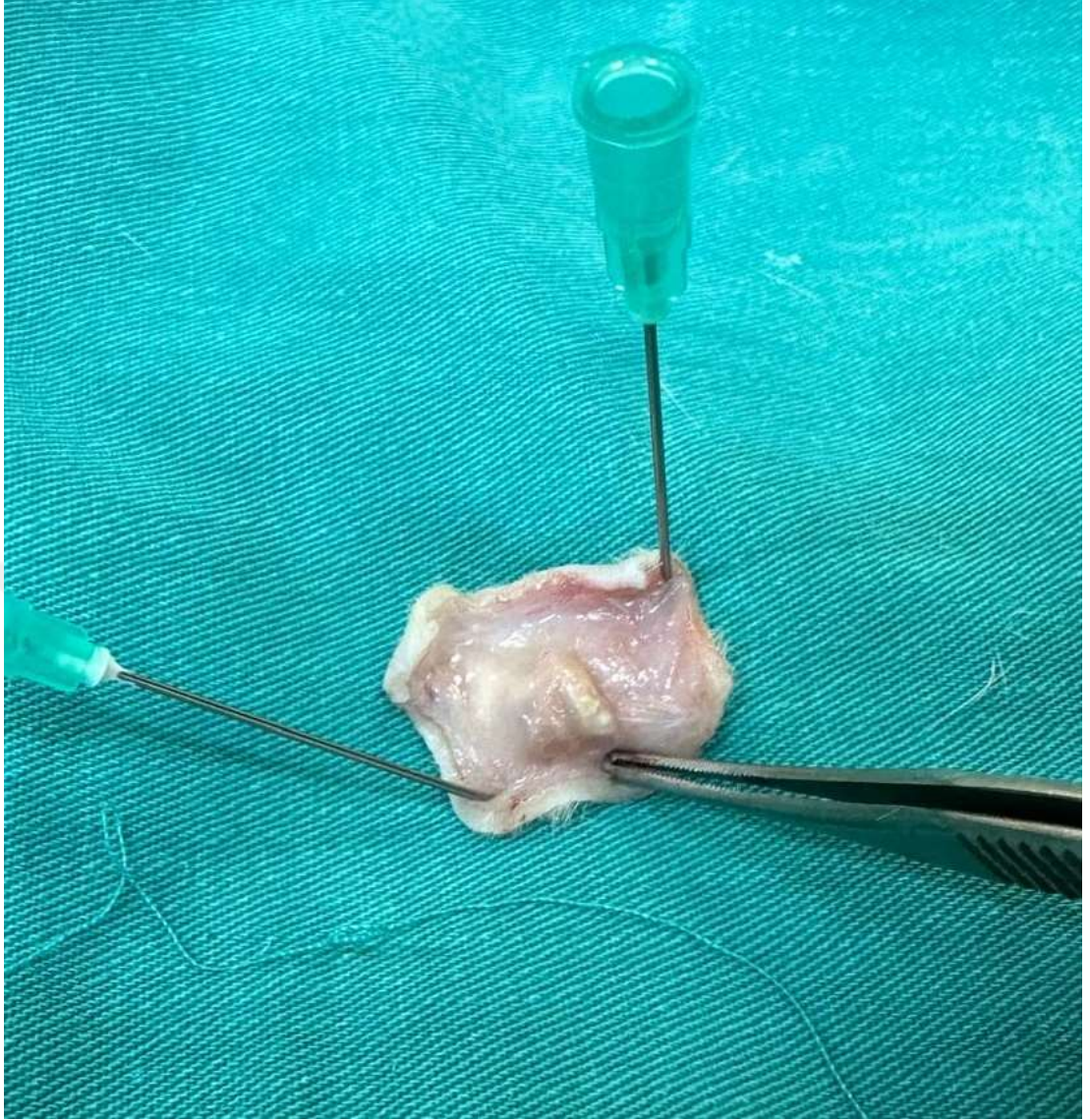
Ardından kompozit doku iskelesinin yerleştirildiği alandaki dokular diagonal olarak tam kat eksize edildi ve ardından sıçanlar sakrifiye edildi (Şekil 27, Şekil 28, Şekil 29).



Şekil 27: Doku örneklerinin alınması.



Şekil 28: Örneklerin alınması-doku iskelelerinin kapsül benzeri yapıyla kaplanmış olduğu görülmektedir.



Şekil 29: Elde edilen örnekler.

Histokimyasal Boyama

Doku iskelelerinden elde edilen parafin kesitler 1 gece 60°C de etüvde bekletildi. Deparafinizasyon işlemi için ksilende 2 dk bekletildi. Ardından %96'dan %70'a kadar azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Distile suda yıkandıktan sonra 7 dakika Hematoksilen boya solüsyonu ile muamele edildi. Modratlanma işlemi sonrası sitoplazmik dokunun gösterimi için 5 sn boyunca eozin boya solüsyonu içerisinde bekletildi. Sonrasında hızlıca sırasıyla %70, %80, %96'ya artan etil alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için kesitler 2 dakika ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile kapama işlemi yapıldı. Olympus BX61 mikroskop

ile görüntüleme yapıldı (x10, x20, x40). Histokimyasal Değerlendirme, her bir kesit için 5 farklı alanda damar sayımı yapıldı (1).

İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal boyama Avidin-biyotin-Peroksidaz Yöntemi (ABC Metodu) ile gerçekleştirildi. Deparafinizasyon işlemi sonrası formaldehitin kapattığı reseptör bölgeleri açmak için antijen retrieval işlemi ile tripsin enzimi ile 15 dk muamele edildi. PBS ile yıkadıktan sonra endojen peroksidaz inhibe etmek için %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. PBS ile yıkanan doku iskeleleri, özgün olmayan reseptör bağlanmaları bloke etmek için bloklayıcı solüsyonu ile 25 dk oda ısısında enkübe edildi. Ardından CD31 ve VEGF (1:200 dilüsyon, BİOSS) ile +4 °C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yıkama ile yıkanan doku iskeleleri 25 dk biyotinlenmiş sekonder antikor ardından peroksidaz enzimiyle avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) uygulandı. Reaksiyonun görünürlüğü için kromojenik 3,3' Diaminobenzidine (DAB) ile 3 dk muamele edildi. Ardından Mayer's Harris hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflandırma yapıldı. Doku iskeleleri entellan ile kapatıldı. Olympus BX61 mikroskop ile görüntüleme yapıldı (x20, x40, x10). İmmünohistokimyasal değerlendirmede immünreaktivite şiddeti semikantitatif skorlama ile gerçekleştirildi. Boyanma yok (0), az boyanma (1), orta derecede boyanma (2) ve şiddetli boyanma (3) şeklinde skorlandı (1,2).

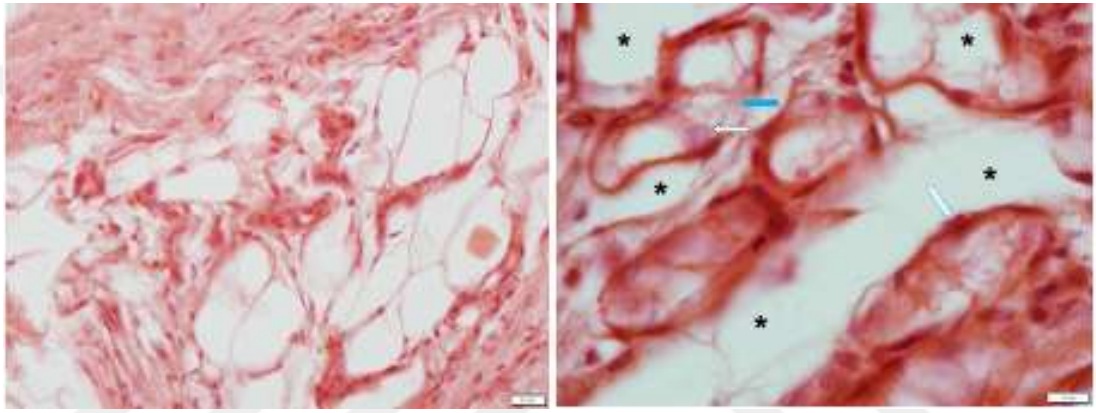
İstatistik Analiz;

İstatistiksel analizler SPSS for mac versiyon 26 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (*histogram ve olasılık grafikleri*) ve analitik yöntemlerle (*Kolmogorov- Smirnov/ Shapiro-Wilk testleri*) incelenmiştir. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama ve standart sapmalar kullanılarak verilmiştir. Normal dağılım göstermeyen veriler için *Mann Whitney U testi* yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

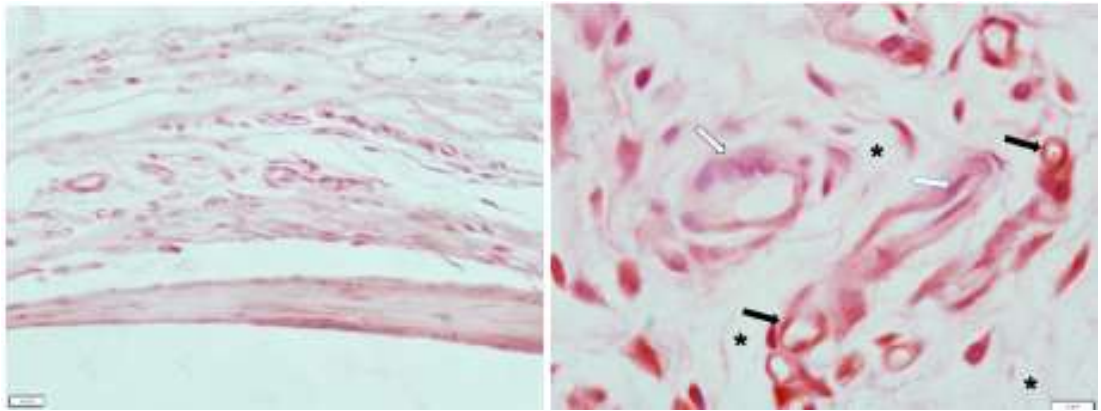
Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bulgular

3D dermal fibroblast içeren termoplastik poliüretan ve polidimetil siloksan doku iskelelerinin yara yatağında oluşturduğu mikrovasküler değişiklikler histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. S ve SH doku iskelelerinin hematoksilien-eozin değerlendirilmesinde, hücre adezyonu ve hizalanmasının 8. ve 12. haftalarda iyi olduğu izlendi (Şekil 30-35).



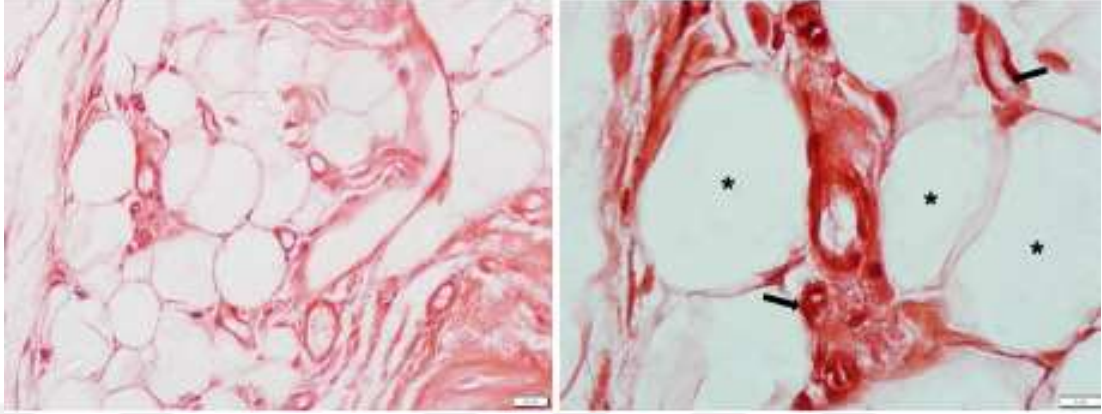
Şekil 30: 8. hafta S doku iskelelerinde H&E boyaması izlenmektedir. Doku iskelelerin insizyon alanına adezyonu gözlenmektedir.

(Mavi ok: hücre uzantılarını, Beyaz ok: damar öncü hücreleri, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



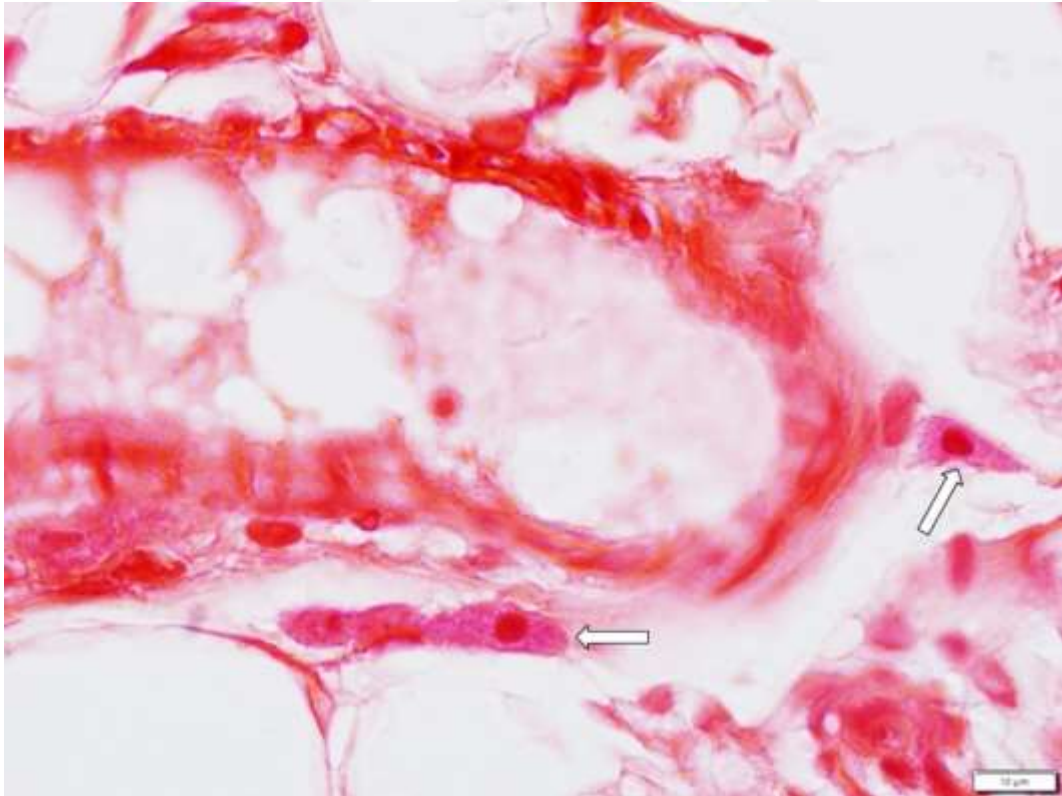
Şekil 31: 8. hafta SH doku iskelelerinde H&E boyaması izlenmektedir.

(Siyah ok: damar öncü hücreleri, beyaz ok: *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



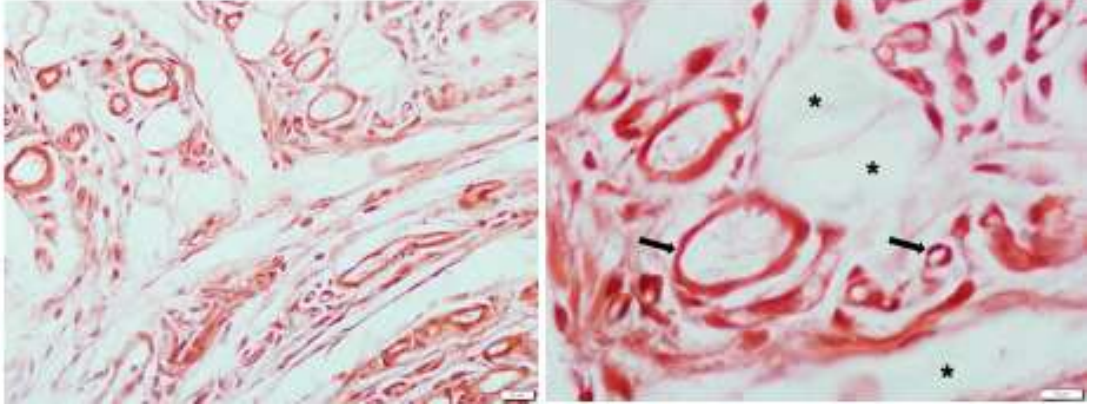
Şekil 32: 12. hafta S doku iskelelerinde H&E boyaması izlenmektedir.

(Siyah ok: damar öncü hücreleri, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



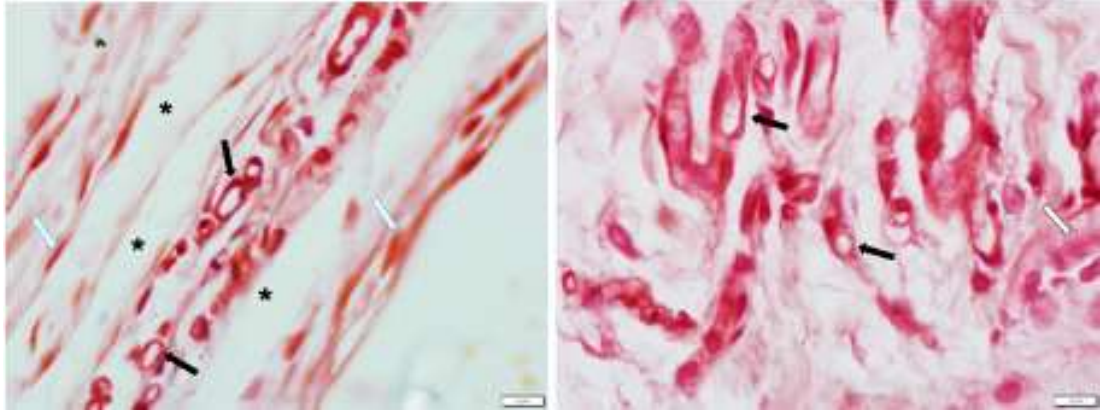
Şekil 33: 12. hafta S doku iskelelerinde H&E boyaması izlenmektedir.

(Beyaz ok: Eozinofilik hücreleri göstermektedir.)



Şekil 34: 12. hafta SH doku iskelelerinde H&E boyaması izlenmektedir.

