

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ÜÇ-BOYUTLU BİYOBASIM İÇİN YENİ KOMPOZİT BİYOMÜREKKEP
GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Murat Taner VURAT

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ÜÇ-BOYUTLU BİYOBASIM İÇİN YENİ KOMPOZİT BİYOMÜREKKEP GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Murat Taner VURAT

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Bu tez çalışmasında, üç-boyutlu biyobasım (3BB) uygulamalarına yönelik olarak iki farklı biyomürekkebin hazırlanması ve bu biyomürekkepler ile hücrelerin beraber kullanımıyla iki katlı periodontal/osteojenik mikro-doku arayüz modelinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, 3BB uygulamalarında kullanılmak üzere jelatin metakrilat (Jel-MA) temelli biyomürekkep sentezlendi; fiziksel, kimyasal, reolojik ve mekanik karakterizasyonları gerçekleştirildi. Ardından, çalışmada kullanılacak ikinci biyomürekkebin kompozit formuna dahil edilmek üzere hidroksiapatit (HAP) kaplı manyetik nanoparçacıklar (MNP) sentezlendi ve oluşturulan Jel-MA+HAP/MNP kompozit biyomürekkebin de kapsamlı karakterizasyonları tamamlandı. Çalışmanın ikinci aşamasında, biyomürekkeplerin üç-boyutlu biyoyazıcıdaki basım parametreleri ilk önce hücresiz olarak ve ardından hücreli olarak optimize edildi. Hücreli basımlarda kullanılmak üzere insan alveolar osteoblast (iOB) hücreleri ve insan periodontal ligament fibroblast (iPDLF) hücreleri kültürde çoğaltıldı. Mikro-doku arayüz modelinde yer alacak olan alveolar kemik doku katmanını temsil etmek üzere iAOB hücreleri Jel-MA+HAP/MNP kompozit biyomürekkebi aracılığıyla, periodontal doku katmanını temsil etmek üzere iPDLF hücreleri Jel-MA biyomürekkebi aracılığıyla art arda basıldılar. Çalışmanın üçüncü bölümünde, tasarlanan mikroakışkan çip sistemine çift katlı perio/osteo mikro-doku taslakları entegre edildi ve bundan sonra çipte dinamik kültür ve karakterizasyon çalışmaları yürütüldü. Mikroakışkan çip sisteminde dinamik kültürü sürdürülen perio/osteo mikro-dokuda bulunan hücrelerin canlılık ve çoğalma durumları belirlenen zaman noktalarında belirlendi. Ayrıca, çift katmanlı mikro-dokudaki hücre ve hücre dışı matriks dağılımları histokimyasal olarak incelendi. Çalışmada elde edilen bulgular, geliştirilen 3BB mikroakışkan çip-üstü mikro-doku yapısının gelecekte ilaç geliştirme veya hastalık araştırmalarında perio/osteo arayüz modeli olarak kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır.

Mart 2021, 137 sayfa

Anahtar Kelimeler: Üç-boyutlu biyobasım, Biyomürekkepler, Periodontal doku, Biyoyazıcı, Jelatin, Hidroksiapatit, Manyetik nanoparçacıklar, Mikroakışkan çip.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NEW COMPOSITE BIOINKS FOR THREE-DIMENSIONAL BIOPRINTING

Murat Taner VURAT

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

The aim of this thesis study was to generate two different types of bioinks utilizable for three-dimensional bioprinting (3DP) and to develop a two-layer periodontal/osteoblastic micro-tissue interface model by use of them. In the first stage of the study, gelatin methacrylate (Gel-MA) based bioink was synthesized for use in 3DP; then its physical, chemical, rheological and mechanical characterizations were performed. Later, hydroxyapatite (HAp) coated magnetic nanoparticles (MNP) were synthesized which were incorporated into the composite form of the second bioink. The comprehensive characterization of the Gel-MA+HAp/MNP composite bioink was also realized. In the second stage of the study, the printing parameters of the bioinks were optimized first for acellular and then for cellular bioprinting. Human alveolar osteoblast (hOB) cells and human periodontal ligament fibroblast (hPDLF) cells were expanded in culture for use in cellular bioprintings. In respective order, hOB cells were bioprinted together with the Gel-MA+HAp/MNP composite bioink representing the alveolar bone layer in the micro-tissue interface model, hPDLF cells were bioprinted together with the Gel-MA bioink representing the periodontal ligament layer. In the third part of the study, the two-layer perio/osteo micro-tissue constructs were integrated into the designed microfluidic chip system, and thereafter on-chip dynamic culture and characterization studies were conducted. At pre-determined time points, the viability and proliferation status of cells contained in the perio/osteo micro-tissue under dynamic culture inside the microfluidic chip system were analyzed. Additionally, the cellular and extracellular matrix distributions of the two-layer micro-tissue were evaluated by histochemistry. The findings of this study support the notion that, the developed 3DP microfluidic on-chip micro-tissue construct has the potential for use in prospective drug development and disease research as a perio/osteo interface model.

March 2021, 137 pages

Key Words: Three-dimensional bioprinting, Bioinks, Periodontal tissue, Bioprinter, Gelatin, Hydroxyapatite, Magnetic nanoparticles, Microfluidic chip.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımın her aşamasında sonsuz bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen ve bana benzersiz çalışma ortamı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD) teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarımın tamamına çok değerli katkılarda bulunan hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Eser ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü) teşekkür ederim.

Her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen kıymetli dostum, ağabeyim Dr. Mahmut PARMAKSIZ'a teşekkür ederim.

Doktora süresince yanımda olduklarını hissettiren çalışma arkadaşlarıma ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması kapsamında kullanılan hidroksiapatit kaplı manyetik nanoparçacıkların sentezindeki emeklerinden ötürü Özge LALEGÜL ÜLKER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm bu süreçte maddi ve manevi desteklerini asla esirgemeyen fedakar Aileme ve özellikle sevgili eşim Münire ALTINOK VURAT'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 1001 kapsamında 117M281 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Murat Taner VURAT

Ankara, Mart 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Doku Mühendisliği ve Yenileyici Tıp	5
2.2 Doku Modelleme / İskele Üretim Teknikleri	10
2.2.1 Çözücü döküm.....	10
2.2.2 Partikül uzaklaştırma	10
2.2.3 Gaz köpüklendirme.....	11
2.2.4 Faz ayrımı	12
2.2.5 Elektroegirme	13
2.2.6 Dondurarak kurutma	14
2.2.7 Eriyik kalıplama.....	15
2.2.8 Membran laminasyon	15
2.3 Üç-Boyutlu Biyobasım Teknolojisi	18
2.4 Üç-Boyutlu Biyoyazıcı Çeşitleri	19
2.4.1 İnkjet temelli.....	20
2.4.2 Mikroektrüzyon temelli	21
2.4.3 Lazer temelli	22
2.5 Biomürekkeplerin Sahip Olması Gereken Özellikler	24
2.6 Üç-Boyutlu Biyobasımda Kullanılan Biomürekkepler	26
2.6.1 Kollajen temelli biyomürekkepler	27
2.6.2 Jelatin temelli biyomürekkepler	28
2.6.3 Alginat temelli biyomürekkepler	30
2.6.4 Hyalüronik asit temelli biyomürekkepler	30

2.6.5 Deselülerize HDM temelli biyomürekkepler	32
2.7 Periodonsiyum Yapısı	35
2.8 Periodontal Hastalıklar	37
2.9 Yenileyici Tıp Temelli Periodontit Tedavi Seçenekleri	39
2.10 İleri Tedavilerin Geliştirilmesi.....	39
2.11 Mikroakışkan Çip Teknolojisine Dayalı Hastalık Modelleri	41
2.12 Kaynak Özetleri	43
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	54
3.1 Materyal	54
3.2 Yöntem	56
3.2.1 Jel-MA sentezi	58
3.2.2 Kompozit Biyomürekkebin hazırlanması	59
3.2.3 Çapraz bağlanma optimizasyon çalışmaları.....	60
3.2.4 Jel-MA temelli 3B kompozit yapıların karakterizasyonları	61
3.2.4.1 Reoloji analizleri	61
3.2.4.2 FTIR analizleri	62
3.2.4.3 SEM analizleri	62
3.2.4.4 Mekanik basma testleri.....	62
3.2.4.5 Termal gravimetrik analizler (TGA)	63
3.2.4.6 Su tutma (şişme) testleri	63
3.2.5 İnsan periodontal ligament fibroblast hücrelerinin kültürü.....	64
3.2.6 İnsan osteoblast hücrelerinin kültürü	65
3.2.7 Kültürü yapılan hücrelerin karakterizasyonu	66
3.2.8 Mikroakışkan Çip Sisteminin Tasarımı.....	67
3.2.9 3B perio/osteo mikro-doku taslaklarının biyobasımı ve mikroakışkan temelli çip içerisinde dinamik kültürü	69
3.2.10 Perio/osteo mikro-doku taslaklarının karakterizasyonu.....	73
3.2.10.1 Spektrofotometrik çalışmalar (Alamar Mavisi).....	73
3.2.10.2 Konfokal lazer mikroskopi analizleri (Canlı/Ölü Testi).....	73
3.2.10.3 SEM analizleri	74
3.2.10.4 Histokimyasal analizler	74
3.2.10.5 İmmünfloresan analizler	76
3.3 İstatistiksel Analiz	77
4. BULGULAR.....	78

4.1 Jel-MA Temelli Kompozit 3B Yapıların Karakterizasyonu	78
4.1.1 Reoloji bulguları.....	78
4.1.2 FTIR bulguları	82
4.1.3 SEM bulguları	85
4.1.4 Mekanik basma testi bulguları	86
4.1.5 TGA bulguları	87
4.1.6 Su tutma testi bulguları	90
4.2 Çapraz Bağlanma Optimizasyon Bulguları.....	91
4.3 Hücre Kültürü Takibine Ait Karakterizasyon Bulguları	92
4.3.1 Faz-kontrast mikroskopi bulguları	92
4.3.2 Hücrelerin proliferasyon kapasitesi bulguları	93
4.4 Perio/Osteo mikro-doku taslaklarının karakterizasyonuna ait bulgular	96
4.4.1 Alamar mavisi bulguları.....	96
4.4.2 Mikroskopi analizlerine ait bulgular.....	97
4.4.2.1 Faz-kontrast mikroskobu bulguları	97
4.4.2.2 SEM bulguları	98
4.4.3 Konfokal lazer mikroskopi (Live&Dead) analizine ait bulgular	100
4.4.4 Histokimyasal analizlere ait bulgular	103
4.4.4.1 Hematoksilin ve Eosin (H&E) boyaması bulguları.....	103
4.4.4.2 Periyodik Asit - Schiff (PAS) boyaması bulguları.....	105
4.4.5 İmmünfloresan analizlere ait bulgular	106
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	107
KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ.....	133

SİMGELER DİZİNİ

CO ₂	Karbondioksit
G	Gauge
G'	Depo Modülü
G''	Kayıp Modülü
Hz	Hertz
kDA	Kilodalton
kg	Kilogram
kPa	kilopascal
mg	Miligram
mm	Milimetre
nm	Nanometre
nN	Nano newton
°C	Santigrat derece
Pa	Pascal
V	Volt
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

3B	Üç-Boyutlu
3BB	Üç-Boyutlu Biyobasım
ALP	Alkalın Fosfataz
BSA	Sığır Serum Albumini
dHDM	Desellülerize Hücre Dışı Matriks
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EKH	Embriyonik Kök Hücre
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	ABD Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration)
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared)
H&E	Hemotoksilin - Eozin

HA	Hyalüronik Asit
HAp	Hidroksiapatit
HDM	Hücre Dışı Matriks
Irgacure 2959	2-Hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiyofenon
Jel-MA	Jelatin Metakrilat
Kİ-MKH	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre
LAP	Lityum fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat
LTB	Lazer Temelli Biyoyazıcı
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MNP	Manyetik Nanoparçacık
M _w	Molekül Kütlesi
OB	Osteoblast
OC	Osteokalsin
PAS	Periyodik asit - Schiff
PBS	Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi
PCL	Poli (ε-kaprolakton)
PDLF	Periodontal Ligament Fibroblast
PDMS	Poli (dimetilsiloksan)
PE	Poli (etilen)
PEG	Poli (etilen glikol)
PEGDMA	Poli (etilen glikol)dimetakrilat
PLA	Poli (laktik asit)
PGA	Poli (glikolik asit)
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PTFE	Poli (tetrafloroetilen)
PVA	Poli (vinil alkol)
PVP	Poli (vinil pirolidon)
RGD	Arginin-Glisin-Aspartat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
sGAG	Sülfatlanmış Glikozaminoglikan
TGA	Termal Gravimetrik Analiz
UV	Mor Ötesi
β-TCP	Beta-trikalsiyum Fosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	3B basım cihazının temel bileşenleri	2
Şekil 1.2	3B baskı teknolojisinin kullanım alanları ve bu alanların toplam kullanım içerisindeki oranları.....	3
Şekil 2.1	Doku mühendisliği basamakları şematik gösterimi	6
Şekil 2.2	Doku mühendisliği için iskele materyalleri ve sınıflandırılması	8
Şekil 2.3	Partikül uzaklaştırma yönteminin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.4	Elektroeğirme sistemi bileşenleri	14
Şekil 2.5	3B Biyoyazıcı çeşitleri A) İnkjet temelli 3B-biyoyazıcı sistemi, B) mikro-ekstrüzyon temelli 3B-biyoyazıcı sistemi, C) Lazer destekli 3B-biyoyazıcı sistemi.....	20
Şekil 2.6	Doğal, sentetik ve ticari biyomürekkepler	27
Şekil 2.7	Peridonsiyumun yapısı (Carranza, 2003).....	35
Şekil 2.8	Çalışmada kullanılan 3B biyobasım sistemi ve oluşturulan iskelenin makroskobik ve mikroskobik görüntüleri	44
Şekil 2.9	Çalışmada kullanılan perfüzyon sistemi ve histokimyasal analiz bulguları	45
Şekil 2.10	Çalışmada gerçekleştirilen kalp ve karaciğer doku yapılarının üretiminin şematik gösterimi	46
Şekil 2.11	Elektroeğirme ve inkjet temelli 3B biyoyazıcıdan oluşan hibrit sistemin şematik gösterimi	47
Şekil 2.12	Çalışmada üretilen 3B kıkırdak modelinin şematik gösterimi ve SEM görüntüleri	48
Şekil 2.13	Çalışmada elde edilen 3B deri doku modelinin şematik gösterimi.....	49
Şekil 2.14	3B basımı yapılan deri modelinin histokimyasal boyama görüntüleri.	50
Şekil 2.15	Çalışma kapsamında 3BB prosesi ile üretilen kemik doku iskelelerinin şematik ve makroskobik gösterimi.....	51
Şekil 2.16	Çalışmada alginat kullanılarak 3BB işlemi ile üretilen kalp doku modeli.....	52

Şekil 2.17	Geliştirilen model üzerinde yapılan mekanik, cerrahi iplik tutma testlerine ait görüntüler.....	52
Şekil 2.18	Çalışmada kullanılan mikroakışkan çip ve oluşturulan modelin görüntüleri	53
Şekil 3.1	Tez çalışması kapsamında yapılan sentez, optimizasyon ve karakterizasyon aşamaları	57
Şekil 3.2	Jel-MA sentezi ve fotobaşlatıcı (Irgacure 2959) ile çapraz bağlanması.....	58
Şekil 3.3	Jel-MA temelli hibrit biyomürekkep hazırlanmasının şematik gösterimi.....	61
Şekil 3.4	Mikroakışkan temelli çip sistemi ile birlikte kullanılan sabitleme platformu ve bağlantı aparatları	67
Şekil 3.5	Tez çalışması kapsamında kullanılan mikroakışkan temelli çiplerin şematik gösterimi	68
Şekil 3.6	Tez kapsamında kullanılan mikroakışkan çiplere ait fotoğraflar	69
Şekil 3.7	Üç-boyutlu biyoyazıcı sistemi ve katlı hibrit mikro-doku taslaklarının biyobasım sürecine ait fotoğraflar	71
Şekil 3.8	3B perio/osteo mikro-doku taslaklarının mikroakışkan çip içerisindeki kültürüne ait fotoğraflar	72
Şekil 3.9	Alamar Blue reaktifinin (resazurin sodyum tuzu) canlı hücredeki indirgenmesi	73
Şekil 4.1	%10 oranında hazırlanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları	79
Şekil 4.2	%12,5 oranında hazırlanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları	79
Şekil 4.3	%15 oranında hazırlanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları	80
Şekil 4.4	%18 oranında hazırlanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları	80
Şekil 4.5	%0,05 oranında HAp/MNP ile katkılanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları	81
Şekil 4.6	%0,1 oranında HAp/MNP ile katkılanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları	81

Şekil 4.7	%0,5 oranında HAp/MNP ile katkılanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları	82
Şekil 4.8	%12,5 konsantrasyonunda hazırlanan Jel-MA biyomürekkebine ait FTIR spektrumu	83
Şekil 4.9	Jel-MA + %0,05 HAp/MNP kompozit biyomürekkebine ait FTIR spektrumu	84
Şekil 4.10	Jel-MA + %0,1 HAp/MNP kompozit biyomürekkebine ait FTIR spektrumu	84
Şekil 4.11	%12,5 Jel-MA (A,B,C) ve HAp/MNP içeren Jel-MA (D,E,F) ile üç-boyutlu basımı yapılan katlı yapıların elektron mikroskobu görüntüleri	85
Şekil 4.12	Jel-MA (kırmızı) ve Jel-MA+HAp/MNP (gri) biyomürekkepleri ile basılmış katlı yapıların mekanik basma testi (ortalama) sonuçları	86
Şekil 4.13	%12,5 Jel-MA biyomürekkebine ait TGA (% kütle kaybı) sonuçları..	88
Şekil 4.14	%0,05 HAp/MNP ile katkılanmış %12,5 Jel-MA biyomürekkebine ait TGA (% kütle kaybı) sonuçları	89
Şekil 4.15	%0,1 HAp/MNP ile katkılanmış %12,5 Jel-MA biyomürekkebine ait TGA (% kütle kaybı) sonuçları	89
Şekil 4.16	%0,1, %0,25 ve %0,5 fotobaşlatıcı içeren Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkepleri ile oluşturulan yapıların %Su tutma (şişme) sonuçları	90
Şekil 4.17	İnsan alveolar OB hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu görüntüleri .	92
Şekil 4.18	İnsan PDLF hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu görüntüleri	92
Şekil 4.19	Farklı yoğunluklarda ekimi yapılan insan PDLF hücrelerinin 24 saat içerisinde elde edilen proliferasyon eğrileri	93
Şekil 4.20	Farklı yoğunluklarda ekimi yapılan insan alveolar OB hücrelerinin 24 saat içerisinde elde edilen proliferasyon eğrileri	94
Şekil 4.21	İnsan periodontal ligament fibroblast ve osteoblast hücrelerinin Alamar mavisi test sonuçları	95
Şekil 4.22	Hücreli basımı gerçekleştirilen perio/osteo mikro-doku taslaklarının Alamar mavisi test sonuçları	96
Şekil 4.23	3BB ile elde edilen yapıların faz-kontrast görüntüleri. (A,B) Hücresiz katlı yapı, (C,D) OB hücreleri ile basılmış katlı yapı, (E,F) PDLF hücreleri ile basılmış katlı yapı	98

Şekil 4.24	Mikroakışkan çip içerisinde kültürü sürdürülen katlı hibrit mikro-doku taslaklarının elektron mikroskobu görüntüleri	99
Şekil 4.25	Üç-boyutlu biyobasımı gerçekleştirilen ve mikroçip içerisinde kültüre alınan örneklerin 12. saat (A), 3. gün (B) ve 7. gün (C) zaman noktalarında alınmış konfokal mikroskop görüntüleri.....	101
Şekil 4.26	3B mikro-dokunun mikroakışkan çip içerisinde kültüre alınmadan önce çekilen konfokal mikroskop görüntüsü.....	102
Şekil 4.27	Mikroakışkan temelli çip sisteminde kültürü sürdürülen hibrit mikro-dokunun 3. günde alınan ışık mikrografları (H&E boyaması).....	104
Şekil 4.28	Mikroakışkan temelli çip sisteminde kültürü sürdürülen hibrit mikro-dokunun 3. günde alınan ışık mikrografları (PAS boyaması).....	105
Şekil 4.29	OB ve PDLF tohumlanmış mikroçip sistemi içerisinde kültürü sürdürülen katlı mikro-doku taslaklarının kültürün farklı zaman noktalarına ait STRO1 ve osteokalsin immünfloresan mikroskop görüntüleri (A. 1.gün, B. 3.gün, C. 7.gün, D. 14. gün)	106