(Yaygın mikrovasküler yapılar doku iskelesi ile birlikte gözlenmektedir. Siyah ok: damar öncü hücreleri, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



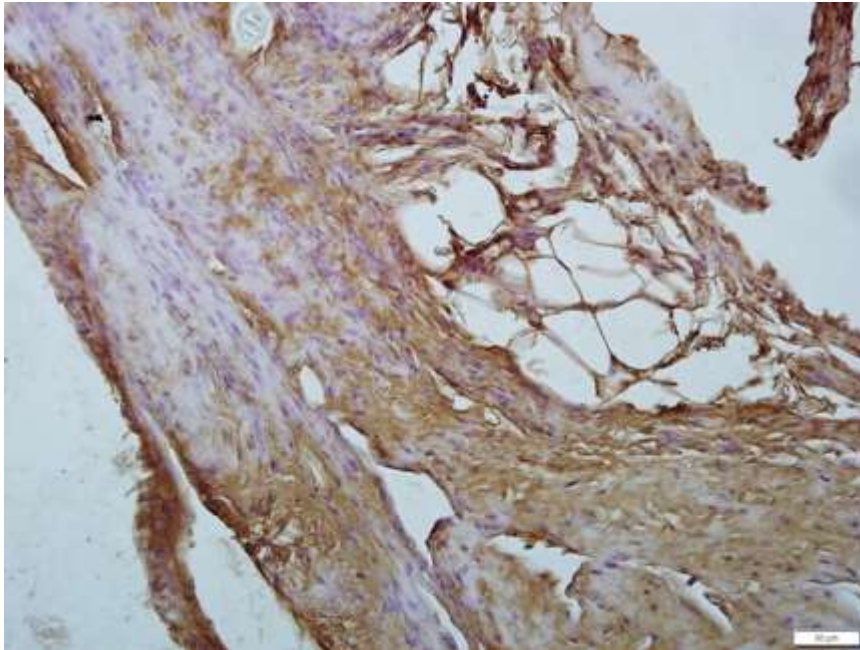
Şekil 35: 12. hafta SH doku iskelelerinde H&E boyaması izlenmektedir.

(Siyah ok: pozitif damar öncü hücreleri, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)

Özellikle, vasküler yapıların oluştuğu alanlarda hücrelerin doku iskelelerin gözeneklerine adezyonu ve birbirleriyle hücre-hücre etkileşimleri tespit edildi (Şekil 31-47). Subkutan ceplere yerleştirilen doku iskelelerinde mikrovasküler yapıların özellikle insizyon alanlarına yakın alanlarda oluştuğu gözlemlendi (Şekil 36, 37, 41-44, 47-51). Bu yapılar komşu gözeneklerin arasında ya da gözeneklerin çevresinde tespit edildi. Gözeneklerin arasında yer alan alanlarda yaygın mikrovasküller yapılar izlendi

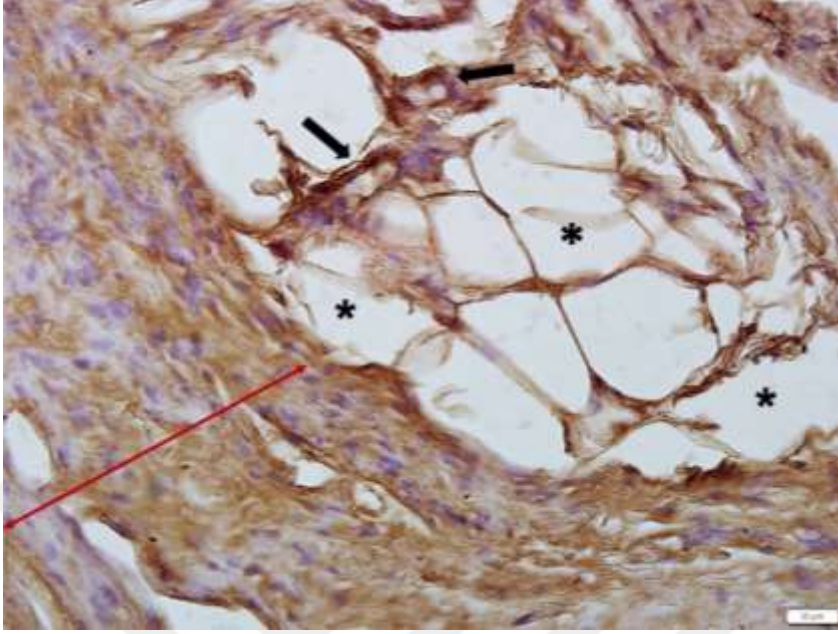
(Şekil 30-32, 35, 37, 39, 40, 42, 43, 44, 47-49, 51, 52). Gözeneklerin çevresinde ise ekstraselüler matriks ve gözeneklerin içini döşeyen yassı nükleuslu hücreler tespit edildi (Şekil 30, 31, 33, 35, 40, 41, 42, 43, 50, 52). Bu gözeneklerin içerisinde ve çevresinde yuvarlak nükleuslu hücrelerin birbirleriyle olan ve yassı hücrelerle birlikte oluşturduğu yoğun hücre uzantıları gözlemlendi (Şekil 32, 35, 39, 40, 42, 45-47, 50, 52). Her iki doku iskelesinin iki farklı haftalarında, damar infiltrasyonunun gerçekleştiği ve doku iskelelerine invaze olan büyük kan damarları tespit edildi (Şekil 37, 41-43, 45, 46, 48, 49, 51). Damarsal ağın 8. haftaya göre 12. hafta doku iskelelerinde daha yoğun olduğu tespit edildi. S doku iskelelerine göre SH doku iskelelerinin her iki farklı zamanları için damar oluşumunun daha fazla olduğu gözlemlendi. Her iki grubun 8. haftaya göre 12. haftada, hücre yoğunluğu ve mikrovasküler yapılarda artış izlendi (Şekil 30-52).

S ve SH doku iskelelerinde vasküler yapılarının tespiti için CD31 ve VEGF antikorları ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Doku iskelelerinde CD31 ve VEGF pozitif hücre immün reaktivitesinin gözenekleri çevreleyen yassı ve yuvarlak hücrelerde izlendi (Şekil 34-37, 40, 42, 45, 47). Ayrıca insizyon alanına yakın doku iskeleleri arasında pozitif olan büyük kan damarları gözlemlendi (Şekil 31, 34, 36-38, 40, 41, 43).



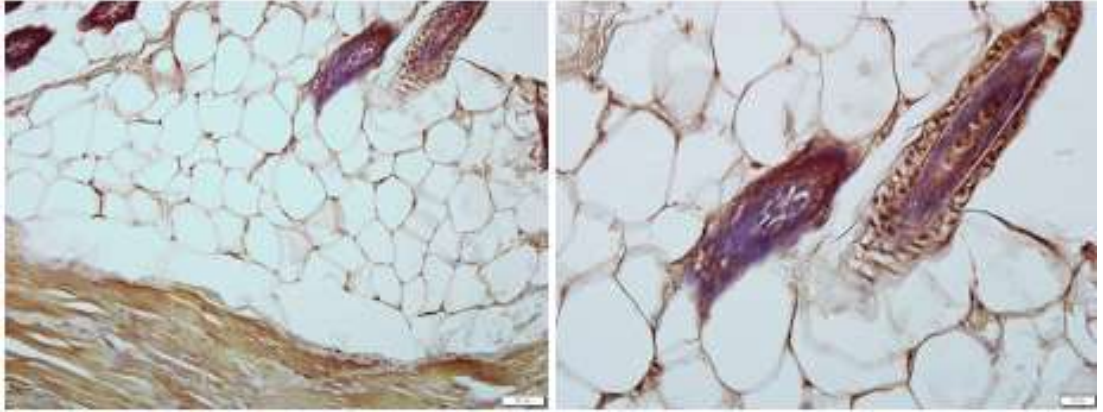
Şekil 36: 8. hafta S doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal

boyaması izlenmektedir. İnsizyon alanı ile birlikte doku iskeleleri görülmektedir.

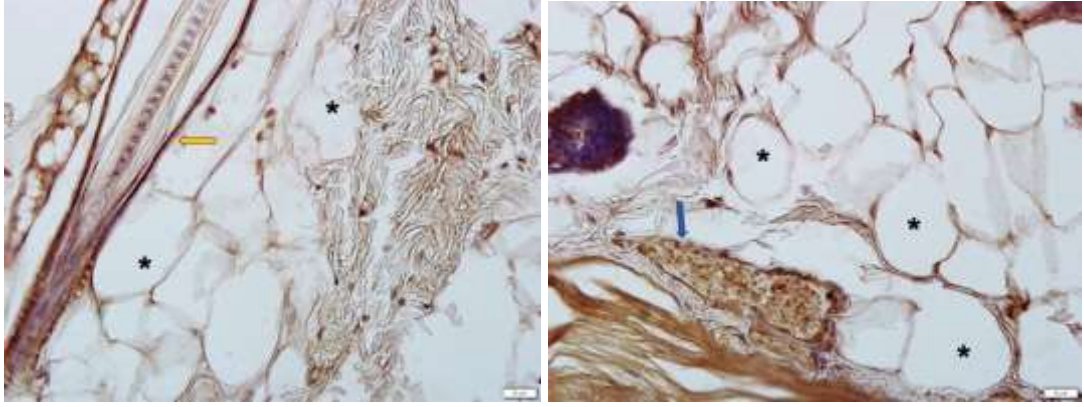


Şekil 37: 8. hafta S doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir.

(Kırmızı ok: İnsizyon alanı, siyah ok: pozitif damar öncü hücreleri, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)

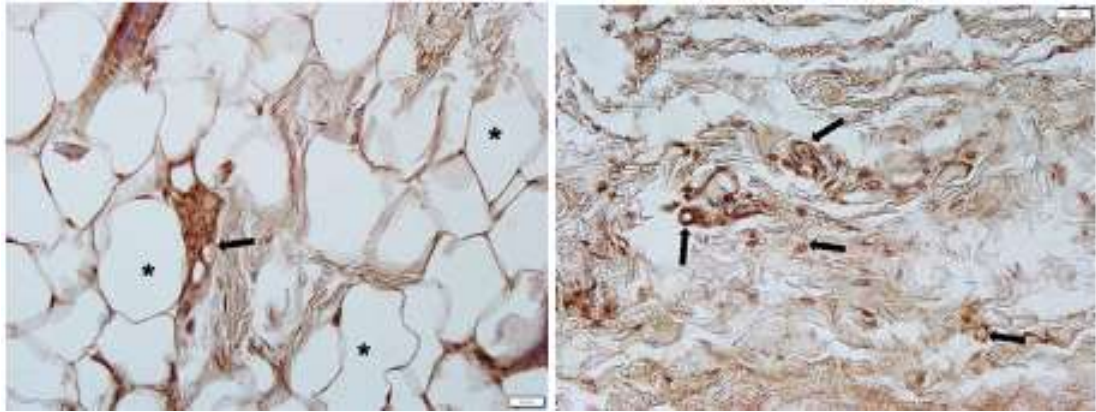


Şekil 38: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir. Doku iskelesi ile birlikte kıl folikülü ve çizgili kas gözlenmektedir.



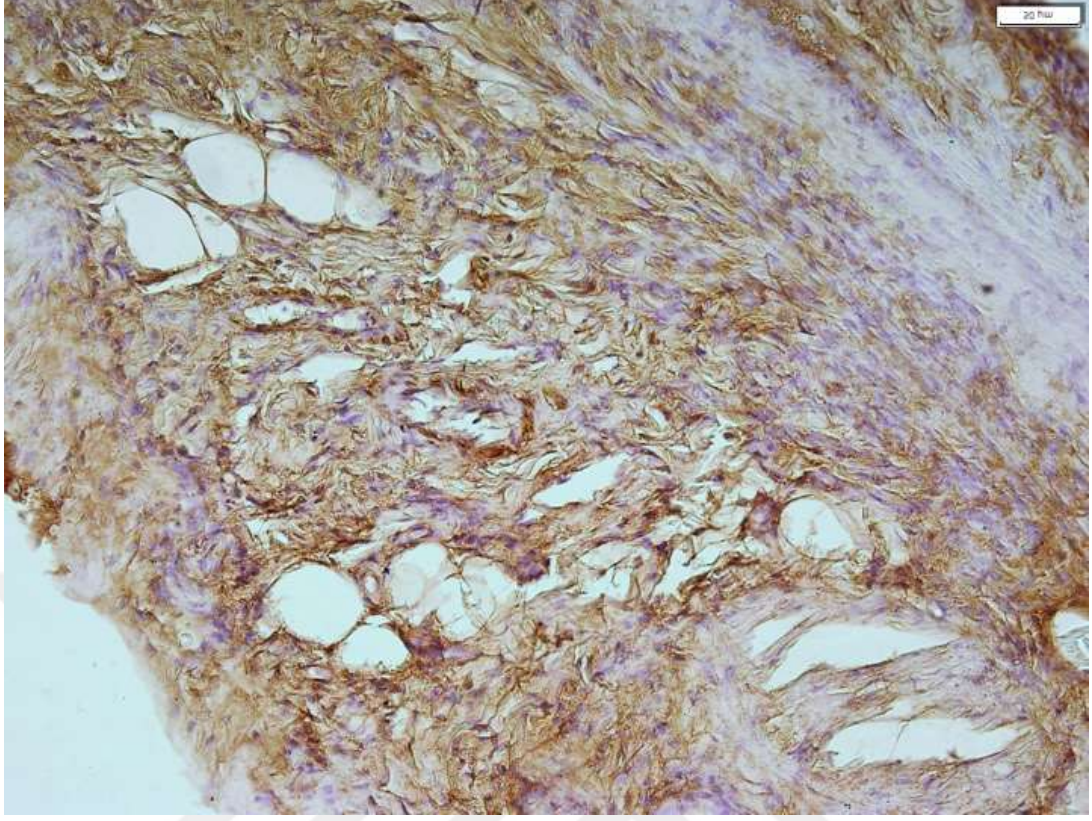
Şekil 39. 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir. Doku iskelesinin içersinde pozitif hücreler ve kıl folikülü gözlenmektedir.

(Mavi ok: pozitif kan damarı, Sarı ok: Kıl folikül kılıfını *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



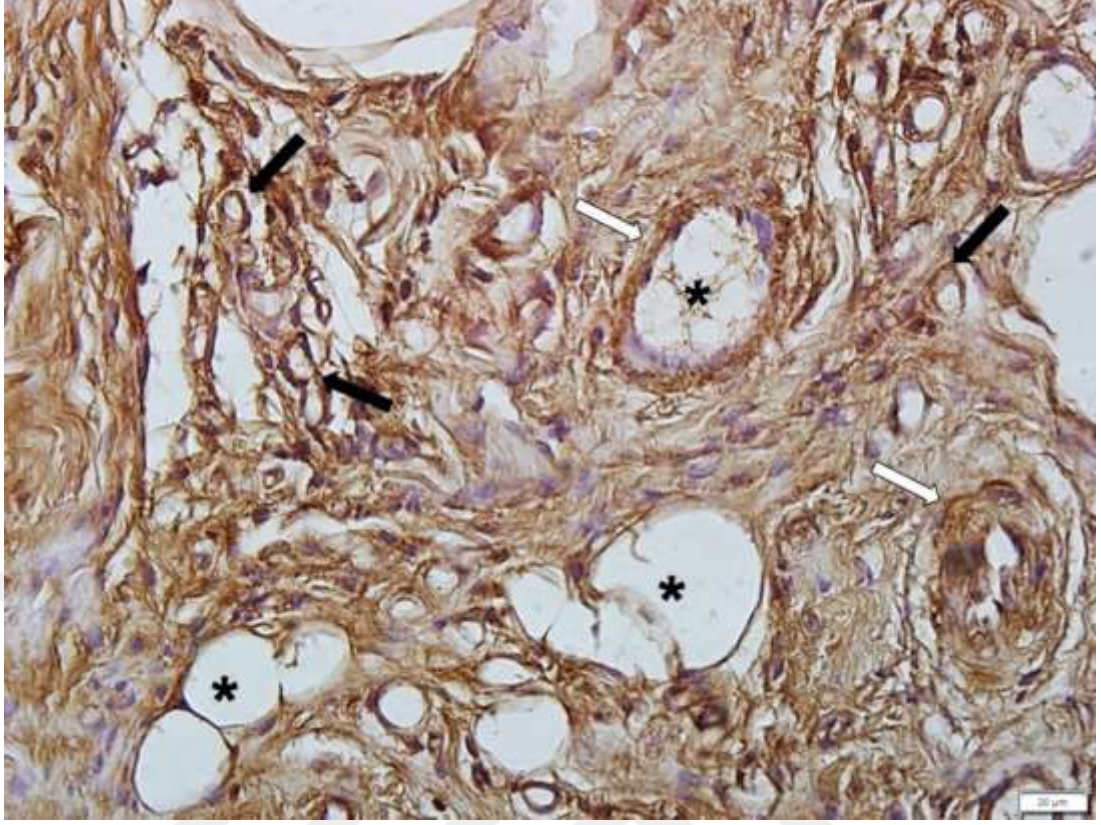
Şekil 40: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir.

(Siyah ok: pozitif kan damarı, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



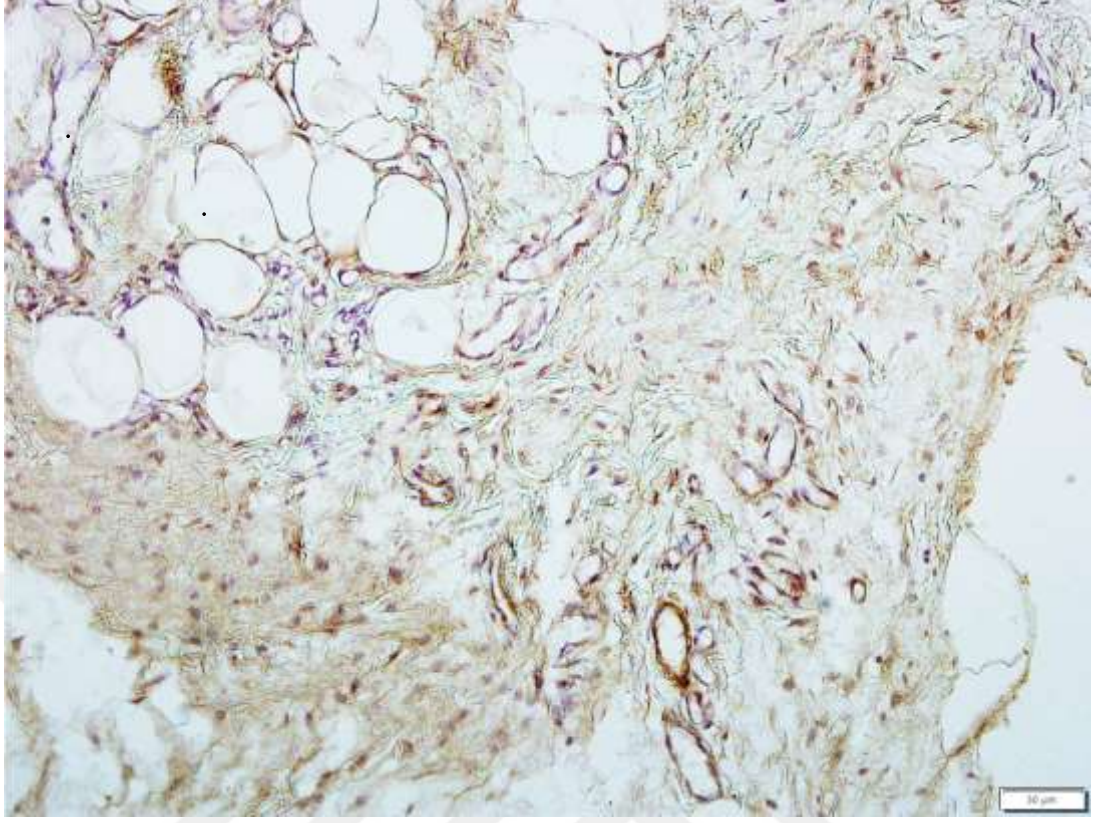
Şekil 41: 8. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir. Gözeneklerin arasında yaygın pozitif damar öncü hücreleri gözlenmektedir.