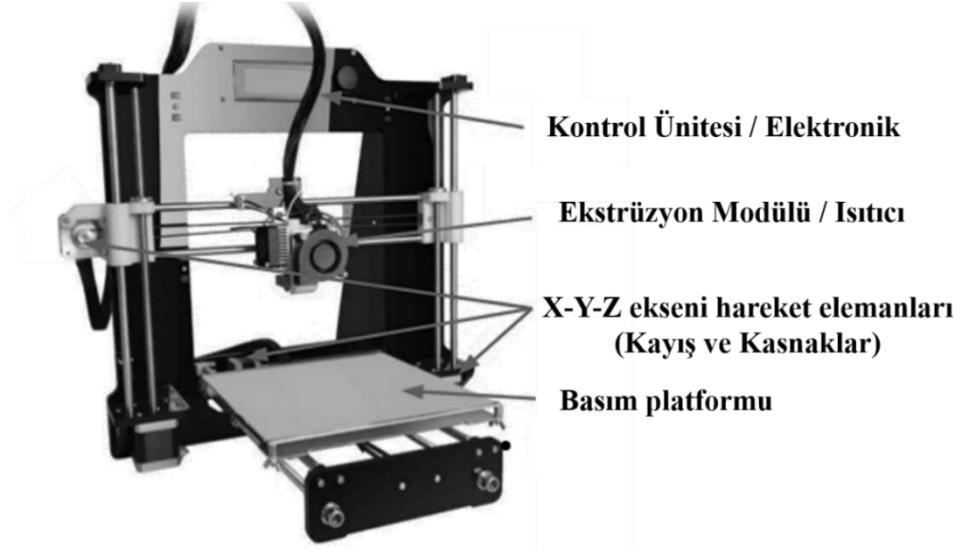
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Geleneksel iskele üretim tekniklerinin sahip oldukları avantaj ve dezavantajları	17
Çizelge 2.2 3B biyoyazıcı teknolojilerinin karşılaştırılması	23
Çizelge 2.3 Ticari 3B biyoyazıcı modelleri ve üreticileri	24
Çizelge 2.4 Farklı biyomürekkeplerin kullanıldığı 3BB işlemi ile gerçekleştirilen çalışmalar	33
Çizelge 3.1 Üç-boyutlu biyobasım parametreleri	70
Çizelge 4.1 Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkepleri ile basımı yapılan 3B yapıların basma testi maksimum kuvvet ve maksimum esneme verileri	87
Çizelge 4.2 %0,25, %0,5 ve %1 Irgacure içeren biyomürekkeplerin farklı maruziyet sürelerindeki çapraz bağlanma skorlamaları	91
Çizelge 4.3 %0,5 Irgacure içeren biyomürekkeplerin farklı mesafe ve maruziyet sürelerindeki çapraz bağlanma skorlamaları	91
Çizelge 4.4 Farklı yoğunluklarda ekimi yapılan PDLF ve alveolar OB hücrelerinin yaklaşık maksimum indeksleri	94

1. GİRİŞ

Günümüzde üç-boyutlu (3B) nesnelerin fabrikasyonunda iki temel yöntem ve bu yöntemlerin farklı versiyonları kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden ilki eklemeli üretim, diğeri ise malzeme eksiltmedir. Eklemeli üretim belirlenen katmanları sırası ile oluşturarak üç-boyutlu nesnelerin meydana getirilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemlerin bilgisayar temelli olan versiyonları keşfedildiği günden beri oldukça fazla ilgi görmüş ve birçok farklı alana entegre edilmeleri sağlanmıştır. 3B basım teknolojisi eklemeli üretim tekniklerinden birisidir ve basım işini gerçekleştiren bu cihazlara üç-boyutlu yazıcı denmektedir. Son yıllarda bu cihazlar her alanda ilgi görmüş ve ciddi gelişmelere uğramışlardır. 3B yazıcıların bu derece ilgi görmesinin asıl sebepleri; oldukça hızlı üretim sağlaması, düşük maliyetli olması ve kullanım kolaylığına sahip olmasıdır. Bu sistemler ile karmaşık yapılar 3B çizim yazılımları yardımı ile kolaylıkla üretilmektedir.

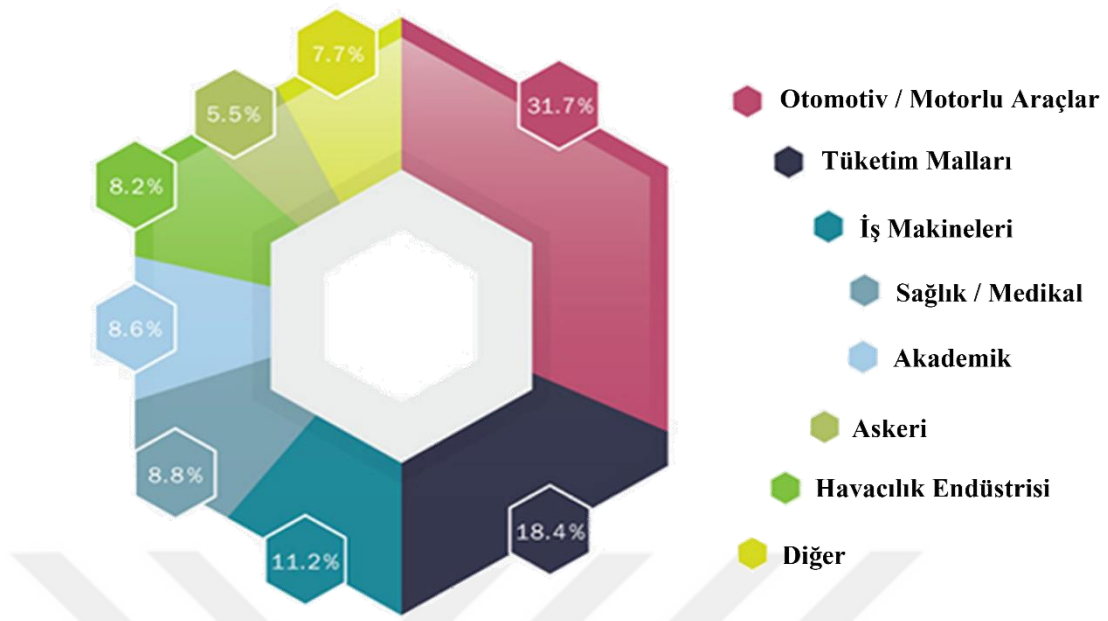
Hızlı prototipleme olarak da adlandırılan 3B basım tekniği ilk olarak Charles Hull tarafından 1980’li yıllarda geliştirilmiştir ve bu teknik ile stereolitografi adı altında patent alınmıştır. Bunun akabinde teknikte bazı geliştirmeler yapılmış ve ilk ticari ürün olan “Stereolithography Apparatus SLA-250” piyasaya sürülmüştür. Bu tarihten itibaren 3B üretim yapabilecek birçok farklı marka piyasada var olmaya başlamıştır ve metal, seramik, polimer gibi birçok farklı malzemeden 3B nesneler üretilbilir bir duruma gelinmiştir. Günümüzde birçok firma tarafından üretilip piyasaya sürülmüş ve genellikle polimer yapıdaki materyallerin basımında kullanılan tipik bir 3B basım cihazının temel bileşenleri **şekil 1.1**’de belirtilmiştir.



Şekil 1.1 3B basım cihazının temel bileşenleri.

Uzun yıllar önceki icadından bu yana, 3B basım teknolojisi hem endüstriyel hem de ticari dünyada önemli bir etkiyle hızlı bir şekilde ilerlemiştir. Stereolitografi, seçici lazer sinterleme ve eriyik biriktirme modellemesi, başlangıçta endüstriyel prototipleme için kullanılan 3B baskının ilk başarılı yöntemleri arasındaydı. 3B baskı teknolojisi kısa süre sonra çeşitli alanlarda kullanılmak üzere, büyük ölçekli üretim, son derece karmaşık parçaların mühendisliği ve hatta kişisel kullanımlar için dahi geliştirilmiştir.

3B basım sistemleri akla gelebilecek her türlü alanda kullanımı mevcut olan bir teknolojidir. Otomotiv, havacılık, gıda, giyim, savunma, mücevher, robot, oyuncak, medikal gibi birçok endüstri/sanayi alanda halen kullanımı yaygın olarak devam eden bu sistem ile bazen prototipleme bazen de direkt üretim yapılmaktadır. Bu teknolojinin genel kullanım alanları ve kullanım oranları **şekil 1.2**'de verilmektedir. Otomotiv ve havacılık sanayisinde üretim öncesi prototiplemelerin yapıldığı bu teknoloji ile birçok aparatın üretimi de gerçekleştirilmektedir. Bazı özel kuruluş ve hükümetlerin savunma sanayilerinde birçok silah prototipi yine bu teknik ile yıllardır yapılmaktadır. Özetle, 3B baskı teknolojileri, 1980'lerde ortaya çıkmasından bu yana bilim ve mühendislik topluluklarında hızla dikkat çekmiştir.



Şekil 1.2 3B baskı teknolojisinin kullanım alanları ve bu alanların toplam kullanım içerisindeki oranları

Tüm bu alanlarda kullanımı yaygınlaşan ve ciddi önem teşkil eden bu sistemler doku mühendisliği, yenileyici tıp, biyogölgeleme alanlarında ve bu alanlardaki araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu 3B basım sisteminin altyapısı kullanılarak biyomalzemeler, hücreler, büyüme faktörleri ve diğer makromolekülleri içeren kompleks yapılar oluşturmak için 3B biyobasım yaklaşımı geliştirilmiş ve bu teknolojik cihazlara 3B biyoyazıcı adı verilmiştir.

Doku mühendisliği ve yenileyici tıp alanında, klinik ölçülerde yapısal bütünlüğü olan vasküler, hücre içeren kompleks yapıların 3B üretimi ciddi bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu zorlukların önüne geçmek açısından 3B biyobasım tekniği önemli bir imkan oluşturmaktadır ancak yine de bazı dezavantajları mevcuttur. Klasik doku mühendisliği, yaklaşık 20 yıl önce Langer ve Vacanti tarafından katı iskelelere izole hücrelerin ekimi olarak tanımlanmış ve günümüzde halen ileri teknoloji olarak kabul görmektedir. Bu hücre temelli tedavi yaklaşımının temeli, izole edilmiş hücrelerin ex-vivo şartlarda üç-boyutlu hücre dışı matriks molekülleriyle benzerlik taşıyan, tasarlanmış yapı iskeleleri üzerine ekilmesi ve takiben özel şartlar altında yeniden farklılaştırılarak çoğaltılması ve oluşan dokuya/organa benzer yeni hibrit yapıların hastaya nakledilmesine

dayanmaktadır. Bu doku mühendisliği yaklaşımında 3B biyoyazıcıların son zamanlarda ciddi ölçülerde kullanımları ortaya çıkmıştır ve geleneksel doku mühendisliği iskele üretim tekniklerine kıyasla birçok avantajı bulunmaktadır.

Genel perspektifden bakıldığında doku ve organ üretimine kadar giden doku mühendisliği yaklaşımları için 3B biyobasım teknolojisi halen başlangıç seviyesindedir. Ancak doku mühendisliği ve yenileyici tıp alanında çalışan araştırmacılar ile makine/malzeme mühendisleri arasındaki disiplinlerarası çalışmalar ile daha önemli noktalara geleceği de aşıkardır.

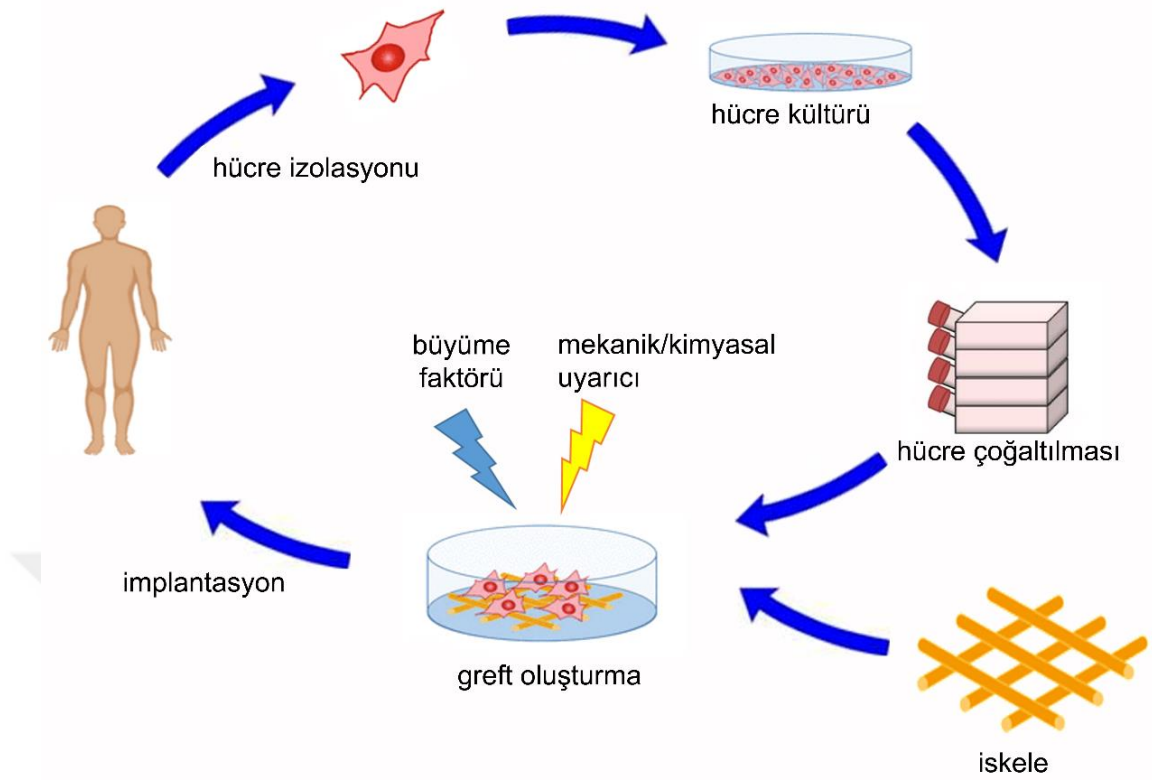


2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Doku Mühendisliği ve Yenileyici Tıp

Doku veya bir organ kaybı, ya da fonksiyon göremez hale gelmesi insan sağlığı açısından oldukça yıkıcı ve maliyetli bir sorundur. Dünya genelinde hastalıklar, kaza ve travmalar sebebiyle organ transplantasyonuna olan ihtiyaç her geçen gün artar iken, donör sayısında maalesef aynı ölçüde artış görülememekte hatta bu sayı sürekli olarak azalmaktadır. Dünya genelinde yaklaşık birkaç dakika içerisinde organ transplantasyon listesine yeni bir isim eklenmektedir. Donör sayısındaki bu yetersizlik sebebiyle binlerce insan organ transplantasyonu sırası beklerken yaşamını yitirmektedir.

Doku mühendisliği tanım olarak hastalıklı, hasar görmüş ya da kaybedilmiş dokuların onarımı, değiştirilmesi veya fonksiyonlarının geri kazandırılması amacıyla çözümler üreten ve bu çözümleri üretir iken geleneksel tedavi yöntemlerinin sınırlamalarından etkilenmeyen disiplinlerarası bir bilim dalıdır (Langer ve Vacanti 1993, Elçin 2003). Doku mühendisliğinde temelde hedeflenen doku ve/veya organa spesifik geliştirilen iskele yapısı, iskelelere tohumlanan hücreler ve bunların yanında yardımcı moleküller kullanılır. Ayrıca bu üç bileşene doku mühendisliği üçlüsü denilmektedir (O'Brien 2011). Doku mühendisliği konseptine göre hasarlı organ veya dokuların başarılı bir şekilde yenilenmesini sağlamak için, hücre büyümesi için mekanik bir destek görevi gören iskeleler, spesifik hücre tiplerine farklılaştırılabilen progenitör hücreler ve hücresel aktiviteleri modüle edebilen çeşitli büyüme faktörleri dahil olmak üzere birçok kritik unsur dikkate alınmalıdır (Shin vd. 2003). **Şekil 2.1**'de doku mühendisliği uygulamalarının temel basamakları ve şematik gösterimi yer almaktadır.



Şekil 2.1 Doku mühendisliği basamakları şematik gösterimi

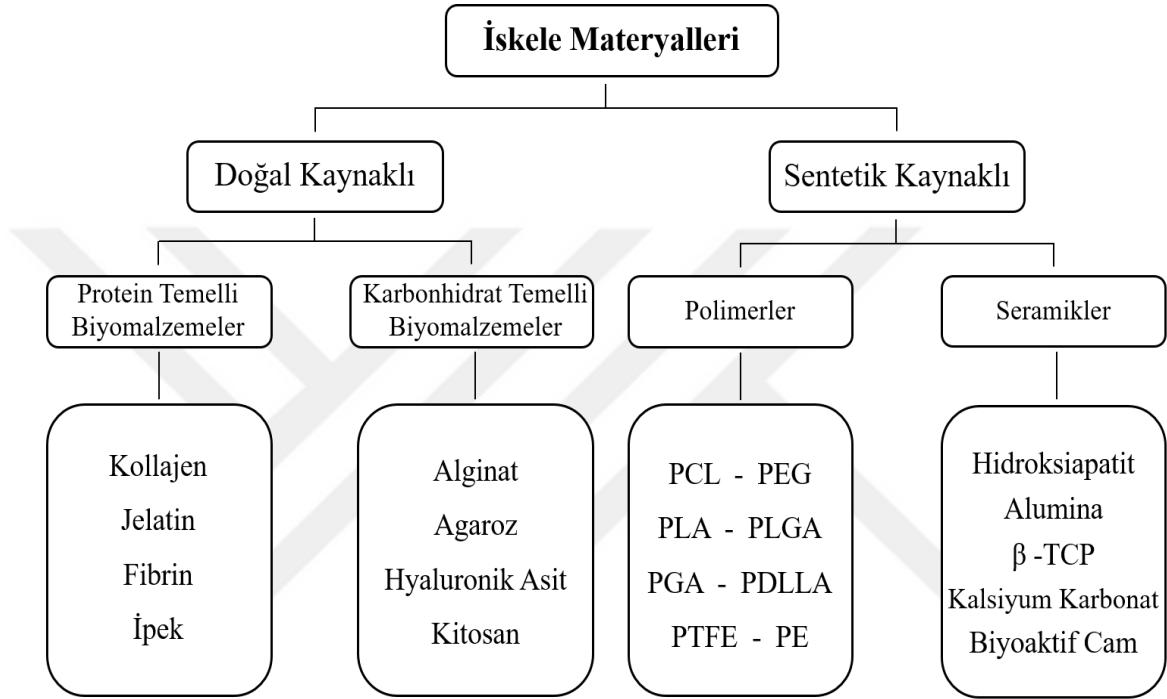
Hücre dışı matriks (HDM), dokuya şeklini vermek ve uygun forma getirmek için adeta bir çerçeve gibi işlev gören bir ağ oluşturmak için hücreler tarafından salgılanan dokuya özgü moleküllerden oluşur. Ayrıca HDM hücrelerin tutunabileceği ve hareket edebileceği organize bir ortam sağlamaktadır. Tüm bu fonksiyonlarının yanında HDM ile hücre etkileşimleri hücrelerin olgunlaşmasına, farklılaşmasına, hayatta kalmasına, doku organizasyonuna ve matriks modellenmesinin düzenlenmesine aracılık eder (Kuo ve Tuan 2003).

Doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerin en büyük rolü hücrelerin tutunması, olgunlaşması ve çoğalması için üç-boyutlu bir çevre oluşturmak, ayrıca hedef dokuların gelişmesi için yapay/taklit bir HDM olarak görev yapmaktır (Qu vd. 2019). Canlı organizmalarda HDM oldukça kompleks ve dinamik bir ortamdır, bu sebepten geliştirilen ve kullanılan iskelelerin en azından belli gereksinimleri karşılamaları gerekmektedir. Bir doku mühendisliği iskelesinde aranan en önemli özellikler şu şekilde sıralanabilir;

- Biyouyumluluk: İmplantasyondan sonra, iskele veya doku mühendisliği yaklaşımları ile üretilmiş yapılar, iyileşmeyi azaltabilecek veya vücut tarafından reddine neden olabilecek kadar şiddetli bir enflamatuvar tepkiye neden olmamalı, yalnızca ihmal edilebilir bir bağışıklık reaksiyonu ortaya çıkarmalıdır. Bununla birlikte konak dokuya herhangi bir lokal ve sistematik toksik etki yaratmamalıdır (Bose vd. 2012).
- Biyobozunurluk: Doku mühendisliğinin amacı, vücudun kendi hücrelerinin zamanla implante edilmiş iskelenin veya doku mühendisliği yapılarının yerini almasına izin vermektir. Bu sebeple iskeleler, hücrelerin kendi HDM'lerini üretebilmelerine izin vermek için biyolojik olarak parçalanabilir/bozunabilir olmalıdır (O'Brien 2011).
- Mekanik özellikler: Doku mühendisliği iskeleleri ideal olarak implante edilecek hedef doku veya organın mekanik özelliklerine benzer mekanik özelliklere sahip olmalı, ayrıca implantasyon sırasında cerrahi işlemlere izin verecek kadar da güçlü olmalıdır (Leong vd. 2008).
- İskele mimarisi: Doku mühendisliği alanında geliştirilen ve kullanılan iskelelerin mimarisi ciddi öneme sahiptir. Yapı içerisinde bulunan hücrelere gereken yeterli besin difüzyonunun sağlanması için yapı iskeleleri birbirine bağlı bir gözenek yapısına ve yüksek gözenekliliğe sahip olmalıdır. Aksi takdirde yetersiz beslenme ve atıkların uzaklaştırılmaması gibi problemler ortaya çıkmakta ve bu problemler mevcut hücrelerin canlılığının azalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle iskele tasarımı ve üretiminde gözenek büyüklüğü, gözenek yapısı ve gözenekler arası bağlantı oldukça önemlidir (Ko vd. 2007).

Doku mühendisliğinde iskele üretimi için kullanılan biyomalzemeler, hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını sağlamalı bu sayede de yeni doku gelişimini desteklemelidir (Kim vd. 2000). Bu iskeleler çok çeşitli doğal ve sentetik materyallerden üretilebilir ancak bu materyalleri üç ana başlık altında incelemek doğru

olacaktır. Bunlar; i) doğal polimerler, ii) sentetik polimerler ve iii) seramiklerdir. Bu noktada malzeme seçimi yeniden yapılandırılacak hedef dokunun türüne bağlıdır. Örneğin seramikler ve seramik-polimer kompozit malzemeler sert doku uygulamalarında yaygın olarak kullanılırken, polimerler yumuşak doku uygulamalarında yaygın kullanılırlar (Murugan ve Ramakrishna 2007).



Şekil 2.2 Doku mühendisliği için iskele materyalleri ve sınıflandırılması

Doğal kaynaklı polimer malzemeler biyobozunur özelliktedirler ve kollajen, jelatin, kitosan ve elastin doğal kaynaklı polimerlere verilecek en önemli örneklerdir. Öte yandan sentetik polimerler incelendiğinde, biyobozunur ve biyobozunmaz özellikte olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Poli (laktik asit) (PLA), poli (glidikolik asit) (PGA), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) biyobozunur sentetik polimerlere örnek verilebilir. Poli (etilen) (PE) ve poli (tetrafloroetilen) (PTFE) polimerleri de biyobozunmaz polimerlere verilecek önemli örneklerdir.

Özellikle kemik ve diğer mineralize doku iskelelerinin üretimi için kullanılan polimerlerin yanında bazı inorganik bileşenlerin kullanımı ile ilgili birçok çalışma

mevcuttur. Bu inorganik materyalleri biyoaktif camlar ve kalsiyum fosfatlar olarak sınıflandırmak mümkündür (Ma 2004). Kalsiyum fosfatlar içerisinde en yaygın kullanılanlar β -trikalsiyum fosfat (β -TCP), hidroksiapatit (HAp) ve bunların türevleridir. Bu inorganik materyallerin yüzey özellikleri osteoblastik hücrelerin yapışmasını, olgunlaşmasını ve farklılaşmasını destekler. Ayrıca bu materyallerin kemik oluşumunu indükleyici (osteoinduktif) oldukları bilinmektedir (Kon vd. 2000).

Doku mühendisliği yaklaşımları ile üretilen iskeleler ile birlikte kullanılan hücreler birçok farklı kaynaktan sağlanabilmektedir. Bu hücreler; i) embriyonik kök hücreler (EKH), ii) germ hücreleri, iii) mezenkimal kök hücreler (MKH) ve iv) olgun (primer) hücrelerdir (Cortesini 2005). EKH'ler farklılaşma konusunda en yüksek potansiyele sahip hücrelerdir ancak insan EKH'lerinin izole edilmesi ve kullanılması birçok Avrupa ülkesinde etik ve yasal endişelere yol açtığından alternatif hücre kaynaklarının, özellikle erişkin kök hücrelerin kullanımına olan ilgi artmıştır.

Erişkin kök hücreler kendi kendini yenileme ve bir veya birden fazla hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Erişkin kök hücrelerin kemik iliği, periferik kan, omurilik, diş, beyin, damar, deri epiteli, kornea, karaciğer, kemik ve pankreası da içeren birçok dokuda bulunduğu bilinmektedir. Bu sebeple doku mühendisliği için kök hücreler sınırsız bir kaynaktır (Kuo ve Tuan 2003).

Mezenkimal kök hücrelerin yenileyici tıp alanında sağladıkları avantajlardan bir diğeri oldukça kolay izole edilebilmeleri ve farklı kültür yöntemleri ile kolay çoğaltılabilmeleridir (Mauney vd. 2005).

2.2 Doku Modelleme / İskele Üretim Teknikleri

Vücuttaki dokular, organlar ve bunlara spesifik hücreler kompleks üç-boyutlu mimaride düzenlenmiştir. Fonksiyonel doku ve organları, özellikle bu dokular için geliştirilecek iskeleleri doku mühendisliği yaklaşımları ile hücre dağılımını kolaylaştıracak ve doku yenilenmesini üç-boyutlu olarak yönlendirecek şekilde tasarlamak gerekmektedir.

Sentetik ve doğal malzemelerin gözenekli doku mühendisliği iskeleleri haline getirmek için çok çeşitli geleneksel üretim yöntemleri mevcuttur. Kullanılan bu tekniklerin en bilinenleri, çözücü döküm, gaz köpüklendirme, faz ayrımı, eriyik kalıplama, dondurarak kurutma, elektroegirme ve partikül uzaklaştırma gibi geleneksel üretim teknikleridir. Günümüze kadar bu teknikler ve bu tekniklerin birkaçının birlikte kullanılması ile üretilmiş ve in-vitro ya da in-vivo çalışmalarda başarı sağlanmış birçok iskele örneği de mevcuttur (Karp vd. 2003, Loh vd. 2013). Bu üretim tekniklerinden bazıları ile sürekli, kesintisiz gözenek yapısına sahip iskeleler elde edilebilmektedir (Sachlos ve Czernuszka 2003).

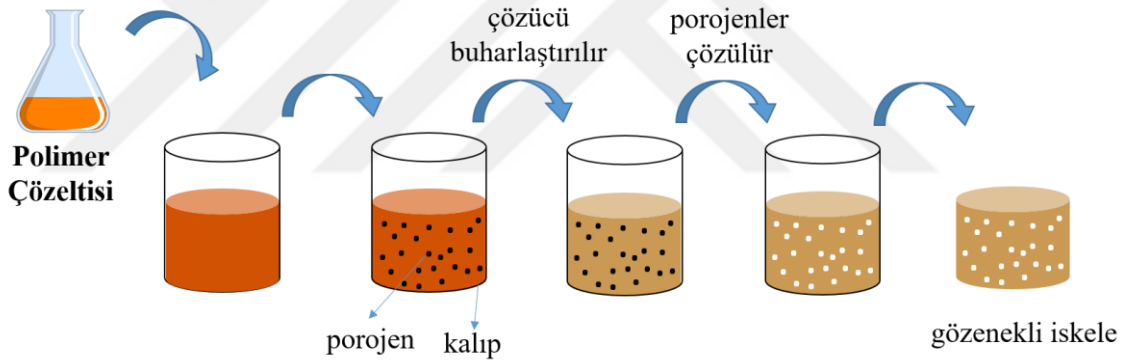
2.2.1 Çözücü döküm

Çözücü döküm tekniği, uygulama açısından oldukça kolay ve düşük maliyetli bir iskele üretim tekniğidir. Temelde çözücünün buharlaştırılması ile uzaklaştırılması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde kullanılan çözücülerin toksik etki göstermesi gibi olumsuz durumlar ile karşılaşılabilir. Bu problemin aşılması için toksik etki gösteren çözücüler vakum altında tamamen uzaklaştırılmalıdır. Ayrıca bu teknik partikül liçleme/uzaklaştırma tekniği ile birlikte kombin şekilde kullanılarak birçok kısıtlamanın önüne geçilebilmektedir (Subia vd. 2010).

2.2.2 Partikül uzaklaştırma

Partikül uzaklaştırma bir diğer yaygın kullanılan iskele üretim tekniğidir. Bu teknikte tuz, şeker ya da mumlar gibi parçacıklar polimer çözeltisine eklenir ve bu sayede iskelede

gözenek ya da kanal oluşumu sağlanabilir. Polimer çözücüsü buharlaştırılarak uzaklaştıktan sonra kullanılan tuz, şeker ya da mumların uygun çözücüler ile seçici çözülmesi ile iskele içinde gözeneklerin oluşumu sağlanır. Bu teknikte kullanılan bu parçacıklar istenilen boyda, şekilde ve konsantrasyonda seçilebilir ve bu şekilde spesifik özellikte (boyut ve şekil) gözeneklerin oluşumu gerçekleşir. Bu yöntem ile elde edilen iskelelerin sahip olduğu gözenek boyutları ve poröziteleri kullanılan porojenler ile polimer arasındaki orana da bağlıdır (Ma 2004). Partikül uzaklaştırma tekniğinin uygulanması oldukça kolaydır. Ancak yaklaşık 500 µm por büyüklüğü ve yaklaşık %95 oranında por yüzdesi sağlanabilir. Ayrıca üretilen iskelelerin kalınlığı partiküllerin polimer matrisinden uzaklaştırılmasının zorluğundan ötürü 2 milimetre ile sınırlıdır (Liu ve Ma 2004). Partikül uzaklaştırma tekniğinin şematik gösterimi **şekil 2.3**'de gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Partikül uzaklaştırma yönteminin şematik gösterimi

2.2.3 Gaz köpüklendirme

Gaz köpüklendirme tekniği Mooney ve arkadaşları tarafından bulunan, istenen oran ve boyutlara sahip gözenekli iskelelerin organik çözücüler kullanılmadan üretilbildiği bir tekniktir (Mooney vd. 1996). Bu teknik polimer fazın içerisine CO₂ ve N₂ gibi inert gazların yüksek basınç ile gönderilmesi ve bu gönderilen gaz sayesinde sıvıda köpük oluşturulması prensibine dayanmaktadır. Bu teknikte oluşturulan köpük ayrıca kullanılan herhangi bir köpüklendirme ajanı vasıtasıyla da elde dileyebilir. Elde edilen köpük

dondurma ya da liyofilizasyon gibi prosesler ile stabilize edilir (Poursamar vd. 2015). Gaz köpükendirme tekniğinde karşılaşılan en önemli kısıtlama bu tekniğin tek başına kullanılarak elde edilen iskelelerde gözenekler/porlar arasında bağlantının olmamasıdır. Gözenekler arasında bağlantı olmaması homojen olmayan bir yapı sergilemektedir. Bu da kapalı gözeneklilik olarak adlandırılabilir ve farklı teknikler ile kombin şekilde kullanılarak bu kısıtlamalar ortadan kaldırılabilir (Salerno vd. 2012).

Gaz köpükendirme tekniği ile doğal ve sentetik polimerler, seramik yapılar ve agar membranlardan gözenekli yapılar elde edilebilmektedir. Bu tekniğin sahip olduğu en büyük avantaj bazı diğer tekniklerde kullanılan organik çözücüler ve uygulanan yüksek sıcaklık parametrelerine ihtiyaç olmamasıdır. Organik çözücü kullanılarak üretimi yapılan iskelelerde bulunabilecek organik kalıntılar iskelelere ekilen hücrelere ve iskelenin implante edileceği çevre dokulara zarar verebilmektedir. Ayrıca bu organik kalıntılar büyüme faktörü gibi biyolojik olarak aktif bileşenleri etkisiz hale getirebilmektedir (Harris vd. 1998).

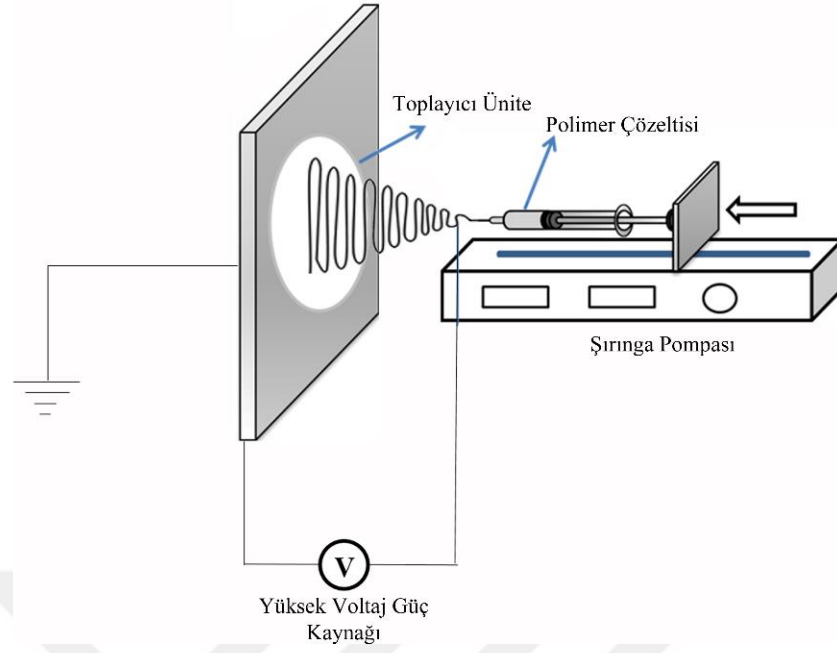
2.2.4 Faz ayrımı

Faz ayırma teknikleri 1990'lı yılların başından günümüze kadar doku mühendisliği iskelelerinin üretimi amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemde faz ayırma termal ya da çözücüsüz bir yöntem ile indüklenebilir. Homojen çok bileşenli bir sistem, belirli koşullar altında, termodinamik olarak kararsız hale gelir ve sistemin serbest enerjisini düşürmek için birden fazla faza ayrılma eğilimindedir. Kısaca bu teknikte polimer uygun bir çözücü içerisinde çözülür, uygun bir kalıp içerisine yerleştirilir sonrasında polimer çözeltisi, sıcaklık değişimi ile polimer açısından zengin bir faz ve polimer zayıf faz olmak üzere iki faza ayrılır. Çözücü ekstraksiyon, buharlaştırma veya süblimleştirme şeklinde uzaklaştırıldıktan sonra, polimer açısından zengin faz katılır ve gözenekli bir polimer iskele elde edilmiş olur (La Carruba vd. 2008, Sachlos ve Czernuszka 2003). Bu teknik ile oluşturulan iskelelerin sahip olduğu gözenekler genellikle birkaç ila 10 mikrometre arasında çaplara sahiptir. Bu gözenekler homojen olarak dağılmamış vaziyettedir ve bu durum da doku mühendisliği uygulamaları için uygun değildir.

Bu yöntemin en önemli avantajı diğer iskele üretim teknikleri ile kombin şeklinde kullanılabilmesidir. Örneğin gözenek morfolojisini daha iyi kontrol edebilmek için partikül uzaklaştırma tekniği ile birlikte ya da nano fiber yapılarının elde edilebilmesi için hızlı prototipleme tekniği ile kombin olarak kullanım bulunmaktadır (Smith vd. 2007).

2.2.5 Elektroegirme

Elektroegirme kuvvetli bir elektrik alana maruz bırakılan polimer çözeltilerinin lifsi yapılar oluşturmaya esasına dayanan gelişmiş bir tekniktir. Elektroegirme tekniği mikron boyutlardan nano boyutlara kadar geniş bir skalada fiber üretimi amacıyla kullanılmaktadır (Cao vd. 2013, Vurat vd. 2018). Bu teknikle elde edilen lifsi ağ yapıları oldukça yüksek poröziteye sahiptir ve bu sayede oluşturulan iskeleler oldukça yüksek yüzey alanına sahip olmaktadır. Elektroegirme sistemi üç temel bileşenden oluşmaktadır. *i) yüksek voltaj güç kaynağı, ii) enjektör ve enjektör pompası, iii) topraklanmış bir toplayıcı ünite (Şekil 2.4).* Elektroegirme prosesinde enjektör içerisindeki polimer çözeltilisi istenen hızlarda enjekte edilmeye başlanır, bu sırada enjektör ucu ve toplayıcı ünite arasındaki alanda oluşan elektriksel alan damlacıkların yüzey gerilimini aştığında enjektör iğnesinden topraklanmış toplayıcı üniteye doğru elektrostatik itme ile uzayan polimer lifler oluşur. Bu proses devam ederken toplayıcı üniteye doğru hareket eden polimer liflerinden çözücü buharlaşır ve katı fiberler elde edilir.



Şekil 2.4 Elektroğirme sistemi bileşenleri

Elektroğirme tekniği poli(kaprolakton) (PCL), poli(laktik asit) (PLA), poli (vinil alkol) (PVA) gibi sentetik polimerler ile alginat, kitosan, selüloz, ipek fibroin gibi doğal polimerler için uygulanmaktadır (Lalegül-Ülker vd. 2019). Bu ölçüde yaygın kullanıma olanak sağlaması, düşük maliyetli bir teknik olması ve oldukça homojen fiber üretimi sağlanabilmesi elektroğirme tekniğinin doku mühendisliği alanında iskele üretiminde yaygın kullanılmasını doğurmuştur.

2.2.6 Dondurarak kurutma

Dondurarak kurutma işlemi temel olarak uygun bir çözücü içinde çözülen bir polimerin donma noktasının altına kadar soğutulmasını ve çözücünün süblimleşme ile uzaklaştırılıp polimerik yapıda gözenek oluşması olarak bilinmektedir. Doku mühendisliği alanında iskele üretimi için oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. (Qiang ve QingLing 2006, Mandal ve Kundu 2009, Brougham vd. 2017). Bu teknik temelde 2 aşamadan oluşur. İlk aşamada istenen konsantrasyonda hazırlanan polimer çözeltisi düşük sıcaklıklara kadar soğutulur, donar ve çözücü buz kristalleri oluşur. İkinci aşamada ise yüksek bir vakum

altında buz kristelleri süblimleşme şeklinde uzaklaştırılır. İşlem sonunda süblimleşen buz kristelleri sayesinde gözenekli bir yapı elde edilir.

Dondurarak kurutma işleminde yüksek sıcaklık ve partikül uzaklaştırma gibi proseslere ihtiyaç yoktur. Bu sebeplerden oldukça avantajlı bir tekniktir ve aynı zamanda yüksek gözeneklilik oranına sahip iskeleler elde edilmesi mümkündür. Elde edilen iskelelerdeki gözenek büyüklüğü ve gözeneklilik oranı dondurma işleminin kontrollü olarak yapılması ile değiştirilebilir (O'Brien vd. 2004).