(Siyah ok: pozitif kan damarı, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)

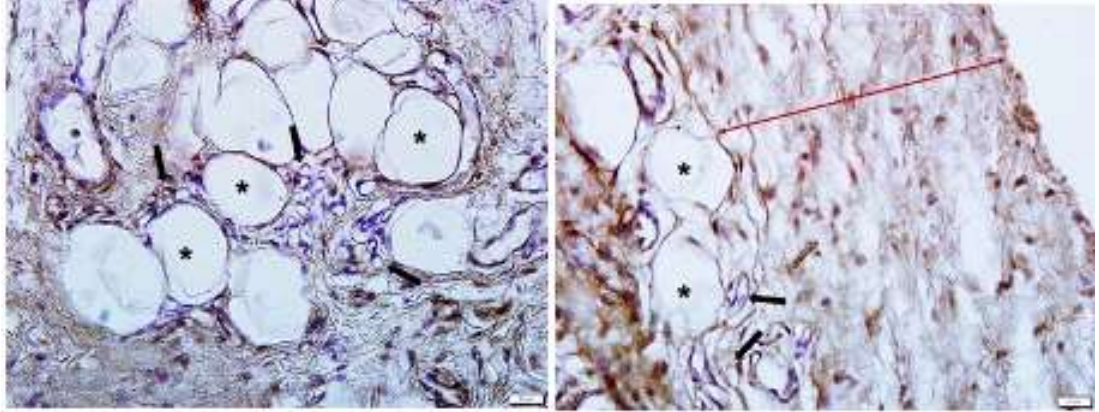


Şekil 42: 8. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir. Gözeneklerin arasında yaygın pozitif damar öncü hücreleri gözlenmektedir.

(Siyah ok: pozitif kan damarı, Beyaz ok: doku iskelesinin gözenğini çevreleyen pozitif öncü damar hücreleri *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)

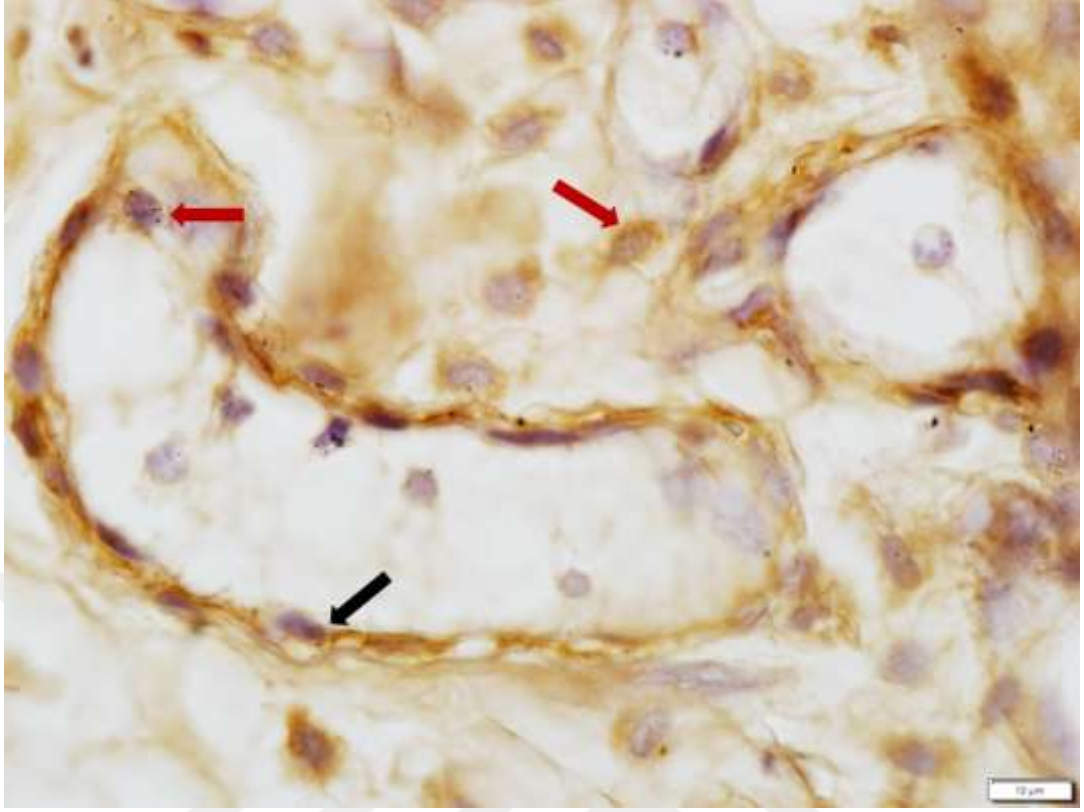


Şekil 43: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir.



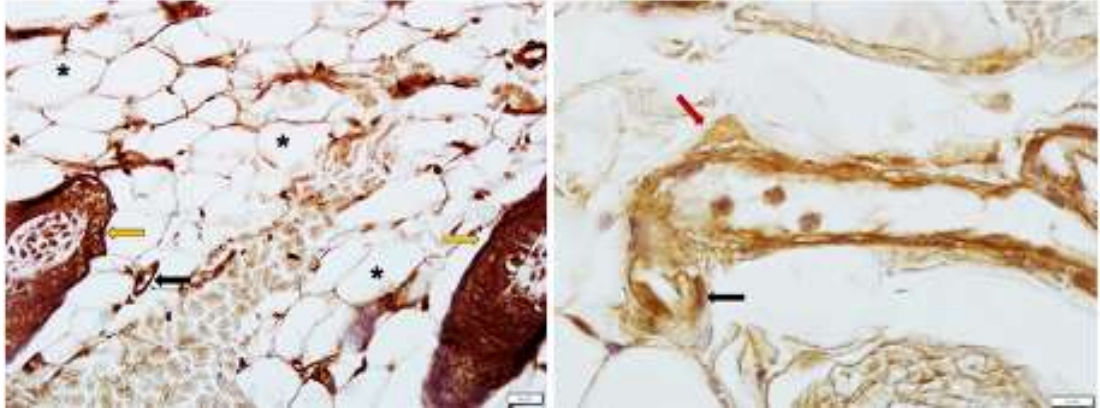
Şekil 44: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir. Gözeneklerin arasında yaygın pozitif damar öncü hücreleri gözlenmektedir.

(Siyah ok: pozitif kan damarı, Kırmızı ok: insizyon alanı *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



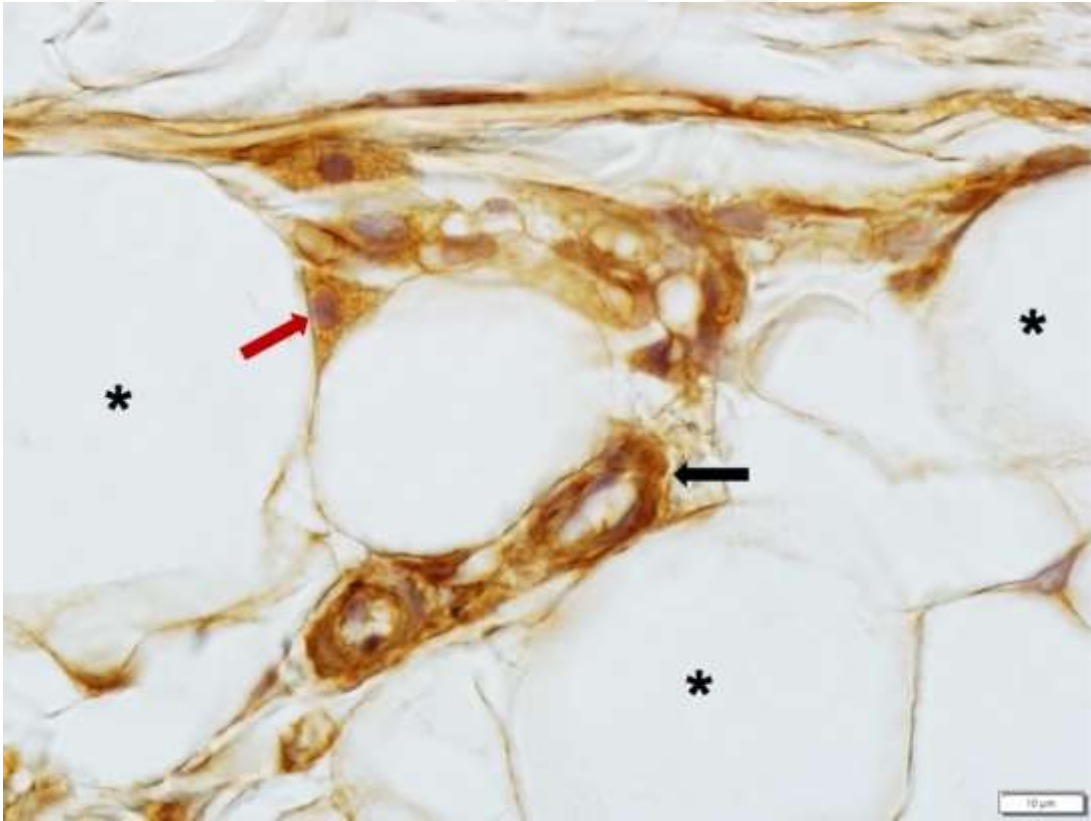
Şekil 45: 8. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir. Gözeneklerin arasında yaygın pozitif damar öncü hücreleri gözlenmektedir.

(Siyah ok: yassı nükleuslu pozitif hücre, Kırmızı ok: doku iskelesinin gözenegini çevreleyen yuvarlak nükleuslu pozitif öncü damar hücreleri *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.,)



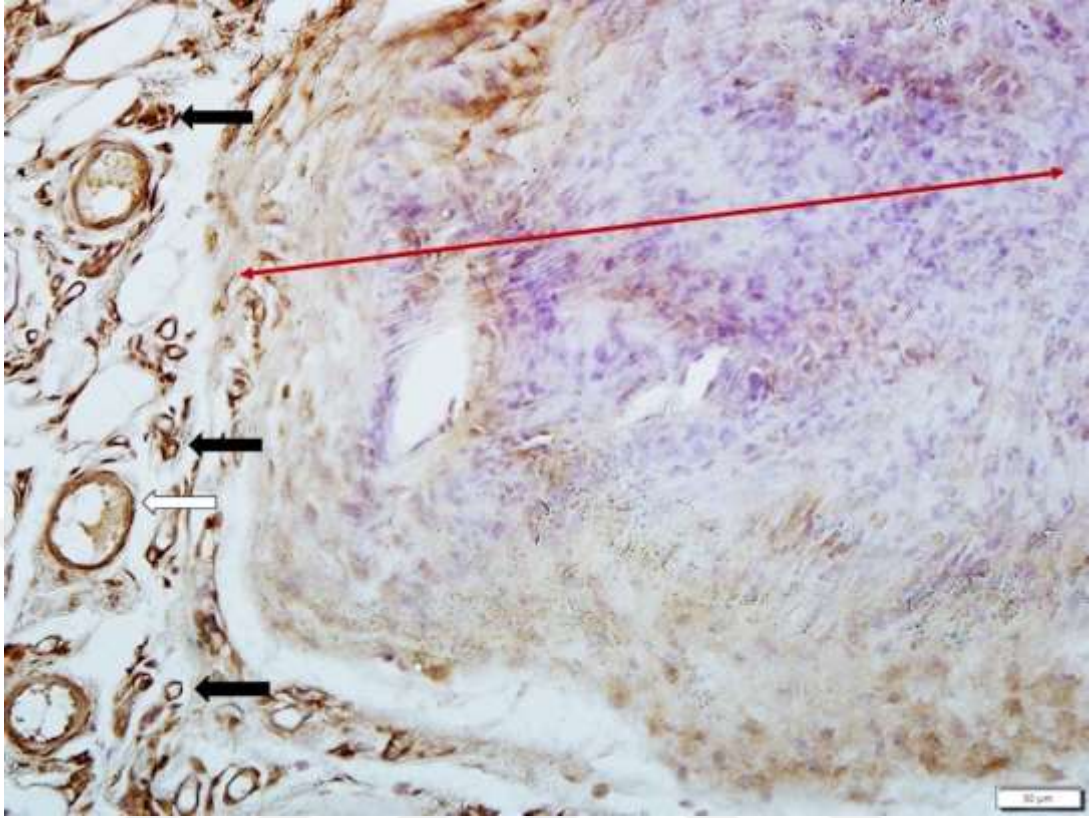
Şekil 46: 12. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikör immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir.

(Kırmızı ok: yuvarlak nükleuslu pozitif hücreleri, Siyah ok: pozitif damarları, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



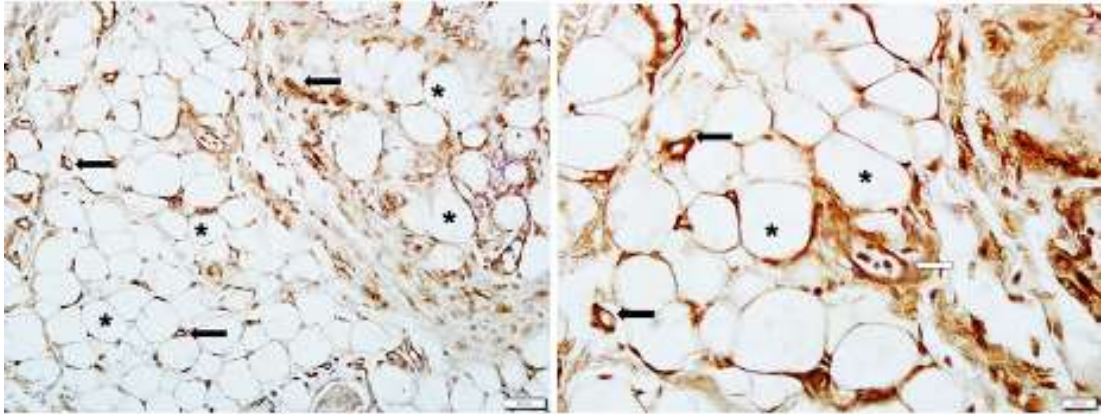
Şekil 47: 12. hafta SH doku iskelelerinde anti-CD31 antikör immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir.

(Kırmızı ok: yuvarlak nükleuslu pozitif hücreleri, Siyah ok: pozitif damarları, Beyaz ok: gözenekleri çevreleyen pozitif hücreleri, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



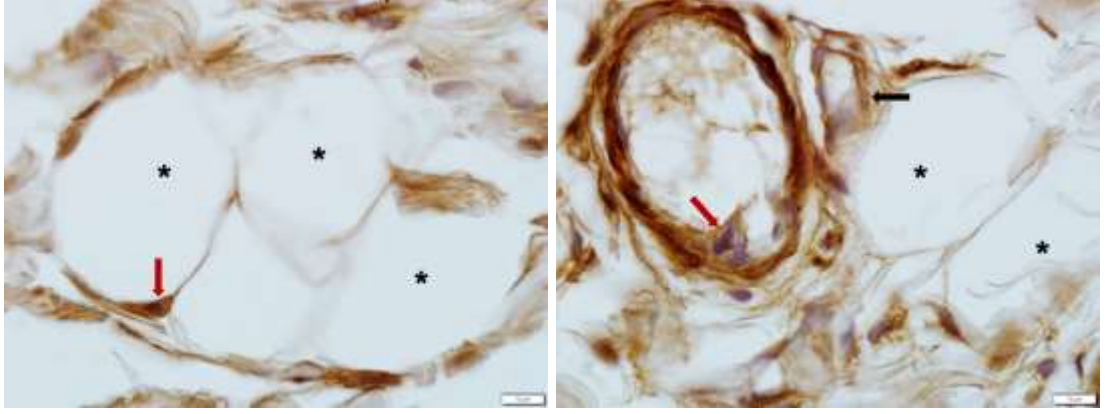
Şekil 48: 12. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir.

(Kırmızı ok: İnsizyon alanı, Siyah ok: pozitif damarları, Beyaz ok: pozitif damar öncü hücreleri *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



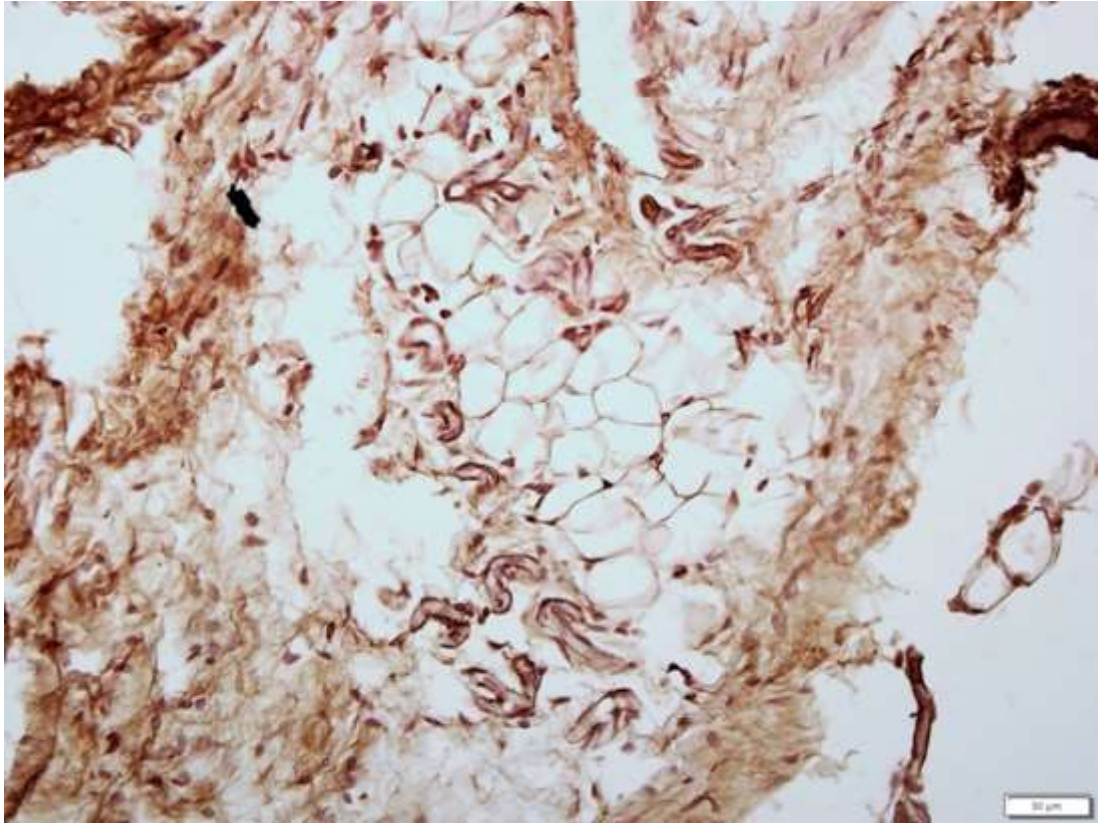
Şekil 49: 12. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir.