2.2.7 Eriyik kalıplama

Eriyik kalıplama doku mühendisliği iskelelerinin inşaa edilmesinde kullanılabilen alternatif bir tekniktir. Bu yöntemde istenen şekilde kalıp kullanılarak polimer iskeleler üretilebilir. Seçilen geometriye sahip kalıp içerisine yerleştirilen polimerler camsı geçiş sıcaklığına kadar ısıtılır ve eriyik hale getirilir. Bu teknikte organik çözücü kullanılmadığından ve nispeten düşük sıcaklık değerleri ile eriyik oluşturulduğundan polimerler ile birlikte biyoaktif materyallerin kullanımı veya kontrollü verilmesi mümkün olabilmektedir. Ancak bazı yüksek sıcaklıkta eriyik hale gelen polimerler için bu çok mümkün olmayabilir (Thomson vd. 2000). Üretilen iskelelerde gözeneklilik oluşturmak için porojen kullanımı gerekmektedir.

2.2.8 Membran laminasyon

Membran laminasyon yöntemi ile değişken katmanlı bir 3B doku mühendisliği iskelesi üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntem dışında bahsedilen diğer geleneksel üretim yöntemlerinde bu şekilde katmanlı yapı elde etmek mümkün değildir (Hutmacher 2000). Bu yöntemde anatomik şekillere sahip iskele inşa etmek oldukça kolaydır ve bu sebepten kemik, kırık gibi işlevleri kısmen geometrilerine bağlı olan dokular için kullanımı daha uygundur. Ancak bu noktada elde edilecek iskelenin gözeneklilik özellikleri tamamen barındırdığı katmanlardaki gözenek özelliklerine bağlıdır. Katmanlar çözücü

döküm ya da partikül uzaklaştırma gibi yöntemlerle oluşturulup biraraya da getirilebilir (Thomson vd. 2000).

Membran laminasyon tekniğinde katmanları biraraya getirirken membranların temas edecek yüzeyleri çözücü ile kaplanır ve bu sayede membranlar arasında bir bağ oluşturulur. Bu şekilde istenen 3B yapı katman katman inşa edilmiş olunur.

Bu kısımda bahsedilen geleneksel iskele üretim tekniklerinin birbirlerine kıyasla bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu avantaj ve dezavantajlar **çizelge 2.1**'de özetlenmiştir.



Çizelge 2.1 Geleneksel iskele üretim tekniklerinin sahip oldukları avantaj ve dezavantajlar

Üretim Teknikleri	Avantaj	Dezavantaj
Çözücü Döküm ve Partikül Uzaklaştırma	- Kontrol edilebilir yüksek porözite - Düşük maliyet - Özel olarak kristallik elde edilebilmesi	- Kullanılan çözücülerin toksisitesi - Mekanik mukavemeti düşük iskele elde edilmesi
Gaz Köpüklendirme	- Kontrol edilebilir yüksek porözite	- Heterojen ve kapalı gözeneklilik sağlanması
Faz Ayrımı	- Moleküllerin aktivitesinde düşüş yaşanmaması	- Toksik çözücülerin kullanımı - İskele morfolojisini kontrol etmenin zorluğu
Elektroeğirme	- Geniş skalada fiber üretimi - Homojen üretime izin vermesi	- 3B yapıların elde edilememesi - Kullanılan çözücülerin toksisitesi - Sistemin birçok parametreye bağlı olması
Dondurarak Kurutma	- Farklı uygulamalar için kullanılabilir. - Por büyüklükleri dondurma prosesi değişikliği ile kontrol edilebilir.	- Yüksek enerji tüketimi - Uzun süre ihtiyacı - Toksik çözelti kullanımı
Eriyik Kalıplama	- Gözenek yapısı ve gözeneklilik oranı üzerinde yüksek kontrol -Yüksek makro yapı kontrolü	- Proses için yüksek sıcaklık ihtiyacı ve moleküller için oluşacak zararlar
Membran Laminasyon	- 3B üretimin kolaylığı - Anatomik geometrideki üretimlere uygunluk	- Kullanılan çözücülerin toksisitesi -Yük taşıma için gerekli mekanik mukavemet eksikliği

Doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerin yeterli besin kaynağının sağlanması ve hücrelerin içe göçlerinin mümkün kılınması için genel olarak birbirine bağlı gözeneklere sahip olmaları istenmektedir. Hücrelerin canlılığını korumaları açısından da bu durum oldukça önemlidir. Ancak kullanılan yöntemlerin bazıları ile iskelelerde istenen poröz yapıyı oluşturmak ve iç mimarisinin hassas kontrolünü sağlamak ciddi ölçülerde zordur (Karp vd. 2003). İskele üretimindeki diğer büyük sınırlamalar; istenilen makro-yapısal (dış geometri, bileşim, mekanik dayanım, yoğunluk, gözeneklilik), ve nano-yapısal (yüzey topografisi, yüzeyin fiziksel-kimyasal yapısı) özelliklerin kesin bir şekilde korunması ve farklı temel malzemelerin kullanımına izin vermemesi olarak özetlenebilir (Seliktar vd. 2013).

Bilinen bu dezavantajları ortadan kaldırmak için farklı teknikler üzerinde duran araştırmacılar doku mühendisliği alanında 3B biyoyazıcıları yüksek ölçülerde kullanmaya başlamıştır. 3B biyobasım ile diğer yöntemlerde sayılan tüm kısıtlamaların hemen hepsi ortadan kaldırılabilir. Hatta tekniğin ilerlemesi ile doku veya organın direkt olarak çok kısa sürelerde üretimi yaklaşımı da oluşmuştur.

2.3 Üç-Boyutlu Biyobasım Teknolojisi

Biyoyazıcılar, biyolojik ve biyokimyasal moleküllerin tek başlarına veya canlı hücrelerin taşıyıcı bir biyomürekkep jel (bioink) ile katmanlar halinde hassas bir şekilde konumlandırıldığı üç-boyutlu doku/organ benzeri yapıların elde edilmesi amacıyla geliştirilmiş olan sistemlerdir (Murphy ve Atala, 2014).

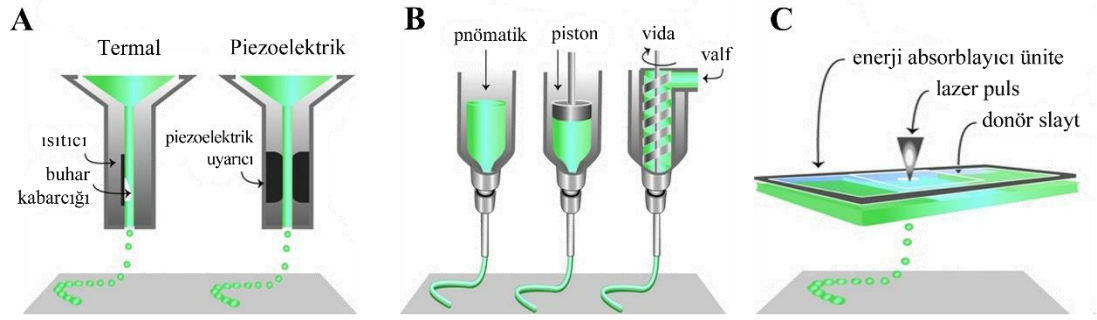
Bu zamana kadar doku mühendisliği yaklaşımları ile deri ve mesane duvarı gibi, temelde iki boyutlu yapıda sayılabilecek sistemler üzerinde elde edilen başarılar dikkat çekmekle birlikte, daha kompleks doku ve organların geliştirilmesinde önemli kısıtlamalar ortaya çıkmıştır. Bu kısıtlamaların temel nedeni, hedef doku veya organa özgü çok sayıda hücre tipinin makro ölçekteki konumlandırılmaları, dağılımları ve hücre tipleri arasındaki biyoarayüzlerin geleneksel doku mühendisliği teknikleri ile istenilen standartlarda oluşturulamamasına dayanmaktadır. Bu kısıtlamaları gidermek üzere, günümüzde halen

geliştirilmekte/iyileştirilmekte olan biyobasım teknolojileri yardımı ile hücrelerin mikro ölçekte konumlandırılması ve 3B yapıların hazırlanabilmesi artık hayal değildir. Bu kapsamda, kemik, deri, karaciğer ve kalp dokusu ile ilgili yapılan çalışmalar başta olmak üzere farklı doku ve organ sistemlerinde önemli başarılar yakalanmaya başlanmıştır (Zhang vd. 2016).

3B biyoyazıcı sistemleri ve 3BB prosesleri üç temel yaklaşım üzerine geliştirilmektedir. Bu yaklaşımlar, **(i)** biyobenzetim (biyomimetik), **(ii)** kendiliğinden biraraya gelme ve **(iii)** mikro-doku yapı taşlarının oluşturulmasıdır. Bu yaklaşımların ilki olan biyobenzetim, bir doku veya organın hücresel ve hücre dışı bileşenlerine benzer yapıların, gerek mikro gerek makro ölçekte üretilebilmesi esasına dayanır. Kendiliğinden biraraya gelme özelliği ise dokunun kompozisyonu, lokalizasyonu, fonksiyonel ve yapısal özelliklerinin temel olarak hücrelere dayandırılması esasına dayanmaktadır. Son yaklaşım olan mikro-doku yapı taşları ise; dokunun küçük ve fonksiyonel yapı taşlarından oluştuğunun göz önüne alınmasıdır (Huh vd. 2012; Murphy ve Atala, 2014).

2.4 Üç-Boyutlu Biyoyazıcı Çeşitleri

3BB temel üç yaklaşımı göz önüne alındığında, farklı çalışma prensiplerine dayanan 3B biyoyazıcı sistemleri geliştirilebilmiştir. Bunlar arasında en yaygın kullanımda olanları sırası ile; Püskürtmeli (Inkjet), Mikro-ekstrüzyon (Microextrusion) ve Lazer-destekli (Laser-assisted) basım sistemleridir (Ozbolat 2015, Knowlton vd. 2015). **Şekil 2.5**'de sırasıyla inkjet, mikro-ekstrüzyon ve lazer temelli üç-boyutlu biyoyazıcıların şematik gösterimleri mevcuttur.



Şekil 2.5 3B Biyoyazıcı çeşitleri A) İnkjet temelli 3B-biyoyazıcı sistemi, B) mikroekstrüzyon temelli 3B-biyoyazıcı sistemi, C) Lazer destekli 3B-biyoyazıcı sistemi

2.4.1 İnkjet temelli

İnkjet (püskürtme) temeline dayanan yazıcı sistemleri biyolojik ve biyolojik olmayan uygulamalarda kullanılan en yaygın yazıcı sistemidir. 3B biyoyazıcı çeşitlerindeki inkjet temelli biyoyazıcılarda kartuş içerisindeki biyomürekkep tabaka ya da toplayıcı ünite üzerine damla damla püskürtülür ve bu şekilde 3B yapılar üretilir. İnkjet temelli sistemlerde kartuş içerisindeki biyomürekkep termal ya da piezoelektrik etki ile püskürtülür (Murphy ve Atala, 2014).

Termal inkjet temelli biyoyazıcılar biyomürekkebin nozülde damla damla püskürtülmesi için biyomürekkep kartuşunun elektriksel olarak ısıtılması şeklinde çalışmaktadır. Çoğu çalışmada bu lokal ısıtmanın biyomürekkep içerisindeki biyolojik moleküllere (DNA, proteinler, hücreler vb.) önemli bir olumsuz etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Xu vd. 2006).

Piezoelektrik sistemli inkjet 3B biyoyazıcılarda, biyomürekkebi düzenli aralıklarla damlacıklara ayırmak için biyoyazıcı kartuş yuvasında bir piezoelektrik kristal bulunmaktadır. Bu kristale gerilim uygulamak akustik dalgalar oluşmasına sebep olur ve bu sayede kartuşta bir basınç uygulanır. Bu basınç ile kartuş içerisindeki biyomürekkep nozülde püskürtülür (Pereira ve Bartolo 2015).

İnkjet temelli 3B biyoyazıcıların en önemli avantajları yüksek baskı hızına sahip olmaları, geniş uygulanabilirlikte olmaları ve düşük maliyete sahip olmalarıdır. Diğer taraftan biyomürekkep içerisindeki hücrelerin ve biyolojik moleküllerin mekanik strese maruz kalmaları, nozülün sık sık tıkanması gibi kısıtlamalar 3BB prosesinde dezavantajlar yaratmaktadır.

2.4.2 Mikroekstrüzyon temelli

En yaygın ve maliyeti düşük olan, özellikle biyolojik amaçlı olmayan baskı teknikleri mikroekstrüzyon prensibine dayalıdır. Mikroekstrüzyon temelli sistemler genelde, x, y ve z eksenleri boyunca hareket edebilen bir veya birkaç kasnak sistemi, sıcaklık kontrollü bir malzeme işleme ve dağıtma sistemi, biriktirme alanını aydınlatmak için veya foto-başlatıcının aktivasyonu için bir ışık (UV) kaynağından oluşurlar. Mikroekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcılarda biyomürekkeplerin sıkım işlemleri pnömatik olarak pistonun itilmesi ile veya bir valf etrafında dönen vida yardımıyla tetiklenmektedir. Bazı mikroekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcı sistemleri, yeniden yapılandırmadan birkaç malzemenin seri olarak basımını kolaylaştırmak için birden fazla basım kartuşu kullanmaktadır. Mikroekstrüzyon temelli biyoyazıcılardaki en büyük avantaj geniş bir viskozite skalasında malzeme basabilir olmaları ve hücre yoğunluğunun yüksek mertebelere çıkarılabilmesidir.

Her ne kadar hücre yoğunluğu parametresinde avantaj sahibi olsa da mikroekstrüzyon temelli biyoyazıcılar ile basım sonrası hücre canlılığı, mürekkep püskürtmeli biyoyazıcılara göre daha düşüktür. Hücre hayatta kalma oranları yaklaşık olarak % 50-80 aralığındadır ve bu oran artan ekstrüzyon basıncı ile ciddi ölçülerde azalabilir. Mikroekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcı sistemleri ile aort kapakçıları, tümör modelleri, kıkırdak doku modelleri gibi birçok farklı doku uygulamaları günümüze kadar başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir (Duan vd. 2013, Xu vd. 2011). Üretim süreleri yüksek çözünürlüklü yapılar için bir miktar yavaş kalsa da geniş bir skalada değişen boyutlarda yapılar elde edilebilmektedir.

2.4.3 Lazer temelli

Lazer ile uyarılma prensibine dayanan lazer temelli 3B biyoyazıcılar (LTB), en başta metalleri transfer etmek için geliştirilmiştir ancak ilerleyen zamanlarda peptidler, DNA ve hücreler gibi biyolojik materyallere başarıyla uygulanmıştır. LTB mürekkep püskürtmeli veya mikroekstrüzyon temelli biyobasımdan daha az yaygın olmasına rağmen, doku ve organ mühendisliği uygulamaları için her geçen gün giderek daha fazla kullanılmaktadır. Tipik bir LTB, lazer enerji emici tabaka, atımlı lazer ışını, bir odaklama sistemi gibi bileşenleri içerir. LTB’da üretilen yapıların çözünürlüğü, lazer akıcılığı (birim alan başına iletilen enerji), biyomürekkebin yüzey gerilimi, slayt ve alt tabaka arasındaki hava boşluğu ve biyolojik maddenin viskozitesi gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Dinca vd. 2008).

LTB temelli 3B biyoyazıcılarda çalışma prensibi, küçük damlacıkların yerel olarak püskürtülmesini sağlamak için basılacak biyomürekkep ile kaplanmış bir donör slaytına yüksek enerjili darbeli bir lazerin uygulanmasını içermektedir. Gelen lazer ışığı temel olarak, ışık enerjisini absorbe eden ve biomürekkebe transferini destekleyen altın ve titanyum gibi ince bir metal katmanla kaplanmış, lazer saydam bir alt tabakaya (örneğin, cam veya kuvars alt tabaka) odaklanır. Bu esnada bir basınç oluşur ve küçük bir damlacık alt platforma doğru itilir (Guillemot vd. 2010).

LTB sistemlerinde nozül bulunmadığından diğer sistemlerde karşılaşılan nozül tıkanma problemleri ortaya çıkmaz, bu sebeple 1 ila 300 mPa/s gibi geniş skaladaki viskozite değerlerine sahip biyomürekkeplerin basımına uygundur. Bu avantajlarının yanında LTB sistemleri 10^8 hücre/mL hücre yoğunluğuna sahip biyomürekkepleri, 5 kHz’lik bir lazer darbe tekrarlama hızı kullanılarak 1,6 mm/s’ye kadar hızlarda yüksek çözünürlüklerde basabilir (Murphy ve Atala 2014). Bu avantajlara rağmen, LTB’nın yüksek çözünürlüğü yani yüksek şekil doğruluğunu elde etmek için hızlı jelleşme kinetiği gerektirir ve bu da nispeten düşük akış hızı ile sonuçlanır. Her basılı hücre veya hidrojel türü için sıklıkla gereken her bir şeridin hazırlanması zaman almaktadır ve birden fazla hücre türü ve / veya

malzemenin birlikte basılması gerektiğinde basım işlemi çok zahmetli hale gelebilir (Michael vd. 2013).

Birbirlerine göre bazı üstünlükleri veya kısıtlamaları bulunan bu 3B biyoyazıcı teknolojilerinin **çizelge 2.2**'de farklı parametreler açısından karşılaştırılması yapılmıştır.

Çizelge 2.2 3B biyoyazıcı teknolojilerinin karşılaştırılması

	İnkjet Temelli	Ektrüzyon Temelli	lazer Temelli
Basım hızı	Yüksek	Orta	Orta
Çözünürlük	Orta-Yüksek	Orta	Yüksek
Hücre yoğunluğu	Düşük	Yüksek	Orta
Hücre canlılığı	Yüksek	Orta	Yüksek
Biyomürekkep vizkozitesi	Düşük	Yüksek	Düşük - Yüksek
Uygun çapraz bağlama metodu	Kimyasal - UV Termal - Enzimatik	Kimyasal - UV Termal - İyonik Enzimatik - pH	İyonik - UV
Mekanik / yapısal bütünlük	Düşük	Yüksek	Düşük
Maliyet	Düşük	Orta	Yüksek

Günümüzde bu üç farklı teknolojinin prensiplerine dayanarak ticari olarak üretilen ve kullanımı devam eden birçok 3B biyoyazıcı mevcuttur. **Çizelge 2.3**'de bu 3B biyoyazıcıların marka-model, üretici firma ve teknolojilerine ait bilgiler bulunmaktadır.

Çizelge 2.3 Ticari 3B biyoyazıcı modelleri ve üreticileri

Şirket	Model	Teknoloji	Ülke
EnvisionTEC	3D-Bioplotter	Ektrüzyon temelli	Almanya
RegenHU	BioFactory [®] , 3DDiscovery [®]	Ink-jet temelli	İsviçre
Digilab	CellJet	Ektrüzyon temelli	Japonya
Axolotl Biosystems	AxoDual X, AxoDual, AxoMono	Ektrüzyon temelli	Türkiye
Orgonovo	NovoGen MMX Bioprinter [™]	Ektrüzyon temelli	ABD
CellInk	BIO X [™] , BIO X6 [™] , Inkredible [™]	Ektrüzyon temelli	İsveç
Regenovo Biotechnology	Regenovo 3D Bioprinter	Ektrüzyon temelli	Çin
Biobots	Biobots	Ektrüzyon temelli	
Seraph Robotics	Fab@Home	Ektrüzyon temelli	ABD
GeSIM	BioScaffolder 2.1, 3.1, 3.2, 3.3, 5.1	Ektrüzyon temelli, Ink-Jet Temelli	Almanya

2.5 Biomürekkeplerin Sahip Olması Gereken Özellikler

3BB proseslerinde önemli unsurlardan birisi, biyobasım işleminde hücre ve diğer biyokimyasal molekülleri çevreleyecek, hücre canlılığı ve çoğalması için uygun ortamı sağlayacak, uygun mekanik dayanıma sahip yazdırılabilir jellerin seçimidir. Bu zamana

kadar yapılan çalışmalarda; çalışılan hücre, doku ve çalışmaya özgü olarak çeşitli yazdırılabilir doğal ya da sentetik jellerin kullanıldığı görülmektedir. 3BB uygulamaları için kullanılacak biyomürekkeplerin sahip olması gereken bazı kritik özellikler mevcuttur. Bu özellikleri biyolojik ve fiziksel olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Fiziksel gereklilikler biyobasılabirlik, çapraz bağlanabilirlik, uygun reolojik, mekanik ve vizkozite özellikleridir. Biyolojik gereklilikler ise biyouyumluluk, biyobozunurluk ve biyobenzetim özellikleridir.

3BB uygulamalarında kullanılan biyomürekkepler öncelikler basım sonrası yapıyı kendi kendine sabit tutma gibi bir kabiliyete sahip olmalıdır. Kullanılan biyomürekkebin basılabirliği, solüsyonun (jelin) vizkozitesi, yüzey gerilimi, çapraz bağlanma özellikleri gibi farklı parametrelere bağlıdır (Gopinathan ve Noh 2018). Biyomürekkebin vizkozite özellikleri 3BB prosesi ile oluşturulan yapıların stabilitesine doğrudan etkilidir, ancak biyomürekkebin vizkozitesi çok yüksek ise biyobasımı için uygulanması gereken basınç daha da artacak ve bu hücre canlılığına olumsuz etki edecektir.

Kullanılan biyomürekkeplerin 3BB işlemleri sonrasında stabil kalabilmesi yalnızca vizkozite özelliğine bağlı değildir. Bunun yanında basım sonrasında veya basım anında in-situ olarak çapraz bağlanabilme yeteneğine sahip olmalıdır. Bu sebeple biyomürekkep seçiminde çalışmanın amacına yönelik uygun çapraz bağlanma yöntemlerinin (iyonik, enzimatik, termal, kimyasal, fotopolimerizasyon vb.) uygulanabildiği biyomürekkepler tercih edilmelidir.

3BB işleminde seçilecek biyomürekkepler hedef dokuya spesifik olarak da değişkenlik gösterebilmektedir. Genellikle kullanılan biyomürekkepler mekanik olarak düşük mukavemete sahip olsa da farklı polimerler ile kombin edilerek ya da çeşitli modifikasyonlar ile mekanik özellikleri daha yüksek biyomürekkepler geliştirilip kullanılmaktadır. Özellikle sert doku (kıkırdak ve kemik doku) uygulamaları için bu tarz biyomürekkeplere ihtiyaç duyulmaktadır.

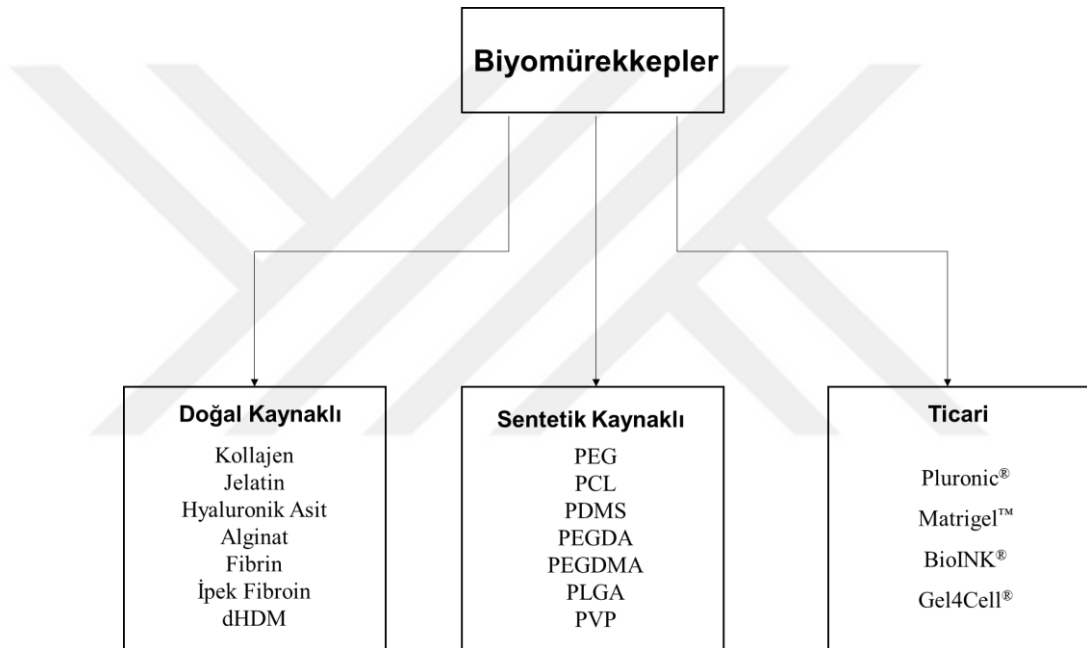
Tüm bu gerekliliklerin yanında kullanılan biyomürekkeplerin hücre uyumluluğu yüksek immünojenitesi de mümkün oldukça düşük olmalıdır. Bu sayede basım aşamalarında biyomürekkep içerisinde olan hücrelerin canlılığına negatif etkisi minimum seviyede olacaktır. Ayrıca hücrelerin tutunması açısından uygun peptit dizilerine (örn: RGD) sahip olan doğal polimerler sentetik polimerlere göre tercih sebebidir. Bunun yanında seçilen doğal ya da sentetik biyomürekkeplerin biyobozunma ürünleri hedef ve çevre dokulara zarar vermemelidir.

3BB işlemi ile üretilen yapıların spesifik doku ya da organa hem hücresel hem de HDM açısından benzer/özdeş olarak üretilmesi gerekmektedir. Bu sebeple üzerinde çalışılacak hedef dokunun mikroçevresinin iyi anlaşılması gerekmekte ve hücrelerin spesifik düzenlenmesi, hücre dışında kullanılan biyomoleküllerin de uygun seçilmesi zorunluluğu ortaya çıkmaktadır (Murphy ve Atala, 2014).

2.6 Üç-Boyutlu Biyobasımda Kullanılan Biyomürekkepler

Biyomürekkepler, 3BB ile doku/organ benzeri yapılar üretmek için kullanılan, hücrelerin yüklü olduğu ve ayrıca HDM bileşenlerine sahip olabilen ya da eklenebilen malzemeler olarak tanımlanır (Whitford ve Hoving 2016). Doku mühendisliği alanında üç-boyutlu doku ve organ yapılarının üç-boyutlu biyoyazıcılar ile üretimi için iki temel biyomürekkep çeşiti mevcuttur. Bunlardan ilki ve en yaygın olanı, hücrelerin hidrojellere veya benzer eksojen materyallere yüklendiği ve 3B yapılara biyobasım yapıldığı iskele temelli biyomürekkeplerdir. Hücrelerin yüklü olduğu hidrojeller mevcut hücrelerin çoğalmasına ve büyümesine izin verir (Ozbolat 2015). İkinci biyomürekkep tipinde hücreler, embriyonik gelişimi taklit eden iskeletsiz bir süreçte, eksojen bir biyomateryal kullanılmadan biyobasıma alınır. Hücreler ilk önce biyobasım süreçleri için tasarlanmış neo-dokulara dönüştürülür. Ortaya çıkan yeni dokular daha sonra, büyük ölçekli fonksiyonel dokuların üretimi için kaynaştıkları ve olgunlaştıkları belirli modellerde biriktirilir (Hospodiuk vd. 2017).

3B biyobasım uygulamalarında en yaygın kullanılan biyomürekkepler, çevresel işleme koşullarına yanıt veren doğal hidrojeller olan alginat, kollajen, metakrillenmiş jelatin, hyalüronik asit, hücresizleştirilmiş HDM'ler, ipek ve agarozdur. Bunlar doğal biyomürekkepler sınıfında incelenir iken sentetik polimerler sınıfında ise poli(kaprolakton) (PCL), polietilen glikol (PEG), poli(vinil pirolidon) (PVP), poli(etilen glikol)dimetakrilat (PEGDMA), poli(dimetilsiloksan) (PDMS) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi polimerler bulunmaktadır. Ayrıca Pluronic®, Matrigel™ ve Gel4Cell® gibi ticari biyomürekkepler de ayrı bir sınıf altında incelenebilir.



Şekil 2.6 Doğal, sentetik ve ticari biyomürekkepler

2.6.1 Kollajen temelli biyomürekkepler

Kollajen, memelilerde HDM'in birincil yapısal proteinidir ve dokulara güç ve yapısal stabilite sağlar. Yaklaşık 29 farklı kollajen türü mevcuttur ve Tip-I kollajen aralarında en bol olanıdır. Kollajen, üçlü sarmal polipeptit yapısında düzenlenmiştir ve hücre ile etkileşimli bağlanma alanlarına sahiptir (Hözl vd. 2016). Yüksek biyoyumumluluğa sahip olması ve fizyolojik koşullarda hidrojel oluşturulabilmesi gibi özellikleri sayesinde 3BB uygulamaları için uygun bir malzeme olarak bilinmektedir.

Kollajen hidrojeller, çapraz bağlı sentetik polimer jeller ile kıyaslandığında oldukça düşük mekanik özelliklere sahiplerdir. Bu kısıtlama sebebiyle hücrelerin de hidrojel içerisindeki homojen dağılımı olumsuz olarak etkilenmektedir. Saf kollajenden hazırlanan biyomürekkepler düşük vizkoziteye ve yavaş jelleşme özelliğine sahiptir. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak adına saf kollajen, riboflavin (vitamin B2) ya da genipin ile kimyasal olarak çapraz bağlanabilir, metakrilik anhidrit ile reaksiyona sokularak fotobaşlatıcı ile çapraz bağlanabilen kollajen metakrilat oluşturulabilir ya da mekanik olarak daha yüksek özelliklere sahip hidrojeller ile kompozit oluşturularak farklı biyomürekkepler geliştirilebilir (Ashammakhi vd. 2019, Vurat vd. 2020).

Saf kollajen hidrojeller ile yapılan çalışmalar literatürde mevcut olsa da kollajenin farklı hidrojeller ile kompozit oluşturularak elde edilen biyomürekkepler ile yapılan çalışmalar oldukça fazladır. Örneğin Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada alginat ile kollajenden oluşan kompozit biyomürekkebin kondrositler ile birlikte 3B basımını gerçekleştirmiş ve kıkırdak doku mühendisliği uygulaması için kullanmışlardır (Yang vd. 2018). Yine aynı şekilde Strateffin ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada jelatin ile karıştırılan kollajenden oluşturulan hidrojinin biyolojik aktivitesi ve reolojik özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Bu kapsamda kollajen/jelatin kompozit hidrojel ile insan endotel hücreleri ve insan mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır (Strateffin vd. 2017).

2.6.2 Jelatin temelli biyomürekkepler

Kollajenin denatüre formu olan jelatin, gıda ve ilaç sektörlerinde oldukça yaygın kullanılan, hayvanların kemik deri ve tendon dokularından asidik ya da alkali olarak izole edilen bir proteindir (Güngör-zkerim vd. 2018). Kollajen ile aynı aminoasit içeriğine sahiptir ve kollajene yapısal olarak benzemektedir. Bir biyomalzeme olarak düşünüldüğünde jelatin oldukça avantajlı özellikler taşımaktadır. Yüksek biyoyoumluluğa sahiptir, polar çözücüler ile kolay çözülür, oldukça düşük toksisite gösterir ve biyoaktif bir materyaldir (Vurat vd. 2020). Jelatin sıcaklığa duyarlı bir proteindir ve yaklaşık 30°C altındaki sıcaklıklarda konsantrasyona bağlı olarak jelasyon

özelliği göstermektedir. Ancak fizyolojik şartlarda modifiye edilmemiş jelatin çok kısa süre içerisinde deġrede olmaktadır. Bu avantajları ve dezavantajları göz önüne alındığında jelatin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan önemli bir doğal polimerdir ancak 3B biyobasım uygulamalarında saf jelatin kullanımı ciddi zorluklar teşkil etmektedir.

3BB uygulamalarında jelatin temelli biyomürekkeplerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacı ile farklı yollar izlenebilmektedir. Jelatin ile farklı biyomürekkeplerin kombin şekilde kullanımı yoluyla kompozit biyomürekkepler geliştirilebilir ve bu sayede mekanik olarak daha dayanıklı yapıların 3B biyobasımı mümkün olabilir. Literatürde jelatin ile alginatın birlikte kullanıldığı birden çok çalışma mevcuttur ve bu çalışmalar incelendiğinde saf jelatin kullanımı ile elde edilecek biyomürekkeplere göre alginat/jelatin kompozit biyomürekkeplerinin daha yüksek mekanik dayanıma sahip oldukları anlaşılmıştır. Ayrıca alginat ile birlikte kullanıldığında oluşturulan 3B yapıların daha efektif olarak çapraz bağlanabildiği de görülmüştür ve sert doku uygulamaları için kullanmaya uygun oldukları raporlanmıştır (Zhang vd. 2013, Neufurth vd. 2014, Duan vd. 2013).

Doku mühendisliği alanında birçok uygulama için çapraz bağlanabilir özellikteki jelatin materyaline ihtiyaç duyulmaktadır (Van Den Bulcke vd. 2000). Jelatinin, metakrile edilmesi ile elde edilen yarı sentetik Jelatin metakrilat (Jel-MA) uygun biyolojik özellikleri ve ayarlanabilir mekanik özellikleri sayesinde doku mühendisliği alanında ve 3BB uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Hospodiuk vd. 2017). Jel-MA jelatinin amin gruplarına metakrilat gruplarının konjuge olması ile elde edilir. Yüksek mekanik mukavemet ve düşük şişme özellikleri göstermektedir ve farklı biyomürekkepler ile kombin şekilde kullanılmaya oldukça uygudur. Jel-MA için jelatinin foto çapraz bağlanabilir formu olarak da bahsetmek mümkündür. 2-Hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiyofenon (Irgacure® 2959) ve Lityum fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat (LAP) gibi radikal bir fotobaşlatıcının varlığında Jel-MA UV ışık maruziyeti sonrasında çapraz bağlanmaktadır.

2.6.3 Alginat temelli biyomürekkepler

Alginat veya alginik asit kahverengi alglerden elde edilen negatif yüklü doğal bir polimerdir. Alginat tekrar eden birim olarak iki monomere sahiptir. Bunlar (1-4) - β -D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asittir (Gopinathan ve Noh 2018). Alginat biyopolimeri birçok önemli özellik taşır. Örneğin; su ve diğer molekülleri kapiler kuvvetler yardımıyla hapsedebilir ayrıca içten dışa geçişine de izin verebilir. Biyouyumluluğu oldukça yüksektir ve çok hızlı çapraz bağlanabilir. Bu önemli özellikleri sayesinde 3BB uygulamalarında yaygın kullanım görmektedir (Ashammakhi vd. 2019).

Alginat kalsiyum klorür (CaCl_2) ve kalsiyum sülfat (CaSO_4)   zeltileri yardımıyla çapraz bağlanmaktadır. 2 değerlikli kalsiyum iyonları, 2 komşu alginat zinciri arasında negatif yüklü karboksilik asit gruplarının çekilmesi ile bir köprü oluşturur. Bu sayede iyonik olarak bir çapraz bağlanma gerçekleşmiş olur (Lai vd. 2016). Bu  apraz bağlanma için gerekli olan süre kullanılan alginatın konsantrasyonu ile doğrudan ilgilidir.

Literatürde alginatın 3BB uygulamalarında tek başına ve farklı biyomürekkepler ile kombin olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Yu ve arkadaşları alginat biyomürekkebi ile birlikte kıkırdak hücrelerini kullanarak 3B biyobasım gerçekleştirmişler ve biyobasım sürecinde ve sonrasında kıkırdak progenitör hücrelerinin canlılığını destekledikleri raporlanmıştır (Yu vd. 2013). Bir diğer çalışmada Jia ve arkadaşları alginat temelli kompozit bir biyomürekkep ile 3B vasküler benzeri yapıların biyobasımını gerçekleştirmişlerdir. Jel-MA / Alginat / PEGTA içeren kompozit biyomürekkep ile üretilen vasküler yapıların da detaylı karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve raporlanmıştır (Jia vd. 2016).

2.6.4 Hyalüronik asit temelli biyomürekkepler

Hyalüronik asit (HA) veya hyalüronan özellikle bağ, kıkırdak ve nöral dokularda bulunan s lfatlanmamış glikozaminoglikandır ve özellikle kıkırdak dokunun temel HDM

bileşenidir (Nettles vd. 2004). Yapısında N-asetil-D-glikozamin ve glikuronik asit tekrarlayan birimlerini [α -1,4-D-glikuronik asit- β -1,3-N-asetil-D-glikozamin] içermektedir. HDM'in ana bileşenlerinden biri olan HA hücresel sinyal aktivitesinde, hücre yüzey reseptör etkileşimlerinde, matriks organizasyonunda ve yara iyileşmesinde önemli fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca bunların yanında biyouyumluluk, biyobozunurluk, yüksek su tutma kapasitesi ve viskoelastisite gibi çok önemli fizikokimyasal özelliklere de sahiptir (Fallacara vd. 2018). Tüm bu önemli özellikleri sebebi ile HA birçok doku mühendisliği uygulamalarında uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır.

Önemli avantajlarının aksine HA oldukça düşük mekanik özellikler gösteren bir polimerdir ve bu sebeple 3BB uygulamalarında kullanımında bazı kısıtlamalar ile karşılaşmaktadır. Diğer doğal polimerlerde de olduğu gibi, yetersiz mekanik özellikleri değiştirmek için kimyasal olarak modifikasyona tabi tutulabilir ya da mekanik özellikleri daha yüksek olan diğer polimerler ile birlikte kombin olarak kullanılabilir.

HA polimerinin 3BB uygulamalarında farklı birçok polimer ile kompozit olarak kullanımı mevcuttur. Bu doğrultuda literatürde HA polimerinin, jelatin, fibrinojen, modifiye jelatin, selüloz gibi farklı doğal polimerler ve çeşitli sentetik polimerler ile kombin edilerek farklı doku/organ uygulamalarına yönelik kullanımı ile ilişkili birçok çalışma mevcuttur (Henriksson vd. 2017, Stichler vd. 2017, Seol vd. 2018).

Farklı polimerler ile kombin kullanımının yanında HA polimerinin modifikasyonuna yönelik olarak yapılan çalışmalar da oldukça yaygındır. Örneğin; metakrilik anhidrit ile reaksiyonu sonrasında metakrile olan HA yarı sentetik biyomürekkebi HA polimerinin sahip olduğu düşük mekanik özelliklerin ortadan kaldırması ve in-situ çapraz bağlanabilmesi açısından oldukça yaygın tercih edilmektedir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde metakrillenmiş HA biyomürekkebinin radikalik başlatıcı yardımı ile in-situ çapraz bağlanması ve bu şekilde oluşturulan 3 boyutlu yapılar ile kırık, kemik, karaciğer gibi doku modelleri üzerine çalışmaların mevcut olduğu görülmektedir.

2.6.5 Deselülerize HDM temelli biyomürekkepler

Hücreleştirme, hücresel bileşenlerin dokulardan veya organlardan uzaklaştırma prosesi olarak tanımlanmaktadır (Parmaksız vd. 2016). Bu proseste fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Hücrelerinden arındırılmış HDM (dHDM) yapısında kollajen, glikozaminoglikanlar, proteinler, peptitler ve büyüme faktörleri gibi türetildikleri dokunun bazı biyolojik bileşenlerini taşırlar. Bu sebeple dHDM materyalleri doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında biyolojik iskele görevi üstlenecek yapılarda kullanılmakta, bunun yanında 3BB uygulamalarında biyomürekkep olarak son yıllarda yaygın tercih edilmektedir.

dHDM biyomürekkeplerinin hücre dostu özelliklerine rağmen düşük viskozite, zayıf mekanik mukavemet, hızlı degradasyon ve düşük şekil doğruluğu gibi ciddi kısıtlamaları mevcuttur. Bu kısıtlamaların üstesinden gelmek amacıyla dHDM biyomürekkeplerinin çapraz bağlanması veya farklı biyomürekkepler ile kombin kullanılması söz konusudur. Ancak genipin, glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcılar 3BB ve diğer doku mühendisliği uygulamalarındaki hücre etkileşimli kullanımlar için uygun olmadığından daha hafif bir reaktif olan riboflavin (vitamin B2) kullanımına oldukça sık rastlanmaktadır (Jang vd. 2016).

dHDM temelli malzemeler ile 3BB gerçekleştirmek için farklı polimerler ile kompozit halinde uygulamalara literatürde oldukça sık rastlanmaktadır. Örneğin, Das ve arkadaşları kardiyak HDM ile birlikte doğal ve sentetik birer polimer kullanarak 3BB ile kardiyak doku modeli gerçekleştirmişlerdir (Das vd. 2019). Farklı bir çalışmada Yi ve arkadaşları kıkırdak dHDM ile alginatın birlikte olduğu bir kompozit biyomürekkep geliştirmişlerdir (Yi vd. 2019).