(Kırmızı ok: İnsizyon alanı, Siyah ok: pozitif damarları, Beyaz ok: pozitif damar öncü hücreleri *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)

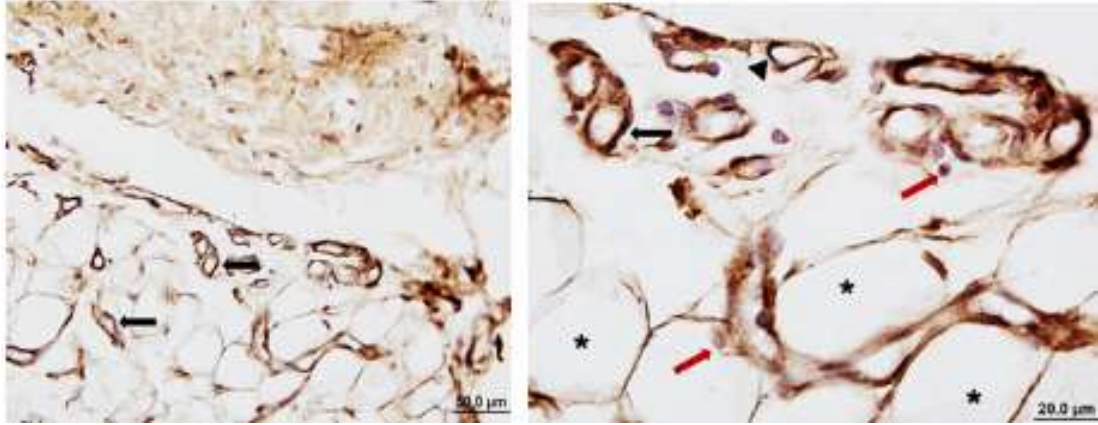


Şekil 50: 12. hafta S doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir.

(Kırmızı ok: yuvarlak pozitif hücre, Siyah ok: pozitif damarları, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)



Şekil 51: 12. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir. Yaygın pozitif hücre ve vasküler yapılar gözlenmektedir.



Şekil 52: 12. hafta SH doku iskelelerinde anti-VEGF antikor immünohistokimyasal boyaması izlenmektedir.

(Kırmızı ok: yuvarlak pozitif hücre, Siyah ok: pozitif damarları, *: doku iskelesinin gözenekleri göstermektedir.)

Tablo 3, skafold hücresiz ve skafold hücreli doku iskelelerinde 8. ve 12. haftalarda CD31 ve VEGF pozitif vasküler yapı sayılarını değerlendirmektedir.

8.hafta CD31 pozitif vasküler yapılar açısından, skafold hücresiz grupta ortalama $8,67 \pm 4,04$ adet, skafold hücreli grupta ise $16,00 \pm 3,61$ adet olarak bulunmuş ve iki grup arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p=0,127$). Ancak, 12. haftada skafold hücresiz grupta $16,33 \pm 3,06$ adet, skafold hücreli grupta ise $36,33 \pm 4,16$ adet olarak damar sayıları ölçülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,043$).

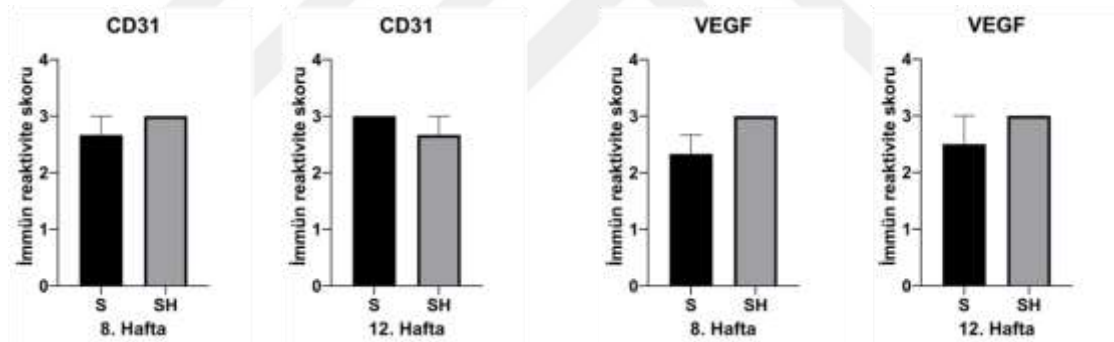
VEGF pozitif vasküler yapılar açısından, 8. haftada skafold hücresiz grupta ortalama $16,00 \pm 12,29$ adet, skafold hücreli grupta ise $37,67 \pm 3,06$ adet vasküler yapı olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,041$). 12. haftada ise skafold hücresiz grupta $21,33 \pm 3,51$ adet, skafold hücreli grupta $31,00 \pm 7,94$ adet vasküler yapı mevcut olup anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,132$).

Sonuçlar, özellikle 12. haftada CD31 ve 8. haftada VEGF pozitif vasküler yapıların skafold hücreli grupta daha fazla olduğunu, hücreli doku iskelelerinin vasküler yapı gelişiminde etkili olabileceğini göstermektedir.

Tablo 3: Skafold Hüresiz ve Skafold Hücreli doku iskelelerinde 8. ve 12. haftalarda pozitif CD31 ve VEGF vasküler yapı sayılarının değerlendirilmesi

Parametre	Skafold Hüresiz (n=3) Ort±SS	Skafold Hücreli (n=3) Ort±SS	p
CD31			
(8. hafta)	8,67±4,04	16,00±3,61	0,127
CD31			
(12. hafta)	16,33±3,06	36,33±4,16	0,043
VEGF			
(8. hafta)	16,00±12,29	37,67±3,06	0,041
VEGF			
(12. hafta)	21,33±3,51	31,00±7,94	0,132

İmmünohistokimyasal olarak CD31 ve VEGF antikorların immünreaktivite şiddetlerinin semikantitatif skorlamasında, her iki farklı haftada doku iskeleleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. Ayrıca 8. haftaya göre 12. haftada her iki farklı doku iskelelerinde anlamlılık belirlenmedi (Şekil 53).



Şekil 53: S ve SH doku iskelelerinde 8. ve 12. haftalarda CD31 ve VEGF antikorların immünohistokimyasal skorlanması gözlenmektedir (p>0,05).

5. TARTIŞMA

Mikrotia, doğumsal olarak kulak yapısının tam gelişmemesi veya eksik olması durumudur ve estetik ile fonksiyonel kayıplara neden olabileceği için cerrahi rekonstrüksiyon gerektirir. Bu ameliyatın temel amaçları, hastanın dış görünümünü iyileştirmek, işitme fonksiyonlarını desteklemek ve psikososyal etkileri azaltmaktır. Mikrotialı bireylerde kulak kepçesinin olmaması nedeniyle işitme kanalında darlık veya kapalı olma durumu (atrezi) görülebilir ve bu da işitme kaybına yol açabilir (79). Aynı zamanda, özellikle çocukluk döneminde özgüven sorunları ve sosyal etkileşimde zorluklar yaşanabilmektedir. Yapılan araştırmalara göre, erken dönemde gerçekleştirilen kulak rekonstrüksiyonları, bireyin psikolojik gelişimine olumlu katkı sağlamakta ve yüz oranlarını dengeleyerek estetik görünümü iyileştirmektedir (80). Bu nedenle, mikrotia vakalarında cerrahi müdahale hem işlevselliği artırmak hem de estetik olarak tatmin edici sonuçlar elde etmek adına önemli bir seçenektir. Mikrotia ameliyatları, karmaşık cerrahi teknikler gerektiren zorlu prosedürlerdir. Bu operasyonların başlıca zorluklarından biri, hastanın kendi dokularından yeni bir kulak yapısı oluşturulması için yeterli doku bulunamamasıdır. Özellikle kaburgadan alınan kıkırdaklar genellikle sert bir yapıya sahip olup, detaylı şekillendirme gerektirmektedir (81). Geleneksel cerrahi yöntemlerde genellikle birkaç aşamalı operasyon gerekliliği söz konusu olup, bu da uzun bir tedavi sürecine yol açmaktadır. Bunun yanı sıra alloplastik materyaller ile rekonstrüksiyon seçenekleri kullanıldığında da enfeksiyon riski ve implant ekstrüzyonu gibi komplikasyonlar görülebilmektedir. Özellikle gözenekli polietilen gibi alloplastik materyaller kullanıldığında, implantın zamanla ekspozisyon riski vardır (72). Ayrıca, iyileşme süreci genellikle uzun sürmekte ve hastaların düzenli takip edilmesini gerektirmektedir. Son olarak, cerrahi rekonstrüksiyon sonrası elde edilen estetik görünüm her zaman hastanın beklentilerini karşılamayabilir ve ek revizyon ameliyatlarına ihtiyaç duyulabilir (85).

Kulak, insan yüzündeki en karmaşık üç boyutlu anatomik yapılardan biri olup, sesin yönünü algılama ve estetik açıdan yüz simetrisini tamamlama işlevine sahiptir. Kulak kepçesinin kıvrımlı ve girintili yapısı, geleneksel cerrahi yöntemlerle birebir taklit edilmesi zor bir anatomik özellik göstermektedir (3). Ayrıca, kulak kepçesinin esnek olması, travmalara karşı dayanıklılığını artırırken, estetik olarak doğal bir

görünüm elde edilmesini sağlar. Geleneksel cerrahi teknikler bu detaylı anatomik yapıyı yeniden oluşturmada bazı sınırlamalar taşımaktadır. Bu noktada, 3D baskı teknolojisi, kişiye özel ve yüksek doğrulukta üretilen kulak doku iskeleleri sayesinde bu zorlukları aşmak için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Bilgisayar destekli tasarım (CAD) ile hastanın diğer kulağına birebir benzeyen üç boyutlu modeller oluşturulabilmekte ve biyobaskı teknikleriyle uygun doku iskeleleri üretilabilmektedir. 3D baskılı biyomalzemeler sayesinde, kulak kıkırdağının elastikiyetine benzeyen esnek yapılar üretilabilmekte ve biyouyumlu malzemelerle cerrahi entegrasyon daha başarılı hale getirilebilmektedir (2). Geleneksel yöntemlerle yapılan rekonstrüksiyonlarda uzun cerrahi hazırlık süreleri gerekmektedir, 3D baskı ile doku iskelelerinin önceden hazırlanması cerrahi süreyi önemli ölçüde kısaltmaktadır. Sonuç olarak, 3D baskı teknolojisi, geleneksel cerrahi yöntemlere kıyasla daha hassas, biyouyumlu ve hasta memnuniyetini artıran çözümler sunarak, kulak rekonstrüksiyonunun başarısını önemli ölçüde artırmaktadır (74). Bu yöntem, özellikle hücre bazlı biyobaskılar ve biyomalzeme destekli iskelelerle kombine edildiğinde, kulak dokusunun doğal yapısını taklit eden yeni nesil rekonstrüksiyon yaklaşımlarına öncülük etmektedir.

Kulak rekonstrüksiyonu tarih boyunca farklı teknikler ve materyallerle gerçekleştirilmiştir. İlk kayıtlar, M.Ö. 3000 yılına dayanan Edwin Smith Cerrahi Papirüsü'nde bulunmakta olup, antik çağlardan itibaren kulak rekonstrüksiyonuna yönelik girişimlerin var olduğunu göstermektedir (117). İlk cerrahi uygulamalar, Hindistan'daki Sushruta Samhita metinlerinde kayıt altına alınmış olup, bu metinlerde yanak veya alından alınan fleplerle burun ve kulak onarımı tarif edilmiştir. Rönesans döneminde Tagliacozzi (16. yüzyıl), üst kulak ve alt kulak rekonstrüksiyonları için üst kol fleplerini kullanarak önemli ilerlemeler kaydetmiştir (118). 19. yüzyılda, anestezi ve asepti anlayışının gelişmesiyle kulak rekonstrüksiyon cerrahisi daha başarılı hale gelmiştir. Gersuny (1903), ilk kez heliks rekonstrüksiyonunu tanımlamış, 1914'te Streit, heliks ve antiheliks rekonstrüksiyonunda bipediküllü mastoid fleplerini kullanmıştır. Gillies (1920) ise postauriküler flep tekniğini geliştirerek kulak rekonstrüksiyonunun temelini atmıştır (119). 20. yüzyılın ortalarında, kulak rekonstrüksiyonunda otolog kıkırdak kullanımı yaygınlaşmıştır. Tanzer (1959), otolog kostal kıkırdak (kaburga kıkırdağı) kullanarak total kulak rekonstrüksiyonunun

temelini atmıştır. Brent (1970'ler) bu yöntemi geliştirerek dört aşamalı bir cerrahi tanımlamıştır (120). 1990'lı yıllarda Nagata, kulak rekonstrüksiyonunda iki aşamalı bir cerrahi teknik geliştirerek operasyon sürecini daha verimli hale getirmiştir. Bu yöntem, kaburga kırıkdağının şekillendirilmesini ve cerrahi aşamalarını iyileştirerek, rekonstrüksiyon sonrası daha doğal bir görünüm elde edilmesini sağlamıştır (121). Son yıllarda, otolog kırıkdağ rekonstrüksiyonlarına alternatif olarak alloplastik materyaller (gözenekli polietilen gibi) ve 3D biyobaskı teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Medpor implantları, biyouyumlu yapıları ve kolay şekillendirilebilir olmaları nedeniyle klinik uygulamalarda yaygın hale gelmiştir (122). Günümüzde, biyobaskı teknolojisi ile hastaya özel 3D baskılı iskeleler kullanılarak doku mühendisliği tabanlı yaklaşımlar geliştirilmektedir. Doku mühendisliği ve hücre biyobaskılar, biyouyumlu iskeleler ile kombine edilerek daha dayanıklı ve fonksiyonel kulak rekonstrüksiyonları elde edilmesini sağlamaktadır (123).

Tarihsel gelişim sürecinin bu ilerleyişinde mikrotia operasyonları için operasyon zamanını ve zorluğunu azaltan, kontralateral kulak yapısının görünümü ve elastikiyetine benzer rekonstrüksiyonu sunarken ve postoperatif süreçte komplikasyonları minimize eden rekonstrüksiyon seçeneği halen mevcut değildir. Kulak rekonstrüksiyonunda en yaygın kullanılan yöntemlerden biri otolog kostal kırıkdağ (kaburga kırıkdağı) ile yapılan cerrahi operasyonlardır. Ancak bu yöntemin uzun ameliyat süresi, komplikasyon riski ve kırıkdağın istenen esnekliği sağlamaması gibi bazı önemli dezavantajları bulunmaktadır (124). Öncelikle, kostal kırıkdağ rekonstrüksiyonu genellikle 3 aşamalı bir cerrahi süreç gerektirmektedir ve bu süreç 6 ay ila 1 yıl arasında sürebilmektedir (125). Operasyonun karmaşıklığı nedeniyle yalnızca deneyimli cerrahlar tarafından uygulanabilmekte olup, ameliyatın süresi ve iyileşme süreci hastalar için zorlayıcı olabilmektedir. Ayrıca, kaburgadan kırıkdağ alınması nedeniyle hastalar donör bölgesinde ağrı, enfeksiyon ve göğüs deformitesi gibi komplikasyonlar yaşayabilmektedir (68). Bunun yanında, kostal kırıkdağın esnekliği kulak kırıkdağına göre oldukça düşüktür. Yapılan mekanik analizlerde, kaburga kırıkdağının elastik modülünün 11.43 MPa olduğu, buna karşın kulak kırıkdağının elastik modülünün sadece 2 MPa olduğu tespit edilmiştir (124). Bu durum, rekonstrüksiyon sonrası kulak dokusunun sert ve doğal olmayan bir his vermesine neden olabilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız PDMS-TPU kompozit

doku iskelesi kostal kartilajla yapılan rekonstrüksiyonların elastikiyet sorunlarına çözüm sunarken, operasyon zamanını ve zorluğunu kısaltmakta aynı zamanda donör alan morbiditesi yaratmadan rekonstrüksiyon seçeneği sunmaktadır.

Kostal kartilajla yapılan rekonstrüksiyonların dezavantajlarına yönelik alloplastik materyaller alternatif olarak kullanılmıştır. Gözenekli polietilen (Medpor), kulak rekonstrüksiyonunda sık kullanılan bir alloplastik materyaldir ve bazı önemli avantajlar sunmaktadır. Medpor implantları, kıkırdağa kıyasla daha hafif ve esnek bir yapı sunarak doğal kulak dokusunu daha iyi taklit edebilir (87). Ayrıca, Medpor'un gözenekli yapısı sayesinde damar ve doku büyümesine olanak sağlaması, biyouyumluluğunu artırmaktadır (79). Medpor'un bir diğer avantajı ise cerrahi süreci önemli ölçüde kısaltmasıdır. Otolog kıkırdak ile yapılan rekonstrüksiyonlar genellikle 3 aşamalı operasyonlar gerektirirken, Medpor kullanılarak yapılan rekonstrüksiyonlar tek veya iki aşamada tamamlanabilmektedir (68). Ancak, alloplastik materyallerin de bazı dezavantajları vardır. Enfeksiyon riski, implant ekstrüzyonu (dışarı atılma) ve vücudun implanta karşı yabancı cisim reaksiyonu geliştirme ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır (82). Medpor'un en büyük problemi, uzun vadede doku ile entegrasyonunun sınırlı olması ve travmaya karşı doğal kıkırdağa göre daha kırılgan olmasıdır. PDMS-TPU kompozit doku iskeleleri ise Medpor'un kostal kartilaja göre sunduğu avantajları taşıırken Medpor'un sertliğine ve kırılganlığına çözüm bulmaktadır. Aynı zamanda çalışmamızda PDMS-TPU kompozit doku iskelelerine dermal fibroblast ekleyerek biyolojik bileşenlerle implantın uyumunun artırılma hedefi Medpor'un ekstrüzyon ve enfeksiyon riski gibi komplikasyonlarına çözüm amacı taşımaktadır.

Kulak rekonstrüksiyonunda kullanılan alloplastik materyaller zamanla yaygınlaşmış ve silikon bazlı implantlar da rekonstrüksiyon cerrahisinde denenmiştir. Silikon ise geçmişte kulak rekonstrüksiyonunda yaygın olarak kullanılan bir başka alloplastik materyal olmasına rağmen, yeterli doku entegrasyonu sağlayamaması ve komplikasyon oranlarının yüksek olması nedeniyle günümüzde daha az tercih edilmektedir (80). Silikon implantlar, gözenekli olmadıkları için dokular tarafından sarılmaz ve zamanla yerinden kayabilir (126). Bunun yanı sıra, silikon implantlarda enfeksiyon riski Medpor'a kıyasla daha yüksektir, çünkü vücut tarafından tamamen

kabul edilmesi zor olan bu malzeme çevresinde inflamatuvar reaksiyonlara yol açabilmektedir (88). Ayrıca, silikon implantların ekstrüzyon riski yüksektir ve bu durum, implantın zamanla cilt yoluyla dışarı atılmasına neden olabilmektedir (80). Mekanik özellikleri açısından incelendiğinde ise, silikon implantlar kulak kıkırdağının elastikiyetini yeterince taklit edemez ve rekonstrüksiyon sonrası sert bir doku hissi oluşmasına neden olabilir (122). Tüm bu dezavantajlar göz önüne alındığında, günümüzde silikon ve Medpor gibi geleneksel alloplastik materyaller yerine biyobaskı ile üretilen esnek polimerler ve hücrel mühendislik uygulamaları üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle biyomalzemeler ve 3D baskı teknikleri ile kişiye özel, biyouyumlu ve mekanik olarak daha dayanıklı çözümler geliştirilmesi, kulak rekonstrüksiyonunun gelecekteki yönelimleri arasında yer almaktadır (123). Ancak bu yeni geliştirilecek 3D materyaller ile yapılacak rekonstrüksiyon için de Medpor ve silikon benzeri alloplastik materyaller ile yapılan operasyonlarda olduğu gibi temelde doku entegrasyonunun yetersiz olmasından kaynaklı komplikasyonlar gelişmesi olasıdır.