Literatürde farklı biyomürekkepler ve bunların karışım olarak birlikte kullanıldığı kompozit biyomürekkepler ile yapılan bazı çalışmaların detayları **çizelge 2.4**'de verilmiştir.

Çizelge 2.4 Farklı biyomürekkeplerin kullanıldığı 3BB işlemi ile gerçekleştirilen çalışmalar

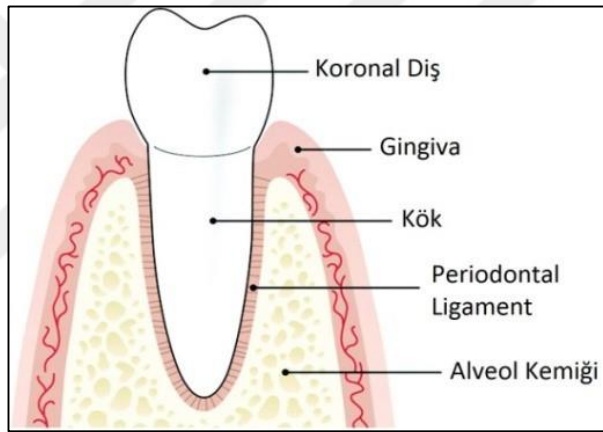
Biyomürekkep / Hücre	Model	Yapılan Çalışma	Kaynak
Kollajen Agaroz (İnsan Kİ-MKH)	Kemik Doku	Biyomürekkepler ile birlikte basımı yapılan MKH'lerin ALP aktivitesi ve osteojenik mRNA ekspresyonları incelenmiş, Biyomürekkebin MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir.	Duarte vd. 2016
Jel-MA PCL (Domuz Kİ-MKH ve Domuz Kondrosit)	Kıkırdak Doku	10 haftaya kadar statik/biyoreaktör kültür gerçekleştirilmiş ve sGAG, total kollajen, kalsiyum içeriği ve mekanik analizler ile değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir.	Daly vd. 2019
Kollajen Alginat (Fare NIH/3T3 Fibroblast ve İnsan HaCaT Keratinositler)	Deri	Potansiyel çok hücreli deri grefti modelinin 10 güne kadar üç-boyutlu hücre düzenlemesi ve proliferasyonlarının değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.	Koch vd. 2012
Kollajen PCL Jelatin (İnsan dermal fibroblast ve epidermal keratinosit)	Deri	3BB ile oluşturulan, dermis ve epidermis tabakalarına sahip deri modelinin 14 gün boyunca kültürü sürdürülmüş ve detaylı incelemeleri gerçekleştirilmiştir.	Kim vd. 2017

Çizelge 2.4 Farklı biyomürekkeplerin kullanıldığı 3BB işlemi ile gerçekleştirilen çalışmalar (devam)

Biyomürekkep / Hücre	Model	Yapılan Çalışma	Kaynak
Alginat Jelatin Kollajen (İnsan Korneal Epitel Hücre)	Kornea	3BB prosesi ile korneal hücrelerini barındıran kompozit biyomürekkeplerin biyobasımı gerçekleştirilmiş ve kontrol edilebilir degradasyon özelliklerine sahip yapılar elde edilip detaylı incelemelere tabi tutulmuştur.	Wu vd. 2016
Alginat Selüloz (Fare NIH/3T3 Fibroblast)	Karaciğer	Alginat ve Selüloz nanokristalleri ile karaciğeri taklit eden bir model oluşturulmuştur ve 3 gün boyunca kültüre edilmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.	Wu Vd. 2018
Jelatin Kollajen PCL (İnsan HEPG2 ve İnsan umbilikal ven endotel hücreleri)	Karaciğer	6 güne kadar albümin ve üre sentezi gibi temel hepatik fonksiyonlara sahip bir çipte-karaciğer sistemi üretmek için 3BB kullanılmıştır.	Lee Vd. 2016
Hyalüronik Asit Jelatin Fibrinojen (İnsan Primer Kas Progenitör Hücreler)	İskelet Kası	3BB ile implante edilebilir iskelet kası modeli geliştirilmiştir. Elde edilen yapı, canlı, yoğun şekilde paketlenmiş ve yönlendirilmiş fiber benzeri yapılardan oluşan oldukça organize çok katmanlı bir kas demeti oluşturmuştur.	Kim Vd. 2018

2.7 Periodonsiyum Yapısı

Periodonsiyum, alveol kemiği ve kökü kaplayan sementten oluşan sert doku ile periodontal ligament ve gingivadan oluşan yumuşak dokudan meydana gelen bölgedir. Periodonsiyum incelendiğinde, altta kısmında bağ doku ve onun üzerinde çok katlı yassı epitel dokudan oluşan gingivanın, keratinize olmuş epitelle kaplı fibröz bir doku olduğu ve altta yatan kemiğe sıkıca tutunduğu görülmektedir (**Şekil 2.7**) (Edwards vd. 2010). Apikale yerleşmiş, serbest alveol mukozası ile bağlantılı yapıdadır. Sınırları belirgin olan bu iki doku tipinin oluşturduğu hatta mukogingival hat adı verilmektedir (Carranza vd. 2003).



Şekil 2.7 Peridonsiyumun yapısı (Carranza, 2003)

Gingiva dokusu içeriğinde bulunan kollajen fibriller, serbest gingivanın diş etrafında sıkı bir şekilde konumlanmasını sağlamaktadır. Bunun yanında üst ve alt alveolar arter uzantıları gingiva bağ dokusunu beslemekte görev alırlar. Gingiva dokusu; serbest, yapışık, interdental ve gingiva oluğu olmak üzere dört bölüme ayrılabilir. Periodonsiyumu oluşturan diğer bir yumuşak doku olan periodontal ligament, vasküler ve nöral bileşenleri içeren destekleyici, bağlantısal ve proprioseptif duyuşal işlev gösteren fibröz bir bağ dokudur. En önemli fonksiyonu, dişlere uygulanan her tipte kuvveti absorbe ederek alveol kemiğine iletmektir. Başlıca Tip-1 Kollajen fibrillerden oluşan periodontal ligament, diş köklerinin alveol kemiğine bağlanmasından sorumludur (İnanç vd. 2007). Paralel dizilişli kollajen fibriller bir araya gelerek kollajen lifleri oluştururken, kollajen

liflerin bir araya gelmesi sonucu sement ile alveol kemiği arasında uzanan kollajen demetler (Sharpey'in Fiberleri) oluşmaktadır (Jiang vd. 2015). Sement, diş kök yüzeyini çevreleyen periodontal ligament içeriğinde bulunan kollajen fibrillerin kök yüzeyine bağlanmasını sağlayan kalsifiye dokudur.

Kollajen fibrillerce zengin olan periodontal ligament, fibröz yapısının yanında yüksek oranda hücresel içeriktedir. Periodontal ligament bağ dokusu hem fibroblastik hem de mineralize dokuyu oluşturan öncül hücreleri içermektedir. Hücresel yapısı incelendiğinde, temelde kemik tarafında osteoblastlar ve osteoklastlar, gövde kısmında başlıca periodontal fibroblastlar olmak üzere epitel hücreler, farklılaşmamış mezenkimal hücreler, nöral bileşenler, endotel hücreler ve inflamatuvar hücreler, kök yüzeyinde ise sementoblastların olduğu görülmektedir.

Periodontal ligamentin hücre içeriğinin %50-60'ını oluşturan periodontal ligament kaynaklı fibroblastlar (PDLF), periodontal ligament fiberlerini oluşturan kollajenin sentezinden ve glikozaminoglikanlar gibi diğer HDM bileşenlerinin rejenerasyonu ve yeniden modellenmesinden sorumludur. PDLF'ler ayrıca, alveolar kemik ve sementin yeniden modellenmesinde etkili olan osteoblast ve sementoblastlara kaynak sağlamaktadır (Basdra ve Komposch 1997). Bunun yanında doku yıkımı ve kemik rezorpsiyonunu uyaran sitokinler de PDLF'lar tarafından üretilmektedir. Nitekim, PDLF'lar periodontal yenilenme sırasında salgılanan bu faktörleri kontrol altında tutarak yara iyileşmesinin düzenlenmesinde ve yönlendirilmesinde büyük öneme sahiptir (Terranova vd. 1993, Dabra vd. 2013).

Periodontal doku mikroçevresinin diğer önemli bölümü olan alveolar proses; maksilla ve mandibular kemikte diş soketi oluşturan kemik yapıdır. Alveolar proses temelde alveol, trabeküler ve kompakt kemik olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Diş köklerinin yerleştiği boşluklar olan alveolleri çevreleyen ve periodontal ligament liflerine yapışım yeri teşkil eden kemiğe de alveol kemiği adı verilmektedir. Alveol kemiği diş kaybı olduğunda ortadan kalkmaktadır (Sodek 2000). Kemiğin dış yüzeyi periost adı verilen bağ doku katmanı ile kaplıdır. Periost tabakası, osteoblastlar başta olmak üzere kök ve

progenitor hücreler, fibroblastlar ve vasküler-sinir dokusunu içeren bir dokudur. Kemiğin iç katmanını da osteoblastları içeren ve bağ dokudan oluşan endosteum ile ayrılmaktadır. Osteoblastlar, kalsiyum ve fosfat ile mineralize olan kemik matriksini oluşturmak üzere kollajen, glikoprotein ve proteoglikan üretmekle birlikte, yüksek oranda alkalen fosfataz (ALP) aktivitesine sahiptirler. Kemik dokusu, gelişim sırasında temelde osteoblastlar tarafından oluşturulmakta (modellenme) ve karmaşık osteoblast/osteoklast ilişkisi ile hayat boyunca yeniden modellenmektedir. Bu denli önemli ve kompleks yapıya sahip olan periodontal doku, yaşam süresince birçok hastalık ve hasara maruz kalmakta ve buna bağlı olarak yapısal bütünlüğü bozulabilmektedir.

2.8 Periodontal Hastalıklar

Periodontal hastalıklar çok etmenli etiyolojiye sahip hastalıkların bir bütünüdür. Dişeti dokusu üzerinde, dişeti kenarında ve diş-dişeti bileşkesinin altında yerleşen patojen mikroorganizmaların sebep olduğu enfektif hastalıklar, hastanın taşıdığı kronik hastalıkların ve agresif gelişim gösteren koşulların da eklenmesiyle periodontal enflamasyona yol açar. İlerleyen periodontit, diş destek dokusunun kaybına, periodontal ceplerin derinleşmesine, dişlerde tutunma kaybına ve ileri vadede dişlerin kaybedilmesine yol açar. Bu hastalıklara yönelik tedavi planı oluşturulurken, sağlıklı periodontal koşulların oluşturulması ve sürdürülmesi amacıyla öncelikle non-invaziv seçenekler ve gerekli durumda invaziv (cerrahi) yöntemler bir arada kullanılabilir. Cerrahi olmayan tedaviler, ağız bakımı planı, diş yüzeyi ve kök yüzeyi temizliği yaklaşımlarını içermektedir. Periodontal enfeksiyon lokal nitelikli olduğundan, tedavilerin ana hedefi bakteriyel oluşumun mekanik olarak uzaklaştırılması ve ulaşılamayan periodontal bölgelerdeki patojenik organizmalar ile mücadele amacıyla lokal ve sistemik antibiyotik uygulaması yer almaktadır.

Periodontal hastalıklar, rehber sınıflandırma çalışmaları ve yayınlanan güncellemeler doğrultusunda tanımlanmakta olup, bu sınıflandırmalarda geniş yer tutan dişeti hastalıkları iki gruba ayrılmıştır;

- Dental plak kökenli olan dişeti hastalıkları, ergenlik, gebelik ve menstrual siklus gibi endokrin etkenlerle bağlantılı gelişen sistemik dişeti hastalıkları veya kan hastalıklarından köken alan dişeti hastalıkları, ilaç kullanımı ile gelişen dişeti hastalıkları ve yetersiz beslenme ile gelişen dişeti hastalıkları.
- Dental plak kökenli olmayan dişeti hastalıkları ise genetik kökenli veya travmaya bağlı dişeti hastalıkları ayrı tutulduğunda, bakteriyel, viral ve mantar kökenli dişeti hastalıklarından kaynaklanmaktadır.

Bahsi geçen dişeti hastalıklarına ek olarak, gelişimsel ve edinilmiş deformiteler, nekrotizan periodontal hastalıklar ve periodont abseleri periodontal hastalıkların diğer farklı etiyojilerini teşkil eder. Periodontal hastalıkların kardiyovasküler komplikasyonlar, romatoid artirit ve gebelikte olumsuz etkiler başta olmak üzere sistemik hastalıklara da sebep olduğu bilinmektedir (Armitage, 1999).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 verilerine bakarak ağız hastalıklarının tedavisinde yapılan harcama dünya genelindeki sağlık harcamalarının % 4,6'sını oluşturmaktadır. Bu harcamalara ek olarak diş çürükleri, periodontit ve diş kayıpları sebebiyle yaşanan iş gücü kayıplarının teşkil ettiği diş hastalıklarının dolaylı maliyetleri yaklaşık 144 milyar dolar ek kayıp oluşturmuştur. Ağız hastalıklarının doğrudan ve dolaylı maliyetinin yaklaşık 442 milyar dolar düzeyinde olduğu hesaplanmıştır. Bu devasa maliyet göz önüne alındığında, mevcut hastalıkların önlenmesine, tedavisine, yeni ve düşük maliyetli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine duyulan ihtiyaç açıktır (Listl vd. 2015). Periodontal hastalıkların dünya genelinde sağlık sistemlerine ve ekonomilere getirdiği yük, sosyal ve tıbbi etmenlerin etkisiyle şekillenmektedir. Bu hastalıkların oluşumunda, oral hijyen yetersizliğinin yanı sıra önemli risk faktörleri arasında diyabet, tütün ürünleri kullanımı, besin yetersizliği, aşırı alkol tüketimi ve stres sayılmaktadır. Periodontal diş hastalıkları ve diş kaybı açısından önemli bir risk faktörü olan diabetes mellitus hastalığına ilişkin 2012 yılı bulgularına göre dünya genelinde 285 milyon hasta bulunmakta ve bu sayının 2030 yılında %50 düzeyinde artması beklenmektedir (Pellegrini vd. 2009, Petersen vd. 2012, Kantarci vd. 2015).

2.9 Yenileyici Tıp Temelli Periodontit Tedavi Seçenekleri

Alveolar kemik sürekli bir yeniden modelleme sürecindedir. Kemik doku yıkımı ve oluşumu arasında, farklı hücre tipleri ve sinyal mekanizmaları tarafından sürdürülen bu denge, eğilimi olan bireylerde bakteri aktivitesine bağlı olarak periodontit sürecinin gelişimine sebep olabilir. Bu süreçte diş çevresindeki bağ ve kemik dokusu kayba uğrarken, bağlantı epitelinin çekilmesi gözlemlenebilir. Bazı vakalarda geleneksel yöntemlerle sub-gingival biyofilm tabakasının temizlenmesi ve enflamasyonun giderilmesi sonrasında periodontun yapısal kaybı ve alveolar kemikte kalıcı hasar olması ve dişin çekilmesini gerektirebilir. İleri aşamada çiğneme fonksiyonunun yitirilmesi ve estetik gerekçelerle implant uygulaması yapılabilmektedir. Bu amaçla farklı kök ve progenitor hücreler veya bunlardan farklılaştırılmış hücre tipleri onarımsal tedaviler geliştirmek amacıyla dünya genelinde çalışılmaktadır (İnanç vd. 2009a, Elçin vd. 2010). Doku mühendisliği ve onarımsal tıp yaklaşımları ile hücrelerarası matriks, hücre ve doku kaybının biyomalzemeler ve/veya rejeneratif hücreler kullanılarak telafi edilmesi ve doku işlevinin yeniden kazanılması sağlanabilir (Elçin 2004). Yalnızca 2014 yılında ABD ilaç dairesi tarafından 28 doku mühendisliği ve onarımsal tıp yaklaşımının insanlarda kullanımı için onay verilmiştir. Bu tedaviler, vücudun doğal iyileşme becerilerinin yetersiz kaldığı ileri seviyedeki doku kaybı durumlarında kullanılabildiğinden, periodontal ve peri-implant hastalıklarda önemli bir seçenek olarak görülebilir (İnanc vd. 2009b, İnanç ve Elçin 2011). Alveolar kemik yenilenmesinde hücre tedavisinin yanı sıra, farklı biyomalzemeler, büyüme faktörleri ve rekombinant proteinler çoğunlukla bir arada kullanılabilmektedir (Baykan vd. 2014, Larsson vd. 2016).

2.10 İleri Tedavilerin Geliştirilmesi

Periodontitin ileri tedavilerine yönelik olarak günümüzde yürütülen klinik-öncesi çalışmalarda hayvan modellerinden sıklıkla faydalanılmaktadır. Periodontit gelişimini taklit eden cep açma, ligasyon gibi fiziksel etkilerin yanı sıra, hedef bölgenin kimyasal ve bakteriyel ajanlara maruz bırakılarak periodontit geliştirilen hayvan modelleri üzerinde, plak oluşumu, enfeksiyon, enflamasyon, gingiva tabakasının zarar görmesi, alveolar

kemik kaybı gibi periodontite özgü belirtiler vb. çalışılabilmektedir. Ancak, diş bileşimi ve gingiva yapısının farklılığı, türe özgü histolojik nitelikler, beslenme farklılıkları, metabolizma hızı, doğal rejenerasyon kapasitesi ve doğal ağız florasının niteliği gibi önemli unsurlar bakımından hayvan modelleri, insan ağız, diş ve periodont fizyolojisinden farklılıklara sahip olduğundan verimlilikleri tartışmalıdır. Bu farklılıklar çeşitli tedavi yöntem ve etkenlerinin insan tedavilerine translasyonunda kritik sorunlara yol açabilmektedir.

Büyük hayvan modeli seçenekleri arasında primat, minyatür domuz, köpek modelleri gelirken, gelincik, sıçan ve fare modelleri de insan periodontal hastalıkları ile benzerlik kurmak amacıyla kullanılabilmektedir. Primatlar ağız anatomisi, metabolizma ve biyokimyasal özellikler açısından insana en çok benzerlik gösteren model organizma olmakla beraber, bakım maliyetlerinin çok yüksek olması sebebiyle sık olarak kullanılamamaktadır. Minyatür domuz, periodontal hastalıkların gelişmesi açısından doğal olarak eğilimli bir tür olmasına karşın, primatlara benzer biçimde ideal bir deney hayvanı olarak görülememektedir. Alternatif olan köpek cinsleri arasında kalıtsal yatkınlıklardan dolayı önemli farklılıklar gözlenebilmekte ve yüksek bakım maliyeti ve etik zorluklardan dolayı ideal bir deney hayvanı olarak kullanımı giderek zorlaşmaktadır. Sıçanların kullanıldığı pre-klinik çalışmalarda molar bölgede insana benzeyen anatomik özelliklerden faydalanılarak model oluşturulmakta ve plak taşıyan sütür kullanarak yapılan ligasyon ile molar diş etrafındaki gingiva tabakasında periodontit oluşturulabilmektedir. Pirinç sıçanı modeli, diğer sıçan modellerine kıyasla farklı avantajlar içerebilmektedir. Buna karşın sıçanlarda koprofaji (dışkı yeme) davranışının varlığı bakteri florasını ve ortam pH'sını etkileyerek enfeksiyon ve periodontit tablosunun gelişimini etkileyebilmektedir. Fare modelleri arasında patojen taşımayan dişi BALB/c farelerinin kullanıldığı Baker modelinde bakteriyel inoskölasyon sonrasında alveolar kemik rezorpsiyonu incelenebilmektedir. *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* suşları kullanılarak oluşturulan bu modeller periodontit gelişimini ancak kısmen taklit edebilmektedir. Buna ek olarak, periodontit modeli kullanan çalışmalarda anlamlı sonuç verebilecek doku analizinin gerçekleştirilebilmesi çok büyük sayılarda denek kullanılmasını gerektirmektedir (Winkler vd. 1988, Pellegrini vd. 2009, Oz vd. 2011).

Bilinen bu dezavantaj ve sınırlamalar insan hücrelerinin kullanılabileceği, tekrarlanabilir, maliyet yönetimi yapılabilen ileri teknoloji ürünü hastalık modellemesi çözümlerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılabilecek bu yöntemler aynı zamanda etki mekanizmalarının incelenmesini kolaylaştırabilecek derecede yönlendirmeye açık olmalı ve fizyolojik etkilerin birbirinden ayrıştırılabilmesi amacıyla az sayıda hücrel ve hücreler-arası bileşenden oluşabilmelidir. Bu yöntemler mevcut tedavi geliştirme yaklaşımlarına alternatif olmalarının yanı sıra, mevcut in-vitro ve hayvan modelleri için tamamlayıcı olarak da görülebilir.

2.11 Mikroakışkan Çip Teknolojisine Dayalı Hastalık Modelleri

Periodontal hastalıkların gelişim mekanizmalarının ve yeni tedavi yöntemlerinin laboratuvar koşullarında çalışılmasını sağlayan yaklaşımlardan yukarıda bahsedilmiştir. Özetle, hayvan modellerinin, insan fizyolojik durumuyla önemli farklılıklar taşımaları, etik ve ekonomik sınırlamaları gibi dezavantajlar pre-klinik çalışmaların sayı ve kalitesini önemli derecede düşürmektedir. İn-vivo uygulamaların yerini alması umut edilen ve tedavi/ilaç geliştirme çalışmalarında farklı alanlarda FDA onayı ile kullanımına geçilen in-vitro temelli çalışmalar ise söz konusu periodontal doku veya diş gibi oldukça karmaşık yapıda olan farklı hücre tiplerini ve inorganik bileşenleri yapısında barındıran yapılar söz konusu olduğunda sınırlanmaktadır.

Periodontal doku dahil diğer geleneksel doku/organ in-vitro modelleri için de bilinen dezavantajların mikroakışkan çip teknolojileri ile aşılması mümkün görünmektedir. Mikroakışkan çip teknolojisi ile, birden çok doku tabakasını içeren karmaşık doğal yapılar olan kan-beyin bariyeri ve böbrek glomerül yapısı gibi insan hücreleri içeren modellerin geliştirilip, ilaç geliştirme süreçlerinde kullanımına başlanmıştır. Buna ek olarak, bu teknoloji kapsamında yer alan, çipte-vücut (body-on-a-chip) yaklaşımı ile bir organ ya da doku tipinde tedavi geliştirmek amacıyla denenen ilaç moleküllerinin metabolize edilmesi sonrasında farklı organ sistemleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi de artık bu teknolojinin gündemine girmiştir. Bu yaklaşım ile ilaç

adaylarının/moleküllerin sistemik toksisiteye yol açma durumları klinik deneme aşamasına gelmeden çok önce belirlenebilecektir. Bu da, Propoxyphene ve Sibutramine örneklerinde olduğu gibi, öngörülemeyen toksisiteden ötürü piyasadan geri çekme vakaları sonucu milyarlarca dolarlık kayıpların önüne geçilmesini sağlayacaktır. Mikroakışkan çip teknolojisi ile sağlıklı doku modellerinde yapılacak güvenlik analizinin yanı sıra, geliştirilen hastalık modelleri üzerinde yapılacak ilaç denemelerindeki etkinlik analizlerinde insan doku modelleri kullanılabilir. Bu sayede, klinik açıdan faydalı farmakokinetik ve farmakodinamik bulguların eldesinin yanı sıra, olumsuz etkilerin çok önceden tanınması, büyük finansal zararların ve hatta can kayıplarının önüne geçilmesi gibi belirgin avantajlar ortaya çıkmaktadır.

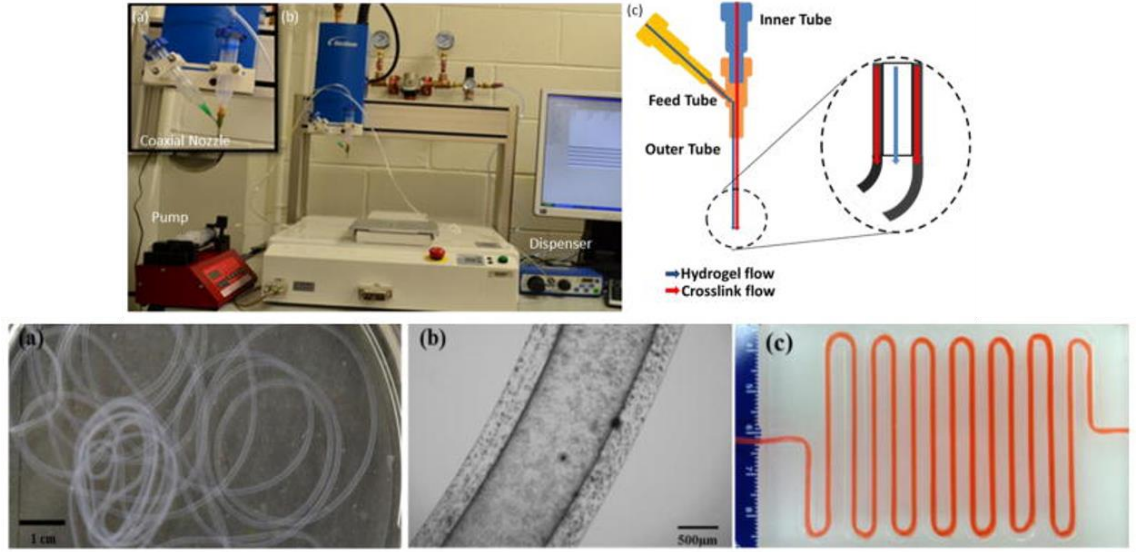
Doku-temelli mikroakışkan teknolojilerinin sağlık bilimleri alanındaki uygulamaları incelendiğinde; endotelize mikroakışkan devrelerle hematolojik hastalıkların çalışılması (Myers vd. 2012), soluk borusu ve nefes alabilen akciğer yapılarının oluşturulduğu entegre mikroakışkan yapılar (Huh vd. 2015, Sellgren vd. 2014), fonksiyonel kan-beyin bariyeri modelleri (Brown vd. 2015, Wang vd. 2017), işlevsel hipokampal sinir ağlarının, ALS ve ZIKA hastalıklarının çalışıldığı sinir sistemi modelleri (Robertson vd. 2014, Kunze vd. 2013, Qian vd. 2016), karaciğer fizyolojisinin, hastalıklarının ve ilaç güvenliğinin çalışıldığı modellerin yanı sıra mikroakışkan sistemlerle yapay karaciğer destek ünitelerinin geliştirilmesi (Hsu vd. 2010; Verneti vd. 2016), üreme sisteminin biyobenzer modellemesi (Eddie vd. 2014), anjiogenez, ateroskleroz ve damar tıkanıklığı süreçlerinin (Dominical vd. 2015, Kim vd. 2014, Verbridge vd. 2013), miyokard enfaktüsün onarımsal tedavisi amacıyla yaklaşım geliştirilmesi (Ong vd. 2015), gastrointestinal sistem ve mikrobiyom etkileşimi ve enfeksiyon modelleri (Yang vd. 2013, Shah vd. 2016) gibi çeşitli önemli organ ve dokuların ele alındığı görülmektedir. Öte yandan mevcut doku ve organ modelleri incelendiğinde, bu zamana kadar periodontal dokunun mikroakışkan çip sistemi yapılarında henüz ele alınmadığı görülmektedir. Güncel çalışmalarla periodontal doku ve diş modellemelerinin mikroakışkan platformlar ile hastalık modellemesinin farklı yaklaşımlarda kullanıldığı bazı örnekler arasında öne çıkan çalışmalar, gingiva epitelinin sub-gingival biyofilm tabakası ile etkileşimi (Belibasakis vd. 2015), rejeneratif tedaviler açısından önem taşıyan dişin embriyonal gelişim modelleri (Mammoto vd. 2011), diş innervasyonunun modellemesi (Pagella vd.

2014), biyofilm tabakasının multi-parametrik gelişim analizi (Lam vd. 2016) sayılabilir. Hayvan çalışmalarında incelenemeyen, insana-özü fizyolojik durumların simülasyonu, yüksek tekrarlanabilirlik, etkinliği ispatlanmış modellerin düşük maliyetli olması, sarf edilen kaynakların minimal düzeyde olması ve kritik değişkenlerin eş-zamanlı incelenmesine olanak vermesi açısından mikroakışkan doku modelleri, ağız ve diş hastalıklarının çalışılmasında yeni bir ufuk açabilecek potansiyele sahiptir.

2.12 Kaynak Özetleri

3B biyoyazıcı teknolojileri, önceden modellenmiş bir biçimde hücrelerin ve biyomürekkeplerin hassas bir şekilde biriktirilmesiyle çeşitli doku/organ taslakları ya da loblarını elde etmek için otomatikleştirilmiş ve gelişmiş bir platform sağlayarak mevcut doku mühendisliği yaklaşımları ile ilişkili tutarsızlıkları ortadan kaldırmaktadır. Bununla birlikte, kullanılan biyomürekkeplerin çeşitliliği ve kullanılan hücrelerin canlılığı, kontrollü dağılımı ve dokularda oluşturulmak istenen vasküler ağ gibi 3B iskelelerin gelişimi ile ilgili bazı kısıtlamalar, kompleks biyolojik yapıların biyobasımını engellemektedir. Bu gibi engel durumlara rağmen 3BB sistemleri ile doku mühendisliği alanlarındaki başarılı çalışmalar dikkat çekmektedir.

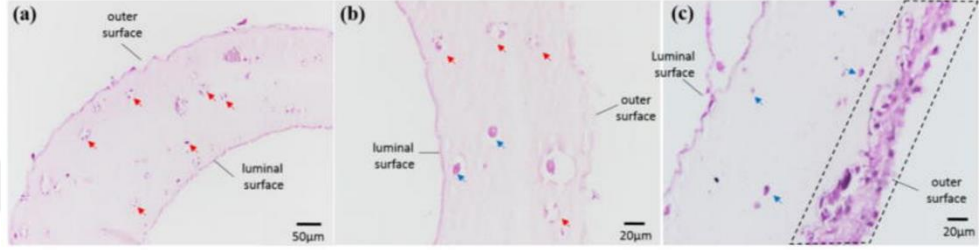
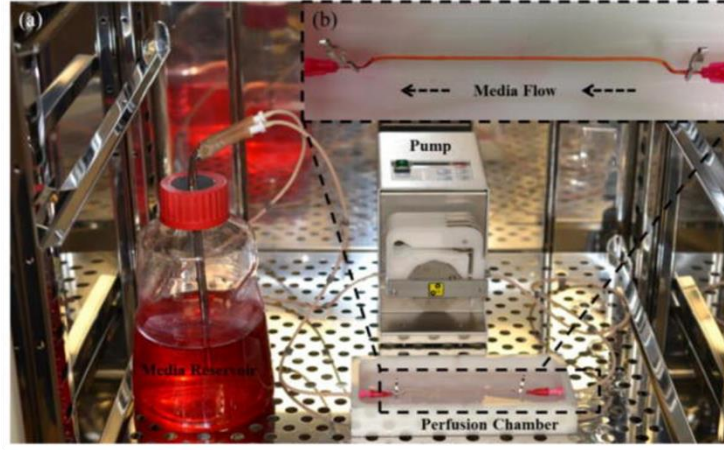
Dolati ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada insan ven dokusu modeline yönelik olarak 3B biyobasım ile yaklaşık 80 cm uzunluğunda ve 150-1000 mikron aralığında iç çap uzunluğuna sahip ven yazdırılabilmektedir. Kullanılan sistem ve elde edilen 3B yapıların görüntüleri **şekil 2.8**'de sunulmuştur. Biyomürekkep olarak alginatın kullanıldığı bu çalışmada çok-duvarlı karbon nanotüpler ile beraber insan koroner arter düz kas hücresi kullanılmıştır.



Şekil 2.8 Çalışmada kullanılan 3B biyobasım sistemi ve oluşturulan iskelenin makroskobik ve mikroskobik görüntüleri

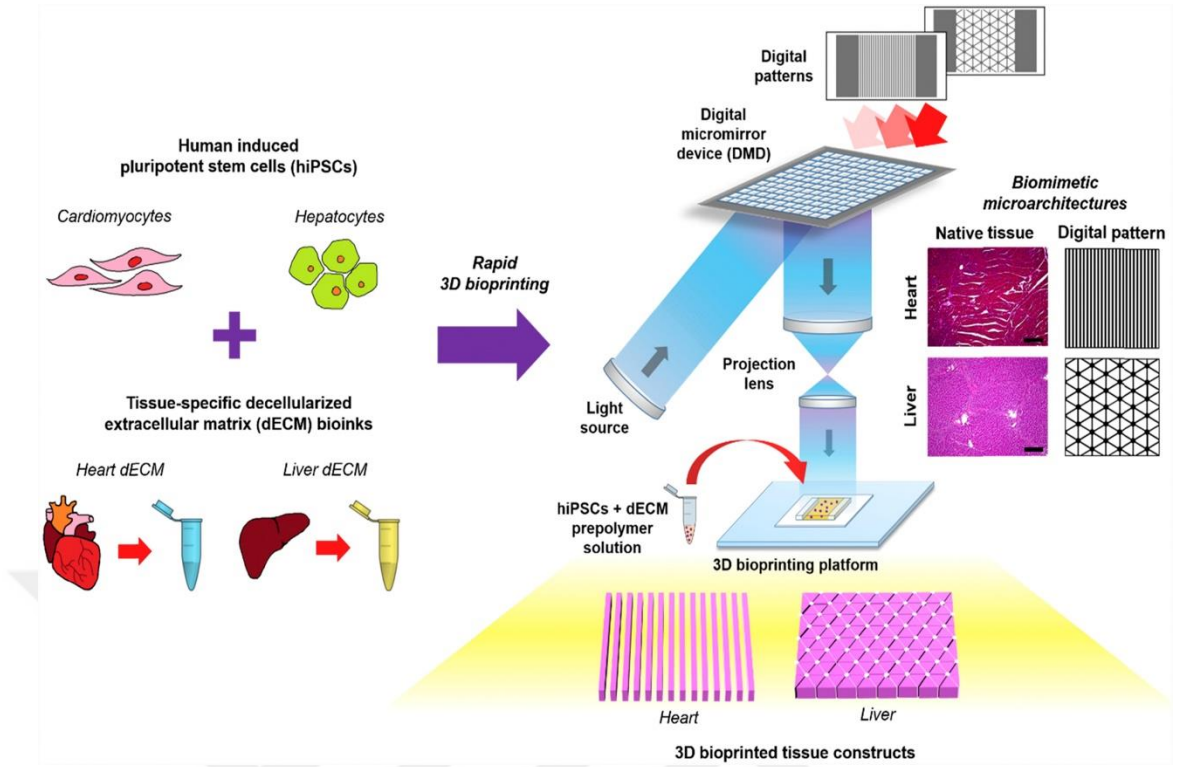
Elde edilen 3B yapıların uzama ve difüzyon hızları incelenmiş, bununla birlikte kullanılan çok-duvarlı karbon nanotüplerin hücre canlılığı, matriks birikimi ve doku oluşum süreci üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen 3B ven dokusu gerekli perfüzyon testlerine tabi tutulduğunda dakikada 8,2 mikrolitre akış hızına ulaşılabilmektedir. Ayrıca biyomürekkep ile birlikte kullanılan karbon nanotüplerin elde edilen 3B doku modelinde elastikiyet modülünü %94, çekme gerilimini %11 oranında arttırdığı görülmüştür.

3BB işleminin akabindeki 3 günde hücre canlılık oranı %70 olarak bulunmuş, bir hafta içerisinde de %90'ın üzerindeki canlılık değerlerine ulaşılmıştır. Histokimyasal analiz sonuçlarına göre de elde edilen 3B ven duvarının iç yüzeyinde belirgin bir matriks oluşumu gözlenmiş ve kullanılan hücrelerin bu ortamdaki çoğalmalarını akışa göre düzenledikleri belirlenmiştir (Dolati vd. 2014).



Şekil 2.9 Çalışmada kullanılan perfüzyon sistemi ve histokimyasal analiz bulguları

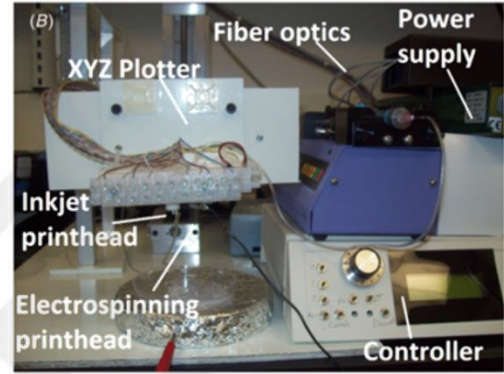
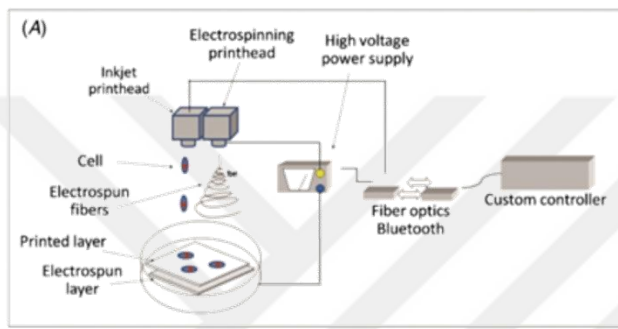
2019 yılında Yu ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada deselülerize HDM kaynaklı biyomürekkep, Jel-MA biyomürekkebi, kardiyomiyosit ve hepatosit hücreleri kullanılarak kalp ve karaciğer dokularını taklit edebilecek doku yapıları inşaa edilmiştir. Çalışma kapsamında Yorkshire domuzlarından alınan kalp ve karaciğer dokuları kullanılmıştır. Bu dokular deselülerize edildikten sonra Jel-MA biyomürekkebi ile karıştırılmış, kompozit bir biyomürekkep elde edilmiştir. Sonrasında hücreler ile karıştırılan bu biyomürekkep ile 3BB işlemleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.10). Çalışma kapsamında geliştirilen kompozit biyomürekkep foto-çapraz bağlanabilir özelliktedir ve radikalik fotobaşlatıcı olarak LAP (Lityum fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat) kullanılmıştır. Sonrasında 3B doku yapılarının detaylı karakterizasyonları yapılmış, dokuları taklit edebilme yetenekleri ve kültür sürecindeki davranışları incelenmiştir.