Günümüzde, biyobaskı teknolojisi ve hücrel kaplamalı implantlarla yapılan yeni nesil doku mühendisliği çözümleri, daha biyouyumlu ve fonksiyonel rekonstrüksiyon teknikleri sunmakta olup, gelecekte kulak rekonstrüksiyonunun en ideal yöntemi haline gelebilir (127). Bu çalışmada da üretilen doku iskelelerinin biyolojik bileşenlerle desteklenmesi ile entegrasyon ve vaskülarizasyonun artırılması amaçlanmıştır.

Kulak rekonstrüksiyonunda kullanılan biyomalzemelerin vücuda entegrasyonu, operasyonların başarısı için kritik bir faktördür. Ancak, birçok malzemede dolaşım problemleri nedeniyle yetersiz vaskülarizasyon görülmekte, bu da dokuların yeterince beslenememesine ve iyileşme sürecinin olumsuz etkilenmesine yol açmaktadır (128). Özellikle alloplastik materyaller kullanılarak yapılan rekonstrüksiyonlarda, yetersiz kan dolaşımı sonucu malzemenin ekstrüzyonu, cilt nekrozu ve enfeksiyon gibi komplikasyonlar sıkça görülmektedir (129). Bunun en büyük nedeni, implant materyallerinin doğal dokular gibi damarlanma kapasitesine sahip olmamasıdır. Medpor gibi gözenekli polietilen implantlar, doku ile entegrasyonu bir miktar artırsa da yeterli vaskülarizasyon sağlayamadığında yetersiz kan akışı

nedeniyle iyileşme sürecinde bozulmalar yaşanabilir (130). Bu problemlerin önüne geçmek için, biyomalzemelerin damarlanmasını artıran yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Örneğin, dolaşımı artırmak amacıyla pre-vaskülarizasyon teknikleri uygulanarak, biyomalzemeler içerisine hücre bazlı damar ağları entegre edilebilir (131). Bunun yanı sıra, biyomühendislik ile geliştirilmiş damarlaşmayı destekleyen büyüme faktörleri eklenmiş iskeleler, implantların vücut tarafından kabul edilme oranını artırabilir (132).

Biyomalzemelerin vücutla entegrasyonunda karşılaşılan en büyük zorluklardan biri, yara iyileşmesi sürecinde yetersiz anjiogenezdır. Anjiogenezin yetersiz olduğu durumlarda, implant etrafındaki dokuların yeterli beslenememesi ve oksijen eksikliği nedeniyle hücre ölümü ve ekstrüzyon meydana gelmektedir (128). Özellikle Medpor gibi alloplastik materyaller kullanıldığında, implantın çevresinde yeterli kan dolaşımı oluşmazsa, enfeksiyon riski artar ve yara iyileşmesi süreci olumsuz etkilenir (129). Bu süreçte, yetersiz vaskülarizasyon nedeniyle malzemenin vücut tarafından entegre edilmesi başarısız olabilir. Bu sorunun önüne geçebilmek için, implant materyallerinin yüzeyinde anjiogenezi teşvik eden biyolojik modifikasyonlar yapılmaktadır. Örneğin, biyomalzemelerin yüzeyi endotel hücreleriyle kaplanarak damar gelişimi hızlandırılabilir (131). Ayrıca, biyobaskı teknikleri kullanılarak hücrelerle önceden damarlanmış yapay doku iskeleleri üretmek, iyileşme sürecini hızlandıran yeni bir yaklaşımdır (132). Biyomalzemelerin damarlanmasını artıran bir diğer yöntem, anjiogenik büyüme faktörleri (VEGF gibi) ile zenginleştirilmiş malzemelerin kullanılmasıdır. VEGF içeren implantlar, çevre dokulardan yeni damarların implant içine doğru büyümesini teşvik ederek, doku entegrasyonunu artırmaktadır (131). VEGF eklenmesiyle biyomalzemelerin damarlanması arttığı görülmekle birlikte VEGF'in etki süresinin sınırlı olması nedeniyle çalışmamızda uzun süre boyunca VEGF salgısı yapabilecek bir çözüm olduğunu düşünerek ürettiğimiz kompozit doku iskelelerine dermal fibroblast eklemeyi ve hedeflediğimiz damarlanma artışını anti-VEGF antikoru ile gözlemledik.

Doku mühendisliği ve biyomedikal uygulamalar için geliştirilen 3D baskılı iskeleler, farklı malzemeler kullanılarak üretilebilmektedir. Bu malzemeler mekanik dayanıklılık, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve hücre etkileşimi gibi parametrelere

göre değerlendirilerek seçilmektedir. Kulak rekonstrüksiyonu hedeflendiğinde malzemenin genel özelliklerinin yanında mekanik özellikleri de ön plana çıkmaktadır. Özellikle elastikiyet önem arz eder. Aynı zamanda alloplastik materyallerle yapılan rekonstrüksiyondaki problemlerin önüne geçme amacıyla çalışmamızda kullanılacak doku iskelelerinin dermal fibroblastlar ile kaplanacak olması da 3D baskılı iskelenin üretim sürecinde seçilecek malzemeyi belirlemede önemli ölçütlerdir.

Kullanılan başlıca baskı malzemeleri arasında biyoseramikler, polimerler, kompozit malzemeler ve hidrojel bazlı yapılar bulunmaktadır (133). Polimer esaslı malzemeler, biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanılan seçeneklerden biridir. Polikaprolakton (PCL), Polilaktik Asit (PLA) ve Poliglikolik Asit (PGA) gibi biyobozunur polimerler, doku mühendisliğinde tercih edilmektedir. Bu malzemeler, biyobozunur oldukları için zamanla vücutta parçalanabilir ve mekanik dayanıklılıkları görece düşüktür (134). Biyoseramikler, kemik dokusu mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen bir diğer malzeme grubudur. Hidroksiapatit (HAp) ve kalsiyum fosfat türevleri, kemik benzeri mineral yapıları nedeniyle osteoindüktif özellik gösterir. Ancak, seramikler kırılğan olup, esneklik açısından yetersiz kalabilmektedir (135). Hidrojeller, yüksek su içeriği ile hücresel ortam oluşturma açısından avantajlıdır. Alginate, kollajen ve hyaluronik asit bazlı hidrojeller, hücrelerin büyümesi ve yayılması için uygun ortamlar sunmaktadır. Ancak mekanik dayanıklılıkları oldukça düşüktür ve uzun vadeli implant uygulamaları için yeterli değildir (136).

Polidimetilsiloksan (PDMS), biyomedikal uygulamalarda yaygın kullanılan elastomerik bir polimerdir. Esnekliği, biyoyumluluğu ve kimyasal stabilitesi sayesinde, özellikle yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir (137). PDMS'in en büyük avantajlarından biri, yüksek esneklik göstermesi ve mekanik özelliklerinin kolayca ayarlanabilmesidir. Düşük sertlik değerleri ve elastik yapısı sayesinde, yumuşak doku modellemeleri ve biyobaskı sistemlerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, hücre kültürlerinde oksijen geçirgenliği yüksek olduğu için hücre büyümesi için elverişli bir ortam sunmaktadır (134). Ancak PDMS'in bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Biyobozunur olmaması, uzun süreli implant uygulamaları için bazı kısıtlamalar getirebilse de kulak rekonstrüksiyonu için bu durum dezavantaj yerine avantaj sunar. Bunun yanında, yüzeyinin hidrofobik

olması nedeniyle hücre tutunmasını destekleyecek modifikasyonlar gerekmektedir (133). Bu nedenlerle PDMS, esnek yapısı ve biyouyumluluğu nedeniyle kulak rekonstrüksiyonunda mekanik destek sağlamak amacıyla seçilmiştir. PDMS ile üretilen malzemelerde hücre tutunmasını artırmak için yüzey modifikasyonları ve diğer biyomalzemelerle kombinasyonlar yapılabildiğinden ve çalışmamızda doku iskelelerini dermal fibroblast hücreleri ile zenginleştirmek istediğimizden dolayı sadece PDMS'den oluşan bir doku iskelesi kullanmak yerine PDMS'nin hücre tutunması açısından dezavantajlarını giderecek türde bir malzeme ile entegre edilerek oluşturulacak bir kompozit doku iskelesi üretmeyi amaçladık.

Termoplastik Poliüretan (TPU), biyomedikal alanda kullanılan yüksek elastikiyet gösteren ve biyouyumlu bir polimerdir. Düşük sertliği, mükemmel mekanik dayanımı ve biyolojik uyumu nedeniyle, yumuşak doku mühendisliği ve doku iskelelerinde sıkça tercih edilmektedir (134). TPU'nun en büyük avantajlarından biri, yüksek esneklik ve dayanıklılığını koruyarak biyobozunur versiyonlarının da geliştirilebilmesidir. Ayrıca, hücrelerin yüzeye tutunmasını destekleyen özel yüzey yapıları oluşturulabilmektedir (138). TPU, sert ve esnek bölgelerin bir arada olduğu iskelelerin üretiminde önemli bir avantaj sağlar ve hem mekanik dayanım hem de biyolojik uyum gerektiren uygulamalarda kullanılmaktadır. Ancak TPU'nun bazı dezavantajları da vardır. Hidrofobik yapısı nedeniyle yüzey modifikasyonu biyoaktif faktörlerle zenginleştirilmesi gerekebilir. Ayrıca, bazı TPU türevleri uzun vadede biyolojik bozunma göstermeyebilir, bu nedenle hücre etkileşimi optimize edilmelidir (139).

Termoplastik poliüretan (TPU) ve polidimetil siloksan (PDMS) gibi biyouyumlu malzemeler, esneklikleri, mekanik dayanıklılıkları ve biyolojik aktiviteyi destekleyici özellikleri sayesinde doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (140). TPU, yüksek mekanik dayanıklılığı ve esnekliği sayesinde yumuşak doku mühendisliğinde sıkça tercih edilirken, PDMS biyomedikal uygulamalarda düşük sitotoksikite ve yüksek biyouyumluluk özellikleri nedeniyle öne çıkmaktadır. TPU'nun gözenekli yapısı, hücrelerin migrasyonu ve proliferasyonu için uygun bir mikroçevre sağlarken, PDMS'in elastik özellikleri biyomekanik açıdan avantajlıdır. Ayrıca, PDMS'in hidrofobik yapısı hücresel adezyonu artırmak için

modifiye edilebilir ve bu da hücrelerin doku iskelesi üzerinde daha etkili bir şekilde tutunmasını sağlar (141).

Çalışmamızda, Hsieh ve ark.'nın (142) çalışmasına benzer şekilde, termoplastik poliüretan (TPU) ve polidimetil siloksan (PDMS) kombinasyonu kullanılarak biyomalzemelerin biyomekanik ve biyolojik avantajları bir araya getirilmiştir. Kullandığımız doku iskelelerinin mekanik özellikleri kulak rekonstrüksiyonu için uygun özellikler sağlasa da alloplastik materyaller ile yapılan rekonstrüksiyonların komplikasyonları arasında yetersiz vaskülarizasyona bağlı uyumsuzluk ve ekstrüzyon yer aldığı için eklenecek biyolojik bileşenlerle iskelenin uyum sürecini arttırmayı hedefledik. Literatürdeki önceki çalışmalardan farklı olarak, bu yaklaşım biyouyumluluğu artırarak vaskülarizasyonu ve doku rejenerasyonunu teşvik etmeyi amaçlamakta iken biyolojik bileşen seçiminin vaskülarizasyonun ve entegrasyonun artırılması doğrultusunda olması önem arz eder.

Üç boyutlu baskılı doku iskeleleri, hücrelerin büyümesini desteklemek ve doku rejenerasyonunu hızlandırmak amacıyla biyolojik bileşenlerle modifiye edilebilmektedir. Biyolojik bileşenlerin eklenmesi, doku mühendisliği yaklaşımlarında hücre-iskelet etkileşimini güçlendirmekte, mekanik özellikleri optimize etmekte ve biyolojik entegrasyonu artırmaktadır (143).

Büyüme faktörleri, biyomalzemelere eklenebilecek en önemli biyolojik bileşenler arasında yer almaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi biyomoleküller, hücre büyümesini ve damarlanmayı teşvik ederek doku entegrasyonunu hızlandırmaktadır (144). Ancak, büyüme faktörlerinin yüksek maliyetleri ve kısa ömürlü olmaları pratik uygulamalarını sınırlayabilmektedir. Nanoteknolojik bileşenler, 3D baskılı doku iskelelerine entegre edilerek biyolojik aktivitenin artırılmasına olanak tanımaktadır. Hidroksiapatit (HAp), biyoseramik nanoparçacıklar ve karbon nanotüpler, özellikle kemik ve kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılarak iskelelerin biyomekanik özelliklerini geliştirmektedir (143). Nanoteknolojik bileşenler aynı zamanda antibakteriyel özellikler kazandırarak implant sonrası enfeksiyon risklerini azaltabilmektedir (145). Çalışmamızda kullanılan doku iskelelerinin PDMS ve TPU temelli mekanik özellikleri kulak

rekonstrüksiyonu için uygun olanaklar sunduğundan vaskülarizasyonu arttırmaya yönelik biyolojik bileşenleri hedeflemek daha uygun sonuçlar elde edilmesine olanak sağlamıştır.

Dermal fibroblastlar, doku mühendisliğinde kullanılan önemli bir hücre türü olup, fibröz doku oluşumuna katkı sağlamaları ve damarlaşmayı artırmaları nedeniyle tercih edilmektedir. Bu hücreler, bağ dokusunun temel bileşenlerinden biri olan kolajeni sentezleyerek doku iskelelerinin daha sağlam ve biyomekanik olarak uyumlu hale gelmesine yardımcı olur (146). Dermal fibroblastların en büyük avantajlarından biri vaskülarizasyonu teşvik etmeleridir. Bu hücreler, VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) gibi anjiogenik faktörler salgılayarak damar oluşumunu destekler ve doku iskeletlerinin kanlanması artırır (147). Dermal fibroblastların hipoksik (düşük oksijen) koşullarda bile damar oluşumunu artırabildiği ve fibrin bazlı doku iskelelerinde kapiller ağ yapısını desteklediği gösterilmiştir (148). Bunun yanı sıra, dermal fibroblastlar doku mühendisliği uygulamalarında hem endotel hücreleriyle hem de diğer bağ dokusu hücreleriyle etkileşime girerek daha stabil ve fonksiyonel dokular oluşturabilir. Yapılan çalışmalar, dermal fibroblastların kan damarı oluşumunu doğrudan teşvik ettiğini ve kapiller damar yapılarının daha iyi organize olmasını sağladığını ortaya koymuştur (149). Bu nedenle, dermal fibroblastlar, fibröz doku oluşumuna katkı sağlamaları, doku iskeletlerinin dayanıklılığını artırmaları ve özellikle damar oluşumunu teşvik etmeleri nedeniyle çalışmamızda kullanılan PDMS-TPU kompozit doku iskelelerine eklenecek biyolojik bileşen olarak diğer alternatiflerinden daha ön plana çıkmaktadır.

Vaskülarizasyon, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta, implante edilen doku iskelelerinin başarısı açısından kritik bir faktördür. Yetersiz vaskülarizasyon, oksijen ve besinlerin yetersiz taşınmasına neden olarak doku kaybına ve implant başarısızlığına yol açabilir. Yapılan çalışmalar, gelişmiş 3D baskılı iskele tasarımlarının, biyolojik büyüme faktörlerinin ve kök hücre bazlı yaklaşımların vaskülarizasyonu artırmada önemli rol oynadığını göstermektedir (150). Özellikle gözenekli iskele yapılarının, damarlaşmayı desteklediği belirlenmiştir. Por boyutu, gözenek şekli ve mikro/nano-yapılandırmalar, damar oluşumunu etkileyen en önemli parametreler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda, büyük gözenekli

iskelelerin hücre göçünü kolaylaştırdığı ve oksijen/nutrient difüzyonunu artırarak yeni damar oluşumunu teşvik ettiği gözlemlenmiştir (151). Büyüme faktörleri de vaskülarizasyonun artırılmasında önemli bir role sahiptir. VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) ve FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü) gibi anjiogenik faktörler, hücre bazlı iskelelerde damar büyümesini desteklemektedir. Yapılan bir çalışmada, insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden türetilen endotel hücreleri kullanılarak, biyomimetik bir iskeleyle dermal greftlerde damarlaşmanın artırılabilceği gösterilmiştir (152). Ayrıca, hidrojel bazlı sistemlerin vaskülarizasyonu teşvik edebileceği belirtilmiştir. Alginate-fibroin bazlı hidrojellerin damar hücrelerini desteklediği ve kan damarlarının oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir (153). Öte yandan, biyobaskı teknikleriyle üretilen iskeleler, damarlaşmayı artıran mikrokanal sistemleriyle donatılarak hücrelerin oksijen alımını kolaylaştırmaktadır. 3D baskılı iskelelerde kan damarı oluşturmayı hedefleyen mikrokannallar, oksijen ve besin akışını kolaylaştırarak implant bölgesinde damarlanmayı desteklemektedir (154).

Vaskülarizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için farklı değerlendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Histolojik analiz, görüntüleme teknikleri, biyomarker ölçümleri ve fonksiyonel testler, doku iskelelerinde yeni damar oluşumunun seviyesini ölçmek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (151). Histolojik incelemeler, vaskülarizasyon değerlendirmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hematoksilen-eozin (H&E) ve CD31 immünohistokimyasal boyama, yeni kan damarlarının doku iskeleti içinde oluşumunu görselleştirmek için sıkça tercih edilmektedir (155). CD31, endotel hücrelerine özgü bir marker olup, yeni damar oluşumunun kantitatif analizinde kullanılmaktadır. Ancak, histolojik analizler genellikle son nokta analizleri olduğundan, damarlaşmanın zaman içindeki dinamik değişimlerini takip etmek için yetersiz kalabilir. Gelişmiş görüntüleme teknikleri, damarlaşmayı in vivo olarak takip etmek için güçlü araçlar sunmaktadır. Mikro-CT (mikro bilgisayarlı tomografi), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve Doppler ultrasonografi, damar oluşumunu üç boyutlu olarak incelemeye olanak tanır (150). Özellikle Doppler ultrason, kan akış hızını ölçerek yeni damarların fonksiyonel olup olmadığını değerlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır (152). Biyokimyasal marker analizleri de damar oluşumunun değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir. VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme

Faktörü), FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü) ve HIF-1 α (Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1 α) gibi biyomoleküllerin seviyelerinin ölçülmesi, yeni damar oluşumunun biyokimyasal göstergeleri olarak kabul edilmektedir (156). Bu markerlerin seviyeleri, ELISA veya RT-PCR gibi tekniklerle ölçülerek yeni damar oluşumunun kantitatif değerlendirmesi yapılabilir. Bunun yanı sıra, fonksiyonel testler, damarların oksijen ve besin taşıma kapasitesini ölçmek için kullanılmaktadır. Lazer Doppler ve oksijen difüzyon ölçümleri, iskele içindeki damarların ne kadar iyi çalıştığını belirlemek için sıkça kullanılan yöntemlerdir (157, 158).

VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü), doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında damar oluşumunu teşvik eden en önemli büyüme faktörlerinden biridir. Ancak, anormal veya aşırı VEGF ekspresyonu, istenmeyen damar oluşumlarına (neovaskülarizasyon), inflamasyon artışına ve kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açabilir (159). Anti-VEGF boyaması, VEGF'in doku içinde ne kadar ekspresse edildiğini görselleştirmek ve belirli bölgelerdeki anjiyogenezi analiz etmek için kullanılan spesifik bir yöntemdir. Anti-VEGF boyamasının seçilme nedenlerinden biri, doku iskeletlerindeki damarlanma sürecinin incelenmesi ve anjiyogenez mekanizmalarının detaylı olarak anlaşılmasıdır. Yapılan çalışmalarda, anti-VEGF ajanlarının uygulanması sonucunda VEGF ekspresyon seviyelerinin değiştiği ve bu değişimin doku iyileşmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (160). Özellikle in vivo modellerde anti-VEGF boyaması kullanılarak, hücre kültürlerinde ve doku örneklerinde anjiyogenez seviyelerinin doğrulanması mümkün olmaktadır (161). Ayrıca, anti-VEGF boyaması, tümör vaskülarizasyonunun ve patolojik damar oluşumunun takibinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (162). Bu bağlamda, anti-VEGF immünohistokimyasal analizi hem fizyolojik hem de patolojik damar oluşumlarını değerlendirmek için kritik bir araç olarak kabul edilmektedir. Sonuç olarak, anti-VEGF boyamasını seçme nedenimiz, anjiyogenez sürecini objektif olarak değerlendirebilmek, iskeleler üzerindeki damarlaşma miktarını belirleyebilmek ve VEGF'in ekspresyon seviyelerini detaylı bir şekilde analiz edebilmektir. Bu yöntem, hem doku mühendisliği hem de biyomedikal araştırmalarda damar oluşumunu incelemek için en güvenilir immünohistokimyasal tekniklerden biridir (163).

CD31 (PECAM-1), endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir hücre adezyon

molekölüdür ve damar oluşumunun doğrudan bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Doku mühendisliği çalışmalarında damarlaşma sürecinin değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan biyobelirteçlerden biridir. CD31, endotel hücrelerinin varlığını ve yoğunluğunu belirlemeye yardımcı olur ve histolojik/immünohistokimyasal analizlerde yeni damar oluşumunun kantitatif değerlendirilmesini sağlar (164). CD31'in ekspresyonu, yeni oluşan damarların sayısını ve olgunlaşma seviyesini belirlemek için kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, CD31'in immünohistokimyasal boyaması ile damar yoğunluğunun kantitatif olarak ölçülebildiği ve vaskülarizasyon süreçlerinin başarılı olup olmadığının belirlenebildiği gösterilmiştir (165). Ayrıca, CD31 seviyelerinin yüksek olması, damar ağlarının arttığını ve doku iskeletinin biyouyumlu olduğunu doğrulayan önemli bir biyobelirteçtir (166). CD31'in seçilme nedenlerinden biri de yalnızca damar endotel hücrelerinde değil, immün hücreler üzerinde de eksprese edilmesi ve böylece doku iskeletinde immün tepkilerin de gözlemlenmesine olanak sağlamasıdır (167). Sonuç olarak, CD31, hem endotel hücreleri tarafından üretilen damarların sayısını belirlemek hem de yeni oluşan damarların olgunlaşma düzeyini analiz etmek için en iyi biyobelirteçlerden biri olduğu için bu çalışmada seçilmiştir.

Biyomalzemelerin, büyüme faktörlerinin ve hücre bazlı tedavilerin biyouyumluluğunu ve etkinliğini değerlendirmek amacıyla deney hayvanı modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. İn vivo deneyler, doku iskelelerinin hücresel yanıtını, immün tepkisini ve damarlaşmasını test etmek için kritik öneme sahiptir (168). İn vivo modeller, doku mühendisliği çalışmalarında biyomalzemelerin canlı dokularla etkileşimini daha gerçekçi bir şekilde değerlendirmeye olanak tanır. Hücrelerin büyümesi, iskelelerin biyobozunurluğu, immün yanıt ve yeni damar oluşumu gibi süreçler, in vivo modellerde daha güvenilir bir şekilde incelenebilir (169). Ancak, in vivo deneylerin bazı kısıtlamaları da bulunmaktadır. Deney hayvanları, insan biyolojisini tam olarak yansıtamayabilir ve bazı doku tepkileri türler arasında farklılık gösterebilir (170). Ayrıca, etik kaygılar nedeniyle hayvan deneyleri yapılırken 3R ilkeleri (Replacement – Alternatif Yöntemlerin Kullanımı, Reduction – Hayvan Sayısının Azaltılması, Refinement – Hayvanların Refahının Artırılması) dikkate alınmalıdır (171). Buna rağmen, in vivo modeller, biyomalzemelerin biyomekanik özelliklerini ve biyouyumluluğunu test etmek için önemli veriler sağlar. Örneğin,

damarlaşmanın ve doku entegrasyonunun nasıl geliştiğini incelemek için deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, insan klinik çalışmalarına geçişte önemli bir basamak oluşturmaktadır (172). Sonuç olarak, deney hayvanı modelleri, biyomalzemelerin ve hücresel terapilerin klinik uygulamalara geçmeden önce test edilmesi açısından kritik bir role sahiptir. Bu modeller, doku mühendisliği yaklaşımlarının etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için en iyi yöntemlerden biri olup, belirli etik kurallar çerçevesinde kullanıldığında bilimsel gelişmelere büyük katkı sağlamaktadır.

Üç boyutlu baskı ile üretilmiş dermal fibroblast hücreleri ekilmiş PDMS-TPU kompozit doku iskelelerinin deney hayvan modeliyle test edildiği bu çalışmamızda 8. hafta CD31 pozitif vasküler yapılar açısından, skafold hücresiz grupta ortalama $8,67 \pm 4,04$ adet ve skafold hücreli grupta $16,00 \pm 3,61$ adet olarak bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,127$). 12. haftada ise skafold hücresiz grupta $16,33 \pm 3,06$ adet, skafold hücreli grupta ise $36,33 \pm 4,16$ adet olarak damar yapıları ölçülmüş ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p=0,043$). Bu bulgular, literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında tutarlı bir görünüm sergilemektedir. Ibañez ve arkadaşları (173) tarafından yapılan bir çalışmada, 3D baskılı iskelelere platelet-rich plasma (PRP) eklenerek vaskülarizasyonun artırıldığı ve 14 gün boyunca büyüme faktörlerinin kontrollü salımı sayesinde in vivo olarak anjiyogenezin desteklendiği gösterilmiştir. Tan ve arkadaşları (174) tarafından yapılan başka bir araştırmada, 3D baskılı doku iskelelerinin ticari deri ikamelerine kıyasla daha iyi vasküler entegrasyon sağladığı belirtilmiştir. Sun ve arkadaşları (175) tarafından yapılan klinik bir çalışmada, 3D baskılı iskelelerin kronik yara iyileşmesine etkisi değerlendirilmiş ve bu tür yapıların vaskülarizasyonu hızlandırarak yara kapanma süresini azalttığı rapor edilmiştir. Chu ve arkadaşları (176) tarafından yapılan bir çalışmada, 3D baskılı skafoldlara anjiyogenez teşvik edici peptidlerin eklenmesiyle vasküler gelişimin hızlandığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen CD31 pozitif vasküler yapıların artışı, literatürdeki benzer çalışmalarla büyük ölçüde uyumludur. Bulgularımız, 3D baskılı doku iskelelerinin vaskülarizasyonu artırarak yara iyileşmesini desteklediğini ve bu alandaki mevcut araştırmalarla örtüştüğünü göstermektedir.

Çalışmamızda VEGF pozitif vasküler yapılar açısından, 8. haftada skafold hücresiz grupta ortalama $16,00 \pm 12,29$ adet, skafold hücreli grupta ise $37,67 \pm 3,06$ adet olup, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,041$). 12. haftada ise skafold hücresiz grupta $21,33 \pm 3,51$ adet, skafold hücreli grupta $31,00 \pm 7,94$ adet damar sayısı saptanmış ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,132$). Bu bulgular literatürdeki benzer çalışmalarla büyük ölçüde uyumludur. Siebert ve ark. (177) tarafından yapılan bir çalışmada, 3D baskılı hidrojel yamalarına VEGF eklenerek anjiyojenik aktivitenin artırıldığı ve erken dönemde vaskülarizasyonun hızlandığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, Du ve ark. (178), Astragalus polisakkarit içeren 3D baskılı skafoldların VEGF ekspresyonunu artırarak erken anjiyogenezi hızlandırıldığını göstermiştir. Nuutila ve ark. (179), büyüme faktörü salan 3D baskılı yapışkan skafoldların VEGF salımını artırarak yara iyileşmesini hızlandırıldığını göstermiştir. Ayrıca, Gu ve ark. (180), 3D baskılı nanofiber skafoldlara VEGF ekleyerek anjiyogenezi ve yeni damar oluşumunun teşvik edilebileceğini göstermiştir. Sonuç olarak, çalışmamızda 8. haftada skafold hücreli grupta VEGF pozitif vasküler yapılar açısından anlamlı bir artış gözlenmesi, literatürdeki çalışmalarla büyük ölçüde tutarlıdır. Ancak 12. haftada farkın kaybolması, VEGF'nin zamanla biyolojik sistemde dengelendiğini ve skafold etkisinin uzun vadeli değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak CD31 ve VEGF antikollarının immünreaktivite şiddetlerinin semikantitatif skorlamasında, her iki farklı haftada doku iskeleleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ayrıca, 8. haftaya göre 12. haftada her iki farklı doku iskelelerinde de anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Konopnicki ve ark. (181) tarafından yapılan bir çalışmada, 3D baskılı β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) ve poli- ϵ -kaprolakton (PCL) skafoldlarının in vivo olarak kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve CD31 ekspresyonunun skafold merkezinde arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, Liao ve ark. (182), 3D kültür ortamında skafoldlar üzerinde endotel hücrelerinden kapiller benzeri ağ oluşumunu destekleyen bir yapı oluşturdıklarını göstermiştir. Arnal-Pastor ve ark. (183) tarafından yapılan araştırmada, farklı gözenek yapısına sahip skafoldların endotel hücre yapışması ve VEGF salınımı üzerindeki etkileri incelenmiş, süngerimsi (PEA-s) skafoldların, damar benzeri yapılara dönüşümü daha fazla teşvik ettiği rapor

edilmiştir. Ayrıca, Fahimipour ve ark. (184) tarafından yapılan çalışmada, 3D baskılı β -TCP bazlı skafoldlara VEGF yüklenmesiyle erken vaskülarizasyonun teşvik edildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, çalışmamızda CD31 ve VEGF immünreaktivite skorlamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kullanılan skafoldların gözenek yapısı, hücre adezyonu, büyüme faktörü salınım mekanizmaları gibi değişkenler, farklı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesine neden olabilir. Daha uzun takip süreleri veya biyomalzeme içeriğinin değiştirilmesi, VEGF ve CD31 ekspresyonundaki farklılıkların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle, kullanılan doku iskeleleri belirli bir malzeme bileşimine dayanmaktadır ve farklı biyomalzemelerin karşılaştırılması yapılmamıştır. Bu durum, diğer potansiyel biyomalzemelerin etkinliğini değerlendirme imkânını sınırlamaktadır.

İkinci olarak, çalışma sınırlı bir zaman diliminde gerçekleştirilmiş olup, uzun vadeli doku yanıtları hakkında kesin çıkarımlarda bulunmak mümkün olmamıştır. Özellikle 12. hafta sonrasında vasküler yapının gelişimi üzerine daha uzun süreli takiplerin yapılması gerekmektedir.

Üçüncü olarak, hayvan modeli kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışma, insan doku mühendisliği uygulamalarına tamamen genellenemez. İnsan vücudu ile biyomalzemeler arasındaki etkileşim, hayvan modellerinden farklılık gösterebilir. Klinik uygulamalara geçiş için ileri çalışmalar gerekmektedir. Aynı zamanda hayvan deneylerinde ve seçilen örneklem sayısında verilerin optimal değerlendirilmesi güçlük taşımaktadır. Çalışma kompozit doku iskelelerinin farklı açıdan denendiği farklı projelerle geliştirilecek ve var olan örneklem sayısının sonraki süreçte artırılması için çalışılacaktır.

Son olarak, immünohistokimyasal analizler semikantitatif olarak yapılmış olup, kantitatif görüntüleme yöntemleri ile desteklenmemiştir. Gelecekte daha hassas görüntüleme ve analiz tekniklerinin kullanılması, elde edilen sonuçların doğruluğunu artırabilir.

Bu kısıtlılıklar göz önünde bulundurulduğunda, çalışmanın bulgularının daha geniş kapsamlı ve uzun süreli araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Uzun vadeli biyomekanik stabilitenin değerlendirilmesi için daha uzun süreli takip gerekmekte olup, fibroblast eklenmiş biyomalzemelerin vaskülarizasyon üzerindeki etkisini artırmak için büyüme faktörü salınımı içeren biyomateryaller ile karşılaştırmalı çalışmalar yapılmalıdır. Çalışmamız, biyomateryal tabanlı doku mühendisliği yaklaşımlarının potansiyelini göstermek olup rekonstrüktif cerrahide eksik doku ve organlar için otolog rekonstrüksiyonlara alternatif olarak kullanım sıklığı artacak olan biyomateryallerin doku ile uyumu ve damarlanma potansiyeline ışık tutar. Ancak, in vivo uzun dönem stabilite, biyoyumluluk ve fonksiyonel iyileşme açısından daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

‘Üç Boyutlu Dermal Fibroblast İçeren Termoplastik Poliüretan Ve Polidimetil Siloksan Doku İskelelerinin Yara Uatağında Oluşturduğu Mikrovasküler Değişikliklerin İncelenmesi’ konulu çalışmanın sonuçları;

- Çalışmamızda, 8. hafta CD31 pozitif vasküler yapılar açısından skafold hücresiz grupta ortalama $8,67 \pm 4,04$ adet, skafold hücreli grupta $16,00 \pm 3,61$ adet olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,127$). Ancak, 12. haftada skafold hücresiz grupta $16,33 \pm 3,06$ adet skafold hücreli grupta $36,33 \pm 4,16$ adet damar yapısı saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,043$).
- VEGF pozitif vasküler yapılar açısından, 8. haftada skafold hücresiz grupta $16,00 \pm 12,29$ adet, skafold hücreli grupta $37,67 \pm 3,06$ adet olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,041$). 12. haftada ise skafold hücresiz grupta $21,33 \pm 3,51$ adet, skafold hücreli grupta $31,00 \pm 7,94$ adet damar yapısı saptanmış ancak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,132$).
- CD31 ve VEGF immünreaktivite analizleri, skafold hücreli grupta erken dönemde belirgin bir vaskülarizasyon artışı gösterse de uzun vadede anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- Histolojik analizler, TPU ve PDMS içeren skafoldların yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini ve doku rejenerasyonunu desteklediğini ortaya koymuştur.
- Çalışma kapsamında kullanılan skafoldlar, biyouyumlu olmalarına rağmen, uzun vadeli biyolojik yanıtlar açısından daha ileri çalışmalar gerektirmektedir.
- VEGF ve CD31 ekspresyonunda zaman içinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemesi, skafold yapılarının uzun süreli anjiyogenez üzerindeki etkisini değerlendirmek için ek araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.
- Genel olarak, TPU ve PDMS kombinasyonlarının doku mühendisliği uygulamalarında umut vaat ettiği, ancak biyomekanik ve biyolojik optimizasyon için ek geliştirmelere ihtiyaç duyduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Brennan JR, Cornett AM, Chang B, Crotts SJ, Nourmohammadi Z, Lombaert IMA, et al. Preclinical assessment of clinically streamlined, 3D-printed, biocompatible single- and two-stage tissue scaffolds for ear reconstruction. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2020.
2. Srivastava A, Long E, Wu L, Song WH. 203 Developing and Fine-Tuning Novel 3D-Printed Biodegradable Scaffolds to Promote Auricular Cartilaginous Regeneration for Surgical Implantation. *British Journal of Surgery*. 2021;108.
3. Jiang R, Wang G, Zhang J, Zhang X, Zhou L, Xu T. Three-dimensional bioprinting of auricular cartilage: A review. *Medicine in Drug Discovery*. 2019.
4. Luquetti DV, Leoncini E, Mastroiacovo P. Microtia-anotia: A global review of prevalence rates. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2011;91(9):813-22.
5. Li D, Xu F, Zhang R, Zhang Q, Xu Z, Li Y, et al. Surgical reconstruction of traumatic partial ear defects based on a novel classification of defect sizes and surrounding skin conditions. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2016;138(2):307e-16e.
6. Soukup B, Mashhadi SA, Bulstrode NW. Health-related quality-of-life assessment and surgical outcomes for auricular reconstruction using autologous costal cartilage. *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;129(3):632-40.
7. Bly RA, Bhrany AD, Murakami CS, Sie KC. Microtia reconstruction. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2016;24(4):577.
8. Cabin JA, Bassiri-Tehrani M, Sclafani AP, Romo 3rd T. Microtia reconstruction: autologous rib and alloplast techniques. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2014;22(4):623-38.
9. Lewin S. Complications after total porous implant ear reconstruction and their management. *Facial Plastic Surgery*. 2015;31(06):617-25.
10. Kozusko SD, Konofaos P, Wallace RD. The History of Alloplastic Ear Reconstruction for Microtia. *Annals of Plastic Surgery*. 2020;85(1):89-92.
11. Schroeder MJ, Lloyd MS. Tissue engineering strategies for auricular reconstruction. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2017;28(8):2007-11.
12. Otto I, Melchels F, Zhao X, Randolph M, Kon M, Breugem C, et al. Auricular reconstruction using biofabrication-based tissue engineering strategies. *Biofabrication*. 2015;7(3):032001.
13. Ozbolat V, Dey M, Ayan B, Povilianskas A, Demirel MC, Ozbolat IT. 3D printing of PDMS improves its mechanical and cell adhesion properties. *ACS*

Biomaterials Science & Engineering. 2018;4(2):682-93.

14. Chen Q, Mangadlao JD, Wallat J, De Leon A, Pokorski JK, Advincula RC. 3D printing biocompatible polyurethane/poly (lactic acid)/graphene oxide nanocomposites: anisotropic properties. *ACS applied materials & interfaces*. 2017;9(4):4015-23.
15. Shie M-Y, Chang W-C, Wei L-J, Huang Y-H, Chen C-H, Shih C-T, et al. 3D printing of cytocompatible water-based light-cured polyurethane with hyaluronic acid for cartilage tissue engineering applications. *Materials*. 2017;10(2):136.
16. Drupitha MP, Bankoti K, Pal P, Das B, Parameswar R, Dhara S, et al. Morphology-induced physico-mechanical and biological characteristics of TPU-PDMS blend scaffolds for skin tissue engineering applications. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2018;107 5:1634-44.
17. Zopf DA, Mitsak AG, Flanagan CL, Wheeler M, Green GE, Hollister SJ. Computer aided–designed, 3-dimensionally printed porous tissue bioscaffolds for craniofacial soft tissue reconstruction. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery*. 2015;152(1):57-62.
18. Liao J, Chen Y, Chen J, He B, Qian L, Xu J, et al. Auricle shaping using 3D printing and autologous diced cartilage. *The Laryngoscope*. 2019;129(11):2467-74.
19. Joshi A, Choudhury S, Gugulothu SB, Visweswariah SS, Chatterjee K. Strategies to Promote Vascularization in 3D Printed Tissue Scaffolds: Trends and Challenges. *Biomacromolecules*. 2022.
20. Später T, Mariyanats AO, Syachina MA, Mironov AV, Savelyev AG, Sochilina AV, et al. In Vitro and in Vivo Analysis of Adhesive, Anti-Inflammatory, and Proangiogenic Properties of Novel 3D Printed Hyaluronic Acid Glycidyl Methacrylate Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering. *ACS biomaterials science & engineering*. 2020;6 10:5744-57.
21. Bavaresco B, Comín R, Salvatierra NA, Cid MP. Three-dimensional printing of collagen and hyaluronic acid scaffolds with dehydrothermal treatment crosslinking. *Composites Communications*. 2020.
22. Gorin C, Rochefort GY, Bascetin R, Ying H, Lesieur J, Sadoine J, et al. Priming Dental Pulp Stem Cells With Fibroblast Growth Factor-2 Increases Angiogenesis of Implanted Tissue-Engineered Constructs Through Hepatocyte Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Secretion. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2016;5.
23. Woloszyk A, Mitsiadis TA. Angiogenesis within Stem Cell-Seeded Silk Scaffolds Cultured on the Chorioallantoic Membrane and Visualized by 3D Imaging. *Current protocols in stem cell biology*. 2017;41:1F.19.1-1F..9.
24. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World journal of surgery*. 2004;28:321-6.

25. Guo Sa, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*. 2010;89(3):219-29.
26. Braverman IM, editor *The cutaneous microcirculation*. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; 2000: Elsevier.
27. Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Veterinary dermatology*. 2001;12(6):303-13.
28. Mussbacher M, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Schrottmaier WC, Assinger A. Mechanisms of Hemostasis: Contributions of Platelets, Coagulation Factors, and the Vessel Wall. *Fundamentals of Vascular Biology*. 2019.
29. Periyah MH, Halim AS, Mat Saad AZ. Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*. 2017;11:319 - 27.
30. Kirsner RS, Eaglstein WH. The wound healing process. *Dermatologic clinics*. 1993;11(4):629-40.
31. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*. 2007;25(1):9-18.
32. Natrus LV, Ryzhko IM, Blazquez-Navarro A, Panova TI, Zaychenko GV, Klymenko O, et al. Correlational analysis of the regulatory interplay between molecules and cellular components mediating angiogenesis in wound healing under normal and hyperglycemic conditions. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2021.
33. Ellis S, Lin EJ, Tartar DM. Immunology of Wound Healing. *Current Dermatology Reports*. 2018;7:350 - 8.
34. Kotwal GJ, Chien S. Macrophage Differentiation in Normal and Accelerated Wound Healing. Results and problems in cell differentiation. 2017;62:353-64.
35. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*. 2020;10(9):200223.
36. Toma AI, Fuller JM, Willett NJ, Goudy SL. Oral wound healing models and emerging regenerative therapies. *Translational Research*. 2021;236:17-34.
37. George Broughton I, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006;117(7S):12S-34S.
38. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2011;19(3):441.
39. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*. 1999;341(10):738-46.

40. Bae S-H, Hwang T, Han MR. Unraveling the hypoxia modulating potential of VEGF family genes in pan-cancer. *Genomics & Informatics*. 2023;21.
41. Zhou Y, Zhu X, Cui H, Shi J, Yuan G, Shi S, et al. The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021;8.
42. Bahram F, Claesson-Welsh L. VEGF-mediated signal transduction in lymphatic endothelial cells. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology*. 2010;17 4:253-61.
43. Kim SO, Trau HA, Duffy DM. Vascular endothelial growth factors C and D may promote angiogenesis in the primate ovulatory follicle†. *Biology of Reproduction*. 2017;96:389 - 400.
44. Nishida Y, Yamada Y, Kanemaru H, Ohazama A, Maeda T, Seo K. Vascularization via activation of VEGF-VEGFR signaling is essential for peripheral nerve regeneration. *Biomedical research*. 2018;39 6:287-94.
45. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(12):2514-23.
46. Park S, Sorenson CM, Sheibani N. PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis. *Clinical science*. 2015;129 3:217-34.
47. Reinke J, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European surgical research*. 2012;49(1):35-43.
48. Ellis S, Lin EJ, Tartar D. Immunology of wound healing. *Current dermatology reports*. 2018;7:350-8.
49. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*. 1997;77(3):509-28.
50. Bly RA, Bhrany AD, Murakami CS, Sie KCY. Microtia Reconstruction. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2016;24 4:577-91.
51. Behar BJ, Mackay DR. Brent technique for microtia reconstruction. *Operative Techniques in Otolaryngology-head and Neck Surgery*. 2017;28:77-83.
52. Fu Y-y, Li C-l, Zhang J-l, Zhang T-Y. Autologous cartilage microtia reconstruction: Complications and risk factors. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2019;116:1-6.
53. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2014;39:25-32.
54. Pawlina W, Ross MH. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.

55. Zhang Z. Chondrons and the pericellular matrix of chondrocytes. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2015;21 3:267-77.
56. Horvai AE, editor *Anatomy and Histology of Cartilage* 2011.
57. Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *Journal of developmental biology*. 2015;3:177 - 92.
58. Mescher AL. *Junqueira's basic histology: text and atlas*: New York: McGraw Hill; 2018.
59. Dou Z, Muder D, Baroncelli M, Bendre AD, Gkourogianni A, Ottosson L, et al. Rat perichondrium transplanted to articular cartilage defects forms articular-like, hyaline cartilage. *bioRxiv*. 2020.
60. Jung CK, editor *Articular Cartilage: Histology and Physiology* 2014.
61. Nakayama N, Umeda K, editors. *From Pluripotent Stem Cells to Lineage-Specific Chondrocytes: Essential Signalling and Cellular Intermediates* 2011.
62. Nerurkar NL, Han WM, Mauck RL, Elliott DM. Homologous structure-function relationships between native fibrocartilage and tissue engineered from MSC-seeded nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 2011;32 2:461-8.
63. Daniel RK, Calvert JW. Diced cartilage grafts in rhinoplasty surgery. *Plastic and reconstructive surgery*. 2004;113(7):2156-71.
64. Marin VP, Landecker A, Gunter JP. Harvesting rib cartilage grafts for secondary rhinoplasty. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;121(4):1442-8.
65. Olshinka A, Louis M, Truong TA, editors. *Autologous ear reconstruction. Seminars in plastic surgery*; 2017: Thieme Medical Publishers.
66. Pearl RA, Sabbagh W. Reconstruction following traumatic partial amputation of the ear. *Plastic and reconstructive surgery*. 2011;127(2):621-9.
67. Mohanty S, Manimaran V. Role of Autologous Costal Cartilage Grafts in Otolaryngology Practice: A Surgical Review. *International Journal of Head and Neck Surgery*. 2017;8:93-7.
68. Ma Y, Lloyd MS. Systematic Review of Medpor Versus Autologous Ear Reconstruction. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2021;33:602 - 6.
69. Asirova GV, Wynands J, Frolov S, Almeida D, Davydenko P, Madina S. Optimal surgical timing for ear reconstruction with autologous cartilage: Analysis of the computed tomography scan characteristics of the ribs. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2023;88:15-23.
70. Ladani P, Valand R, Sailer HF. Ear Reconstruction Using Autologous Costal

Cartilage: A Steep Learning Curve. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*. 2018;18:371-7.

71. Ng NYB, Loh CYY, Athanassopoulos T, editors. *Auricular Prosthesis in Burn Reconstruction* 2017.

72. Federspil PA. The Role of Auricular Prostheses (Epitheses) in Ear Reconstruction. *Facial Plastic Surgery*. 2015;31:626 - 32.

73. Yenisey M, Kaleli N, Kunt GE, editors. *Prosthetic Reconstruction of Auricular Defects with an Adhesive-Retained Epithesis: A Clinical Report* 2016.

74. Beckers O, Coppey E, Mommaerts MY. Computer-aided design and manufacturing construction of a pilot guide for a bone-anchored epithesis to replace an absent pinna. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2020.

75. Temenoff JS, Mikos AG. Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(5):431-40.

76. Degan Di Dieco A. Preliminary steps of validation of a vertebral finite element model including a subject-specific cortical compartment: Politecnico di Torino; 2020.

77. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-43.

78. Ronde EM, Esposito M, Lin Y, van Etten-Jamaludin FS, Bulstrode N, Breugem CC. Long-term complications of microtia reconstruction: A systematic review. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2021.

79. Stephan SJ, Reinisch JF. Auricular Reconstruction Using Porous Polyethylene Implant Technique. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2018;26 1:69-85.

80. Al Kadah B, Naumann A, Schneider M, Schick B, Linxweiler M, Papaspyrou G. Auricular reconstruction with polyethylene implants or silicone prosthesis: A single institution experience. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2018;46 12:2150-6.

81. Kozusko SD, Konofaos P, Wallace RD. The History of Alloplastic Ear Reconstruction for Microtia. *Annals of Plastic Surgery*. 2020;85:89 - 92.

82. Rifkin WJ, Staffenberg DA. Discussion: Polyethylene Ear Reconstruction: A State-of-the-Art Surgical Journey. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2018.

83. Mevio E, Facca L, Mullace M, Sbrocca M, Gorini E, Artesi L, et al. Osseointegrated implants in patients with auricular defects: a case series study. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. 2015;35:186 - 90.

84. Kauke-Navarro M, Knoedler L, Knoedler S, Deniz C, Stucki L, Safi A-F. Balancing beauty and science: a review of facial implant materials in craniofacial surgery. *Frontiers in Surgery*. 2024;11.

85. Ozkaya NK, Erçöçen AR. Reconstruction of orbital floor fractures using a porous polyethylene implant: outcomes in the early, intermediate and late postoperative periods. *ENT Updates*. 2020.
86. Ali K, Trost JG, Truong TA, Harshbarger RJ. Total Ear Reconstruction Using Porous Polyethylene. *Seminars in Plastic Surgery*. 2017;31:161 - 72.
87. Kim YS. The use of medpor as a projection block for the elevation of the constructed auricle in total auricular reconstruction. *JPRAS Open*. 2017;13:53-61.
88. Oliver JD, Rodriguez D, Scott DW, Santosa KB, Hu MS. Alloplastic Auricular Reconstruction: Review of Implant Types, Adverse Events, and Aesthetic Outcomes. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2020.
89. Zhang B, Zeng X, Yang X-h. Clinical applications of ear reconstruction with Medpor. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences*. 2019;44 5:562-70.
90. Coates EE, Fisher JP. *Cartilage engineering: current status and future trends*: Springer; 2011.
91. Ghosh S, Kaplan DL. In vitro 3D human tissue models for osteochondral diseases. *Advances in tissue engineering*: World Scientific; 2008. p. 781-819.
92. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*. 2005;4(7):518-24.
93. Onderková A, M. Kalaskar D. 3D bioprinting for auricular reconstruction: A review and future perspectives. *International Journal of Bioprinting*. 2023.
94. Visscher DO, Lee H, van Zuijlen PPM, Helder MN, Atala AJ, Yoo JJ, et al. A photo-crosslinkable cartilage-derived extracellular matrix (ECM) bioink for auricular cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia*. 2020.
95. Dai M, Belaïdi JP, Fleury G, Garanger E, Rielland M, Schultze X, et al. Elastin-like Polypeptide-Based Bioink: A Promising Alternative for 3D Bioprinting. *Biomacromolecules*. 2021.
96. Heid S, Boccaccini AR. Advancing bioinks for 3D bioprinting using reactive fillers: A review. *Acta biomaterialia*. 2020.
97. Zenobi-Wong M, editor *Bioprinting cartilage grafts* 2016.
98. Rahimnejad M, Rezvaninejad R, Rezvaninejad R, França R. Biomaterials in bone and mineralized tissue engineering using 3D printing and bioprinting technologies. *Biomedical Physics & Engineering Express*. 2021;7.
99. Martínez-Moreno D, Venegas-Bustos D, Rus G, Gálvez-Martín P, Jiménez G, Marchal JA. Chondro-Inductive b-TPUe-Based Functionalized Scaffolds for Application in Cartilage Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*.

2022;11.

100. Martínez-Moreno D, Jiménez G, Chocarro-Wrona C, Carrillo E, Montañez E, Galocha-León C, et al. Pore geometry influences growth and cell adhesion of infrapatellar mesenchymal stem cells in biofabricated 3D thermoplastic scaffolds useful for cartilage tissue engineering. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2021;122:111933.
101. Stanton MM, Parrillo A, Thomas GM, McGimpsey WG, Wen Q, Bellin RM, et al. Fibroblast extracellular matrix and adhesion on microtextured polydimethylsiloxane scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2015;103 4:861-9.
102. Varshney N, Sahi AK, Vajanthri KY, Poddar S, Balavigneswaran CK, Prabhakar A, et al. Culturing melanocytes and fibroblasts within three-dimensional macroporous PDMS scaffolds: towards skin dressing material. *Cytotechnology*. 2019;71:287-303.
103. Zhang S, Shi X, Miao Z, Zhang H, Zhao X, Wang K, et al. 3D-Printed Polyurethane Tissue-Engineering Scaffold with Hierarchical Microcellular Foam Structure and Antibacterial Properties. *Advanced Engineering Materials*. 2022;24.
104. Cui Z, Lin J, Zhan C, Wu J, Shen S-C, Si J, et al. Biomimetic composite scaffolds based on surface modification of polydopamine on ultrasonication induced cellulose nanofibrils (CNF) adsorbing onto electrospun thermoplastic polyurethane (TPU) nanofibers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2020;31:561 - 77.
105. Zheng Z, Cui Z, Si J, Yu S, Wang Q, Chen W-z, et al. Modification of 3-D Porous Hydroxyapatite/Thermoplastic Polyurethane Composite Scaffolds for Reinforcing Interfacial Adhesion by Polydopamine Surface Coating. *ACS Omega*. 2019.
106. Mi HY, Salick MR, Jing X, Jacques BR, Crone WC, Peng XF, et al. Characterization of thermoplastic polyurethane/polylactic acid (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(8):4767-76.
107. Chiang C-E, Fang Y-Q, Ho C-T, Assunção M, Lin S-J, Wang Y-C, et al. Bioactive Decellularized Extracellular Matrix Derived from 3D Stem Cell Spheroids under Macromolecular Crowding Serves as a Scaffold for Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*. 2021;10.
108. Dong Y, Liang Jn, Cui Y, Xu S, Zhao N. Fabrication of novel bioactive hydroxyapatite-chitosan-silica hybrid scaffolds: Combined the sol-gel method with 3D plotting technique. *Carbohydrate polymers*. 2018;197:183-93.
109. Borciani G, Montalbano G, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Vitale-Brovarone C. Osteoblast and osteoclast activity on collagen-based 3D printed scaffolds enriched

with strontium-doped bioactive glasses and hydroxyapatite nanorods for bone tissue engineering. *Biomedical materials*. 2024.

110. Miao G, Liang L, Li W, Ma C, Pan Y-H, Zhao H-Y, et al. 3D Bioprinting of a Bioactive Composite Scaffold for Cell Delivery in Periodontal Tissue Regeneration. *Biomolecules*. 2023;13.

111. Lu H, Hoshiba T, Kawazoe N, Koda I, Song M, Chen G. Cultured cell-derived extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2011;32 36:9658-66.

112. Thunsiri K, Oonjai A, Wattanutchariya W. Characterization of Hydroxyapatite/Silk Fibroin/ Chitosan Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. *Key Engineering Materials*. 2018;775:120 - 6.

113. Sun X, Wang J, Wang Y, Huang C, Yang C, Chen M, et al. Scaffold with Orientated Microtubule Structure Containing Polylysine-Heparin Sodium Nanoparticles for the Controlled Release of TGF- β 1 in Cartilage Tissue Engineering. *ACS applied bio materials*. 2018;1 6:2030-40.

114. Bonvallet PP, Schultz MJ, Mitchell EH, Bain JL, Culpepper BK, Thomas SJ, et al. Microporous Dermal-Mimetic Electrospun Scaffolds Pre-Seeded with Fibroblasts Promote Tissue Regeneration in Full-Thickness Skin Wounds. *PLoS ONE*. 2015;10.

115. Bobrova MM, Safonova LA, Efimov AE, Lyundup AV, Mozheiko N, Agapova OI, et al. Scaffolds Based on Silk Fibroin with Decellularized Rat Liver Microparticles: Investigation of the Structure, Biological Properties and Regenerative Potential for Skin Wound Healing. *Pharmaceutics*. 2022;14.

116. Zhang F, King MW. Biodegradable Polymers as the Pivotal Player in the Design of Tissue Engineering Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*. 2020;9.

117. Jovic TH, Stewart K, Kon M, Whitaker IS. "Auricular reconstruction: A sociocultural, surgical and scientific perspective". *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2020.

118. Madjidi1 A. Historic Aspects of Ear Reconstruction. *Semin Plast Surg*. 2011;25:247 - 8.

119. Weerda H. History of auricular reconstruction. *Advances in oto-rhino-laryngology*. 2010;68:1-24.

120. Guo R, Zhang Q. Advancements in the treatment of unfavorable auricular reconstruction. *Chinese Medical Journal*. 2021;134:1549 - 51.

121. Storck K, Staudenmaier R, Buchberger M, Strenger T, Kreutzer K, von Bomhard A, et al. Total Reconstruction of the Auricle: Our Experiences on Indications and Recent Techniques. *BioMed Research International*. 2014;2014.

122. Baluch N, Nagata S, Park C, Wilkes GH, Reinisch JF, Kasrai L, et al. Auricular reconstruction for microtia: A review of available methods. *Plastic Surgery*. 2014;22:39 - 43.
123. Wei Y, Li L, Xie C, Wei Y, Huang C, Wang Y, et al. Current Status of Auricular Reconstruction Strategy Development. *The Journal of craniofacial surgery*. 2023.
124. Griffin MF, O'toole G, Sabbagh W, Szarko M, Butler PEM. Comparison of the compressive mechanical properties of auricular and costal cartilage from patients with microtia. *Journal of biomechanics*. 2020:109688.
125. Iosr J, Dr.Shiva rr, Dr.Praveen HG, editors. *Auricular Reconstruction of Congenital Microtia Using Autogenous Costal Cartilage: Report of 25 Cases* 2015.
126. Rojas YA, Sinnott CJ, Colasante C, Samas J, Reish RG. Facial Implants: Controversies and Criticism. A Comprehensive Review of the Current Literature. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2018;142:991–9.
127. Zhao X, Bichara DA, Zhou L, Kulig KM, Tseng A, Bowley CM, et al. Conditions for seeding and promoting neo-auricular cartilage formation in a fibrous collagen scaffold. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2015;43 3:382-9.
128. Hur YK, Jeong Y, Kim SH. Auricular Reconstruction in Microtia Patients: A Single Institution Experience. *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2022.
129. Ronde EM, Esposito M, Lin Y, van Etten-Jamaludin FS, Bulstrode N, Breugem CC. Long-term aesthetics, patient-reported outcomes, and auricular sensitivity after microtia reconstruction: A systematic review. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2021.
130. Jiang C, Zhao C, Chen B, Lu L, Sun Y, Yan X, et al. Auricular reconstruction using Medpor combined with different hearing rehabilitation approaches for microtia. *Acta Oto-Laryngologica*. 2021;141:572 - 8.
131. Masson-Meyers DS, Tayebi L. Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2021;15:747 - 62.
132. Griffin MF, Palgrave RG, Seifalian AM, Butler PEM, Kalaskar DM. Enhancing tissue integration and angiogenesis of a novel nanocomposite polymer using plasma surface polymerisation, an in vitro and in vivo study. *Biomaterials science*. 2016;4 1:145-58.
133. Montanheiro TLA, Schatkoski VM, de Menezes BRC, Pereira RM, Ribas RG, de Freitas AdSM, et al. Recent progress on polymer scaffolds production: Methods, main results, advantages and disadvantages. *Express Polymer Letters*. 2022.

134. Dong J, Ding H, Wang Q, Wang L. A 3D-Printed Scaffold for Repairing Bone Defects. *Polymers*. 2024;16.
135. Varma M, Kandasubramanian B, Ibrahim SM. 3D printed scaffolds for biomedical applications. *Materials Chemistry and Physics*. 2020;255:123642.
136. Shi W, He R, Liu Y, editors. 3D printing scaffolds with hydrogel materials for biomedical applications 2015.
137. Bazlov VA, Mamuladze TZ, Pavlov VV, Kirilova IA, Sadovoy M, editors. Modern materials in fabrication of scaffolds for bone defect replacement 2016.
138. Li X, Lu W, Xu X, Wang Y, Chen S-C. Advanced Optical Methods and Materials for Fabricating 3D Tissue Scaffolds. *Light: Advanced Manufacturing*. 2022.
139. Wang C, Zhou Y. Sacrificial biomaterials in 3D fabrication of scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2023.
140. Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*. 2009;8(6):457-70.
141. Wang MO, Vorwald CE, Dreher ML, Mott EJ, Cheng M-H, Cinar A, et al. Evaluating 3D printed biomaterials as scaffolds for vascularized bone tissue engineering. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla)*. 2014;27(1):138.
142. Hsieh Y-L, Gao X, Wang X, Hsiang F, Sun X, Wang W. Therapeutic Validation of Venous Pulsatile Tinnitus and Biomaterial Applications for Temporal Bone Reconstruction Surgery Using Multi-sensing Platforms and Coupled Computational Techniques. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;9.
143. Laird NZ, Chakka JL, Aciri TM, Quarterman JC, Malkawi WI, Elangovan S, et al., editors. Three-dimensional printed scaffolds for tissue engineering 2021.
144. Gang F, Ye W, Ma C, Wang W, Xiao Y, Liu CS, et al. 3D Printing of PLLA/Biomaterial Composite Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Materials*. 2022;15.
145. Karamat-Ullah N, Demidov Y, Schramm M, Grumme D, Auer J, Bohr C, et al. 3D Printing of Antibacterial, Biocompatible, and Biomimetic Hybrid Aerogel-Based Scaffolds with Hierarchical Porosities via Integrating Antibacterial Peptide-Modified Silk Fibroin with Silica Nanostructure. *ACS biomaterials science & engineering*. 2021.
146. Costa-Almeida R, Soares RA, Granja PL. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018;12:240 - 51.
147. Chakroborty D, Sarkar C, Lu K, Bhat M, Dasgupta PS, Basu S. Activation of Dopamine D1 Receptors in Dermal Fibroblasts Restores Vascular Endothelial Growth Factor-A Production by These Cells and Subsequent Angiogenesis in Diabetic Cutaneous Wound Tissues. *The American journal of pathology*. 2016;186 9:2262-70.

148. Caneparo C, Baratange C, Chabaud S, Bolduc S. Conditioned medium produced by fibroblasts cultured in low oxygen pressure allows the formation of highly structured capillary-like networks in fibrin gels. *Scientific Reports*. 2020;10.
149. Costa-Almeida R, Gomez-Lazaro M, Ramalho C, Granja PL, Soares R, Guerreiro SG. Fibroblast-endothelial partners for vascularization strategies in tissue engineering. *Tissue engineering Part A*. 2015;21 5-6:1055-65.
150. Xia P, Luo Y. Vascularization in tissue engineering: The architecture cues of pores in scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2021.
151. Arkudas A, Beier JP, Boccaccini AR, Horch RE. Characterisation of vascularisation of scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Technology*. 2015;31:180 - 7.
152. Li X, You R, Zhang Q, Yan S, Luo Z, Qu J, et al. Engineering vascularized dermal grafts by integrating a biomimetic scaffold and Wharton's jelly MSC-derived endothelial cells. *Journal of materials chemistry B*. 2021.
153. Navidbakhsh M, Sajjadi M, Hosseinzadeh S, editors. *An Experimental Study on Alginate-Fibroin Hydrogels Mechanical Capability as Scaffolds for Vascular Tissue Engineering* 2018.
154. Rnjak-Kovacina J, Gerrand Yw, Wray LS, Tan B, Joukhdar H, Kaplan DL, et al. Vascular Pedicle and Microchannels: Simple Methods Toward Effective In Vivo Vascularization of 3D Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*. 2019;8.
155. Wang J-H, Chen J, Kuo SM, Mitchell GM, Lim SY, Liu G-S. Methods for Assessing Scaffold Vascularization In Vivo. *Methods in molecular biology*. 2019;1993:217-26.
156. Sham A, Martinez EC, Beyer S, Trau DW, Raghunath M. Incorporation of a prolyl hydroxylase inhibitor into scaffolds: a strategy for stimulating vascularization. *Tissue engineering Part A*. 2015;21 5-6:1106-15.
157. Lavery LA, Davis KE, Casden S, Hamblin MR, Randomized, editors. *Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial of Gloves and Stockings Made from Infrared-Emitting Fabric (CELLIANT ®) for Transcutaneous Oxygen and Peripheral Blood Flow in Diabetic Patients with Vascular Impairment* 2022.
158. Chen D, Wang Y, Zhao H, Qiu H-x, Wang Y, Yang J, et al. Monitoring perfusion and oxygen saturation in port-wine stains during vascular targeted photodynamic therapy. *Annals of Translational Medicine*. 2021;9.
159. Fernandez MP, Berrocal AM, Goff TC, Ghassibi MP, Harper III CA, Chou E, et al. Histopathologic characterization of the expression of vascular endothelial growth factor in a case of retinopathy of prematurity treated with ranibizumab. *American journal of ophthalmology*. 2017;176:134-40.

160. Xi L. Combination of Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) With Anti-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Therapy Protects the Retina From Ischemic Damage. 2021.
161. Takahashi H, Nomura Y, Nishida J, Fujino Y, Yanagi Y, Kawashima H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration is underestimated by enzyme-linked immunosorbent assay in the presence of anti-VEGF drugs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2016;57(2):462-6.
162. Jurado Sr J, Ortega J, Iglesias P, García-Puche J, Belon J. Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) genetic polymorphisms as predictors to antiangiogenic therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(15_suppl):e14561-e.
163. Zhao M, Xie W-K, Bai Y-J, Huang L-Z, Wang B, Liang J-H, et al. Expression of total vascular endothelial growth factor and the anti-angiogenic VEGF165b isoform in the vitreous of patients with retinopathy of prematurity. *Chinese Medical Journal*. 2015;128(18):2505-9.
164. Cheung KCP, Ma L, Wang G, Coe D, Ferro R, Falasca M, et al. CD31 signals confer immune privilege to the vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112:E5815 - E24.
165. Forghani A, Koduru SV, Chen C, Leberfinger AN, Ravnic DJ, Hayes DJ. Differentiation of Adipose Tissue-Derived CD34+/CD31- Cells into Endothelial Cells In Vitro. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. 2019;6:101-10.
166. Yazdi SAM, Miri S, Moghtadaie A, Nazar E. CD31 Positivity and Prediction of Tumor Invasive Behavior in Colorectal Cancer. *International Journal of Cancer Management*. 2023.
167. Sass FA, Schmidt-Bleek K, Ellinghaus A, Filter S, Rose A, Preininger B, et al. CD31+ Cells From Peripheral Blood Facilitate Bone Regeneration in Biologically Impaired Conditions Through Combined Effects on Immunomodulation and Angiogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2017;32.
168. Ribitsch I, Baptista PM, Lange-Consiglio A, Melotti L, Patruno M, Jenner F, et al. Large Animal Models in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: To Do or Not to Do. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8.
169. Mosaddad SA, Hussain A, Tebyaniyan H. Exploring the Use of Animal Models in Craniofacial Regenerative Medicine: A Narrative Review. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2023.
170. Falcon JM, Karchner JP, Henning EA, Mauck RL, Pleshko N. Ethics of Using Animal Models as Predictors of Human Response in Tissue Engineering. *Ethics in biology, engineering & medicine*. 2019;10 1:37-49.
171. Liguori GR, Jeronimus BF, de Aquinas Liguori TT, Moreira LFP, Harmsen MC. * Ethical Issues in the Use of Animal Models for Tissue Engineering: Reflections on Legal Aspects, Moral Theory, Three Rs Strategies, and Harm-Benefit Analysis.

Tissue engineering Part C, Methods. 2017;23 12:850-62.

172. Row S, Swartz DD, Andreadis ST. Animal models of cardiovascular disease as test beds of bioengineered vascular grafts. *Drug discovery today Disease models*. 2017;24:37-45.

173. Ibañez R, Amaral RD, Simpson C, Casey S, Reis R, Marques A, et al. 3D Printed Scaffolds Incorporated with Platelet-Rich Plasma Show Enhanced Angiogenic Potential while not Inducing Fibrosis. *Advanced Functional Materials*. 2021;32.

174. Tan S-H, Ngo ZH, Leavesley DI, Liang K. Recent Advances in the Design of 3D- and Bio-printed Scaffolds for Full-Thickness Wound Healing. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2021.

175. Sun H, Lv H, Qiu F, Sun D, Gao Y, Chen N, et al. Clinical application of a 3D-printed scaffold in chronic wound treatment: a case series. *Journal of wound care*. 2018;27 5:262-71.

176. Chu B, He J-m, Wang Z, Liu L-l, Li X-l, Chen C, et al. Proangiogenic Peptide Nanofiber Hydrogel/3D-Printed Scaffold to Promote Dermal Regeneration. *Other Topics Engineering Research eJournal*. 2020.

177. Siebert L, Luna-Ceron E, García-Rivera LE, Oh J-S, Jang J-H, Rosas-Gómez DA, et al. Light-Controlled Growth Factors Release on Tetrapodal ZnO-Incorporated 3D-Printed Hydrogels for Developing Smart Wound Scaffold. *Advanced Functional Materials*. 2021;31.

178. Du W, Wang Z, Han M, Zheng Y, Tao B, Pan N, et al. Astragalus polysaccharide-containing 3D-printed scaffold for traumatized skin repair and proteomic study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2024;28.

179. Nuutila K, Samandari M, Endo Y, Zhang Y, Quint JP, Schmidt TA, et al. In vivo printing of growth factor-eluting adhesive scaffolds improves wound healing. *Bioactive Materials*. 2021;8:296 - 308.

180. Gu J, Zhang Q, Geng M, Wang W, Yang J, Khan AuR, et al. Construction of nanofibrous scaffolds with interconnected perfusable microchannel networks for engineering of vascularized bone tissue. *Bioactive Materials*. 2021;6:3254 - 68.

181. Konopnicki S, Sharaf B, Resnick CM, Patenaude A, Pogal-Sussman T, Hwang K-G, et al. Tissue-engineered bone with 3-dimensionally printed β -tricalcium phosphate and polycaprolactone scaffolds and early implantation: an in vivo pilot study in a porcine mandible model. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2015;73 5:1016.e1-e11.

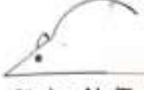
182. Liao Y-J, Chen Y-S, Lin Y-C, Yang J-R. 3D cell culture scaffold supports capillary-like network formation by endothelial cells derived from porcine induced pluripotent stem cells. *Cells, tissues, organs*. 2024.

183. Arnal-Pastor M, Martínez-Ramos C, Vallés-Lluch A, Pradas MM. Influence of scaffold morphology on co-cultures of human endothelial and adipose tissue-derived stem cells. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2016;104 6:1523-33.
184. Fahimipour F, Rasoulianboroujeni M, Dashtimoghadam E, Khoshroo K, Tahriri M, Bastami F, et al. 3D printed TCP-based scaffold incorporating VEGF-loaded PLGA microspheres for craniofacial tissue engineering. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2017;33 11:1205-16.



EKLER

EK-1. Etik Kurul Onay Kararı

 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

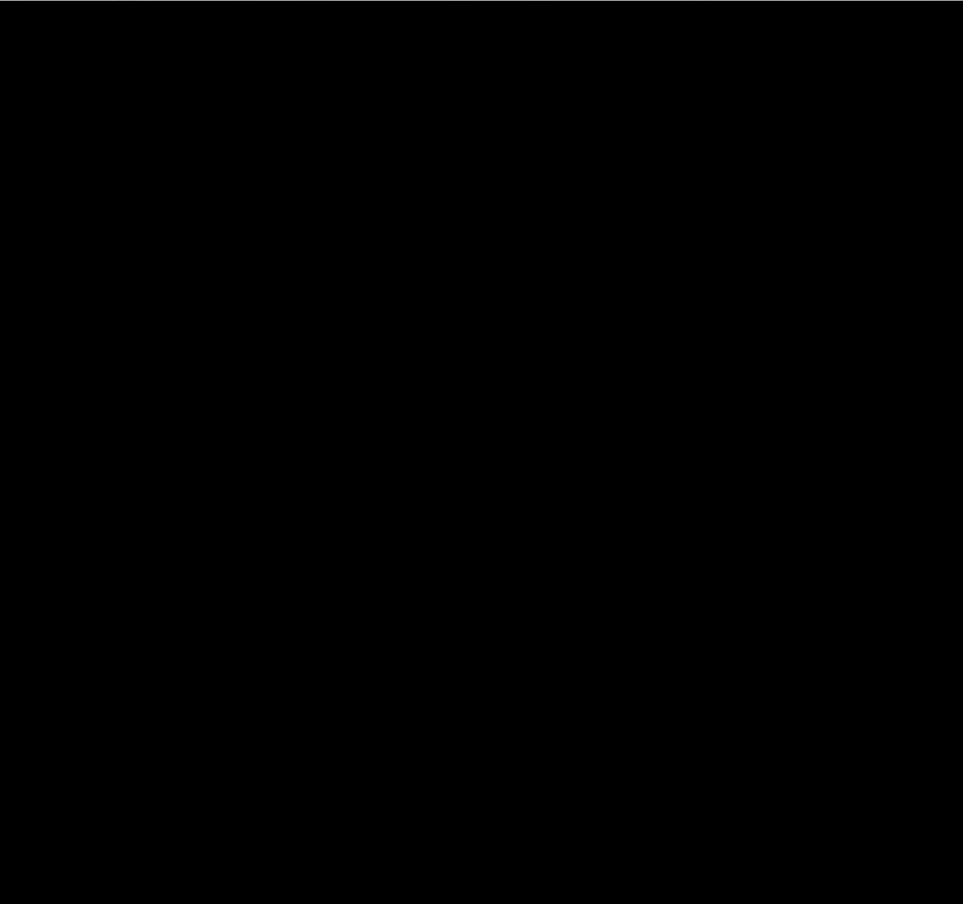
Gündem No/Toplantı No/Yıl : 04/17/2024
Toplantı Tarihi : 02 Ekim 2024

15381 İncisatlı İsmi:232 4122234

Sayın, Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
DEÜ Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

41/2024 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Üç Boyutlu Dermal Fibroblast İçeren Termoplastik Poliüretan ve Polidimetil Siloksan Doku İskelelerinin yara yatağında Oluşturduğu Mikrovasküler Değişikliklerin İncelenmesi" isimli; Safa Eren ATALMIŞ, Cenk DEMİRDÖVER, Başak BAYKARA, Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ, Aylin ZİYLAN, Alper GEYİK, Oylum ÇOLPANKAN GÜNEŞ, Selma AYDEMİR, Reşit Buğra HÜSEMOĞLU, Utkay KARABAY, Gizem AKIN'ın araştırmacı olduğu projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca görülmediğine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.



NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK-2. İntihal Programı(Turnitin) İle Belirlenmiş Benzerlik Oranı

The screenshot displays the Turnitin web interface. At the top, the document title is 'ÜÇ BOYUTLU DERMAL FİBRİBLAST İÇEREN TERMOPLASTİK POLİURETAN...'. The similarity score is 6%. The document content includes the following text:

E.C. DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHI
ANABİLİM DALI

ÜÇ BOYUTLU DERMAL FİBRİBLAST İÇEREN
TERMOPLASTİK POLİURETAN VE POLİDİMETİL SİLİKSAN
DOKU İSKELELERİNİN YARA YATAGINDA OLUŞTURULUŞU
MİKROVASKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

TIPFA UZMANLIK TEZİ
Dr. Saba Eren AYALMIŞ

On the right side, the 'Standart Rapor' (Standard Report) is visible, showing the following sources and similarity percentages:

- 1. İnternet: eckitilm.yok.gov.tr (2%)
- 2. İnternet: Aydemir, Selma. "Gestasyonel Dia..." (1%)
- 3. İnternet: Akçe, Ezgi. "Siçanlarda Hyalüronik..." (1%)
- 4. İnternet: dermatark.org.tr (1%)

Dokuz Eylül Üniversitesi

HIZLI İZLEME | GÖRÜNTÜLENİYOR: TÜM ÖDEMLER *

Yazın	Yazar	Benzerlik	Durum	İzlenim	Yazın
☐	Mehmet Yılmaz	ÜÇ BOYUTLU DERMAL FİBRİBLAST İÇEREN TERM...	0%	■	26/05/2020