Şekil 2.10 Çalışmada gerçekleştirilen kalp ve karaciğer doku yapılarının üretiminin şematik gösterimi

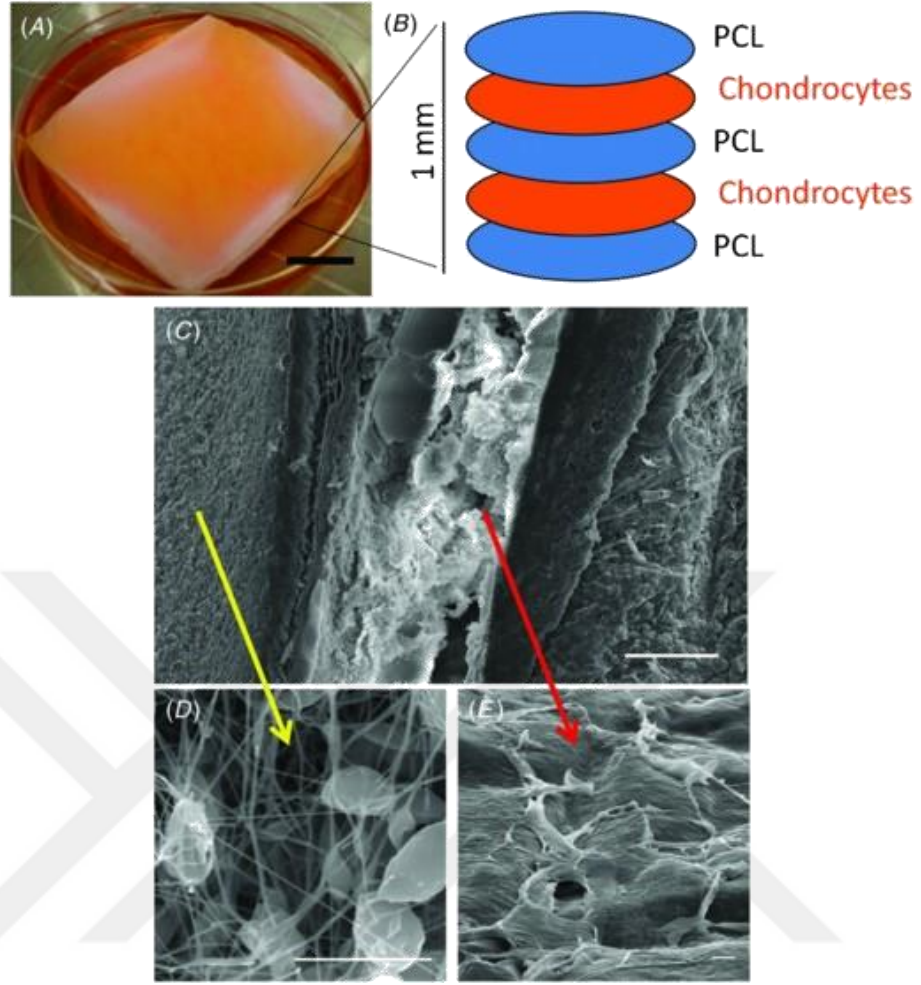
Çalışmanın sonucunda elde edilen verilerde, geliştirilen kompozit biyomürekkebin kullanılan hücreler için oldukça uygun bir ortam oluşturduğu, 7 günlük kültür sürecinde bu hücrelerin canlılıklarını koruduğu ve olgunlaşabildikleri, ayrıca 3B karaciğer ve kalp doku yapılarının uzun süre mimarilerini koruduğu belirtilmiştir. Bunların yanında ekip, geliştirilen bu biyomürekkep ve doku modellerinin, potansiyel fizyolojik olarak ilgili insan dokusu platformları olarak hizmet edebileceğini ve araştırmacılara biyolojik hastalık mekanizmalarını incelemek, kişiselleştirilmiş tıp geliştirmek ve tanısal ilaç tarama uygulamaları için yeni bir alan sunabileceğini düşünmektedir.

Xu ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada kıkırdak doku mühendisliği uygulamasına yönelik inkjet temelli 3B biyoyazıcı ile birlikte diğer iskele üretim tekniklerinden olan elektroğirme tekniği kullanılmıştır. 3B biyobasım ile kollajen biyomürekkebin basımı yapılırken, elektroğirme sistemi ile PCL polimeri nanofiber yapıda membranlar haline getirilmiştir. Bu yapıların birkaç kez üst üste getirilmesi ile oluşturulan doku taslakları çeşitli in-vitro, in-vivo, kimyasal ve mekanik analizlere tabi tutulmuştur.



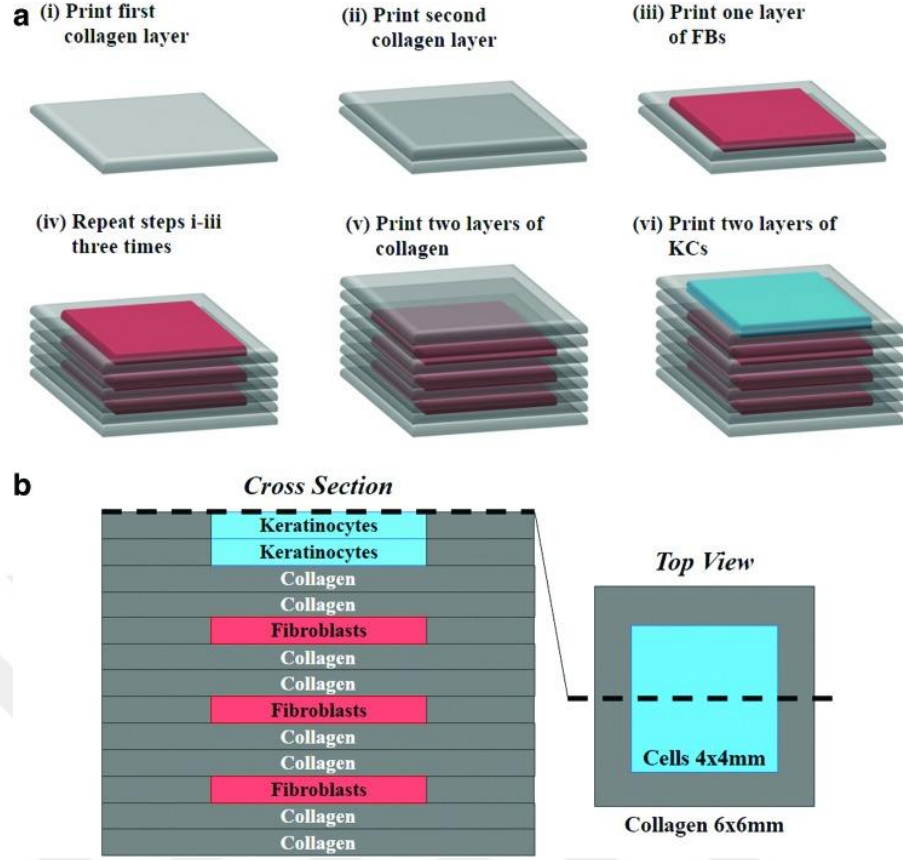
Şekil 2.11 Elektroğirme ve inkjet temelli 3B biyoyazıcıdan oluşan hibrit sistemin şematik gösterimi

Yapılan bu çalışma, elektrospinning ve inkjet temelli biyoyazıcıdan oluşan hibrit sistem ile oluşturulan 3B katmanlı kıkırdak yapıların detaylı karakterizasyonlarını içermektedir. Hibrit iskele, yalnızca inkjet temelli 3B biyoyazıcı kullanılarak oluşturulan yapıların geleneksel hidrojel yapılarına kıyasla gelişmiş mekanik özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Basımı yapılan kondrosit hücrelerin canlılıklarını sürdürdüğü ve hem in-vitro hem de in-vivo kıkırdağa özgü HDM ürettikleri görülmüştür (Xu vd. 2012). Bu çalışmada, hibrit elektrospinning / inkjet temelli 3B biyoyazıcı tekniğinin, karmaşık dokuların üretimini basitleştirebilecek ümit verici yeni bir teknoloji olduğu vurgulanmaktadır.



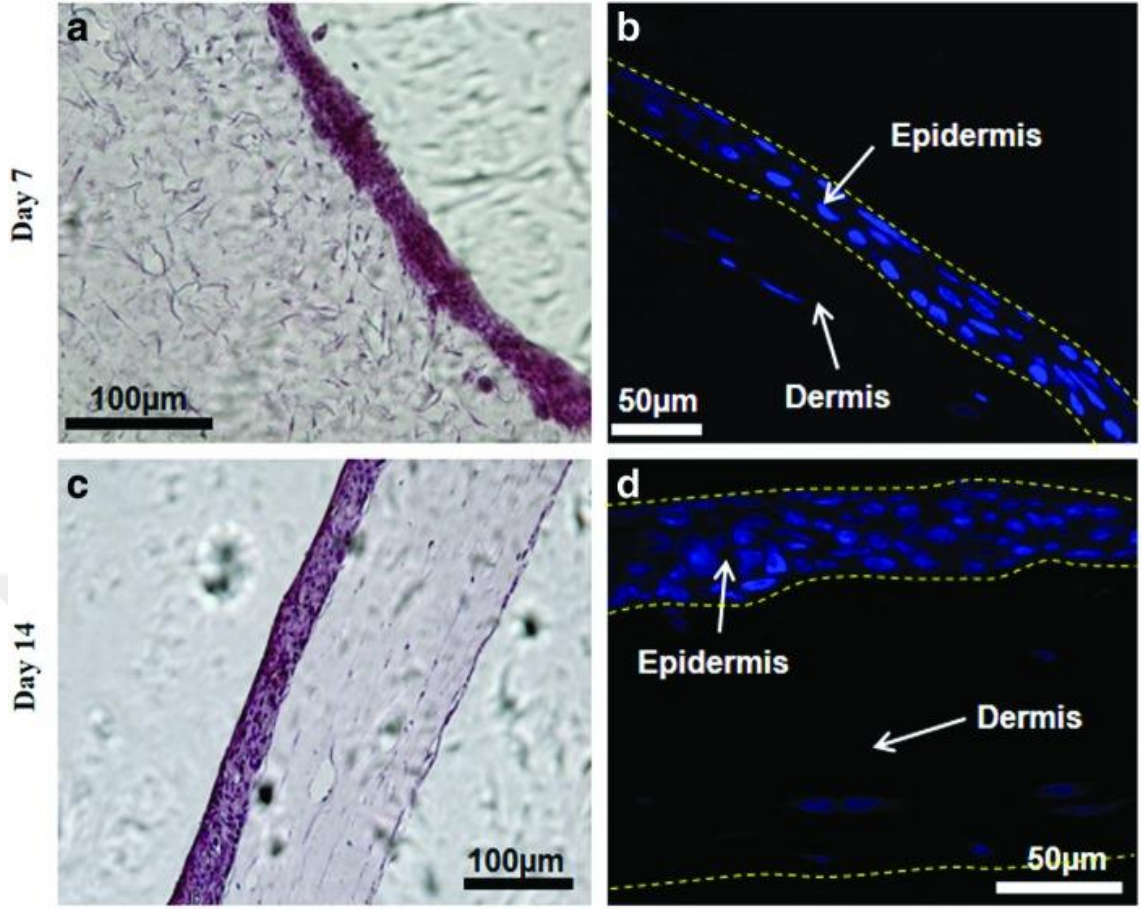
Şekil 2.12 Çalışmada üretilen 3B kıkırdak modelinin şematik gösterimi ve SEM görüntüleri

Yine doku mühendisliği yaklaşımı üzerine planlanan ve 3BB prosesi ile 2014 yılında gerçekleştirilen çalışmada, lokal olarak fonksiyon bozukluğu yaşanabilen deri dokusunun onarımına yönelik bir iskele üretilmiştir. Çalışmada biyomürekkep olarak doğal malzemelerden kollajen kullanılmıştır. Deri hücresinin onarımı yaklaşımı üzerine kurulduğundan fibroblast ve keratinosit hücreleri seçilmiştir. Birkaç katman halinde basılan doku modelinde hücresiz kollajen 6 mm’lik kenar ebatlarında, hücreli katman ise 4 mm’lik kenar ebatlarında basılmıştır. Elde edilen 3B doku iskelesinin yapısı **şekil 2.13’** de detaylı olarak belirtilmiştir.



Şekil 2.13 Çalışmada elde edilen 3B deri doku modelinin şematik gösterimi

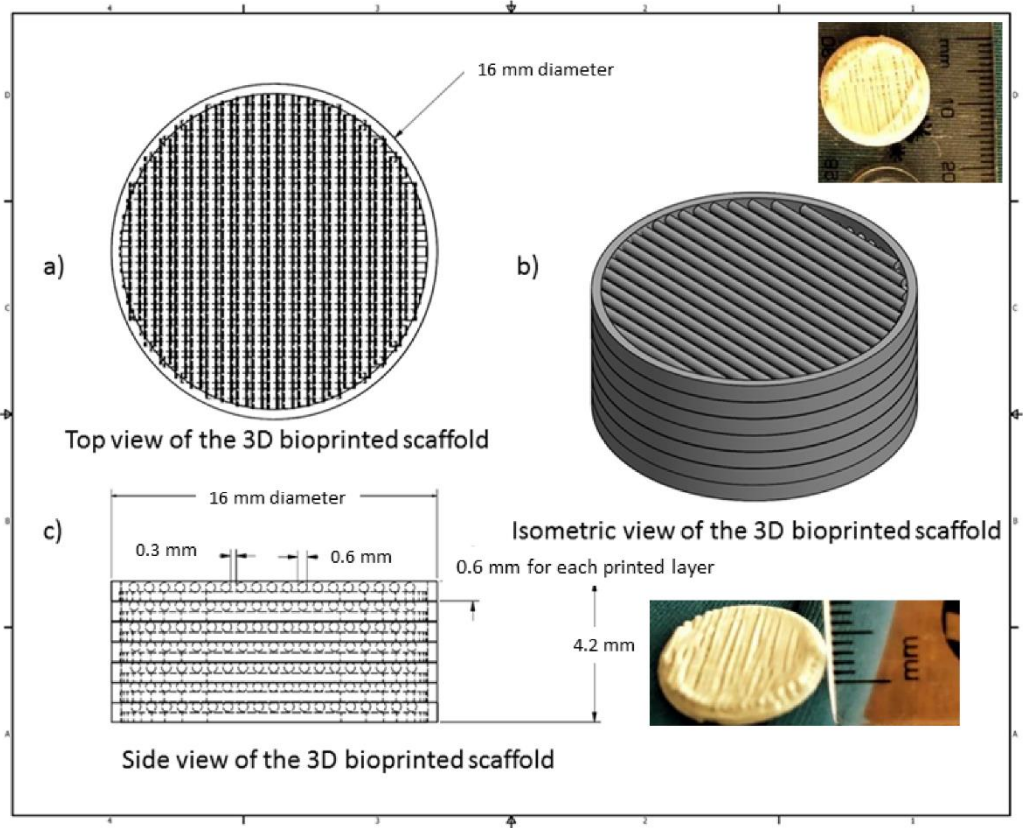
Çalışmanın sonunda hücre canlılığı, yoğunluğu, gibi özellikleri incelenen iskele ayrıca histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalara tabi tutulmuştur. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen H&E boyaması sonucunda elde edilen görüntüler **şekil 2.14**'de verilmektedir. Sonuç olarak çalışmada elde edilen çok katlı doku iskelesinin deri dokusunun iyileşme sürecini arttırabilecek biyouyumlu yapıda olduğu ortaya çıkmıştır (Lee vd. 2014).



Şekil 2.14 3B basımı yapılan deri modelinin histokimyasal boyama görüntüleri

Kemik doku mühendisliği uygulamasına yönelik olarak 2020 yılında yapılan çalışmada doğal insan kemiğini taklit edebilecek ve aynı zamanda ilaç salımı gerçekleştirebilecek kemik iskelesi tasarımı yapılmış ve 3BB prosesi ile üretimi gerçekleştirilmiştir. 3B kemik modeli üretimi için poli(propilen fumarat), PEG-PCL-PEG kopolimeri ve Pluronic (P-127) polimerleri kullanılmıştır. Ayrıca kemik rejenerasyonu ve onarım özelliklerini arttırmak amacıyla Simvastatin biyomürekkep bileşimine dahil edilmiştir.

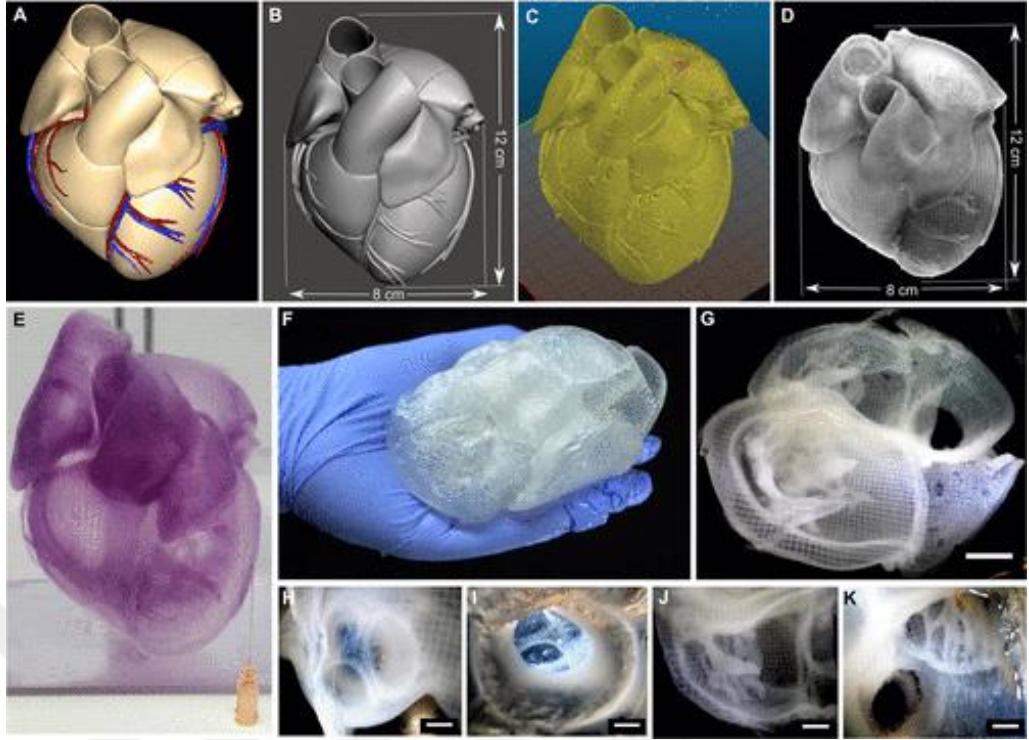
Silindirik implant olarak tasarımı yapılan ve üretilen 3B kemik doku taslağının kimyasal, morfolojik, mekanik ve in-vitro salım kinetikleri detaylı olarak karakterize edilmiştir. 3BB prosesi ile üretilen iskelelerin şematik gösterimi **şekil 2.15'** de verilmiştir.



Şekil 2.15 Çalışma kapsamında 3BB prosesi ile üretilen kemik doku iskelelerinin şematik ve makroskobik gösterimi

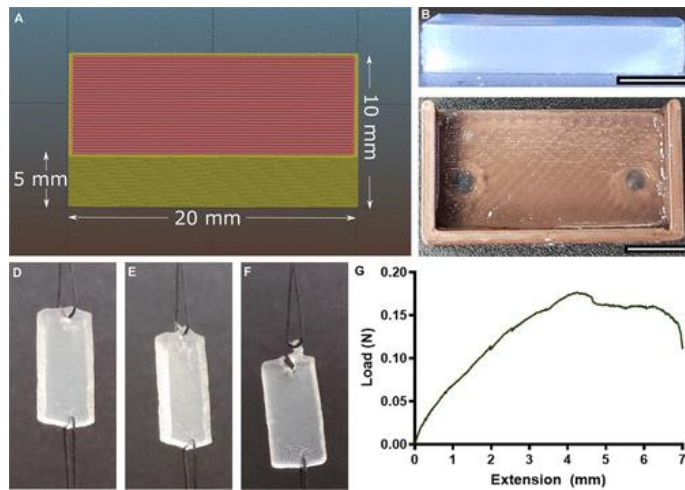
Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, 3BB ile üretilen kemik doku iskelesinin 20 gün boyunca sürekli ilaç salımı sergileyen kontrollü salım platformu olarak olumlu özellikler gösterdiği, ayrıca kemik rejenerasyonu için umut vaat edici özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Kondiah vd. 2020).

2020 yılında yapılan bir çalışmada 3BB ile insan kalp dokusu modeli geliştirilmiş ve çeşitli testlere tabi tutulmuştur. Bu çalışmada kalp dokusunun üretimi için alginat temelli bir biyomürekkep kullanılmıştır ve elde edilen 3B doku modeline yönelik olarak mekanik basma testleri ve cerrahi iplik tutma testleri gerçekleştirilmiştir.



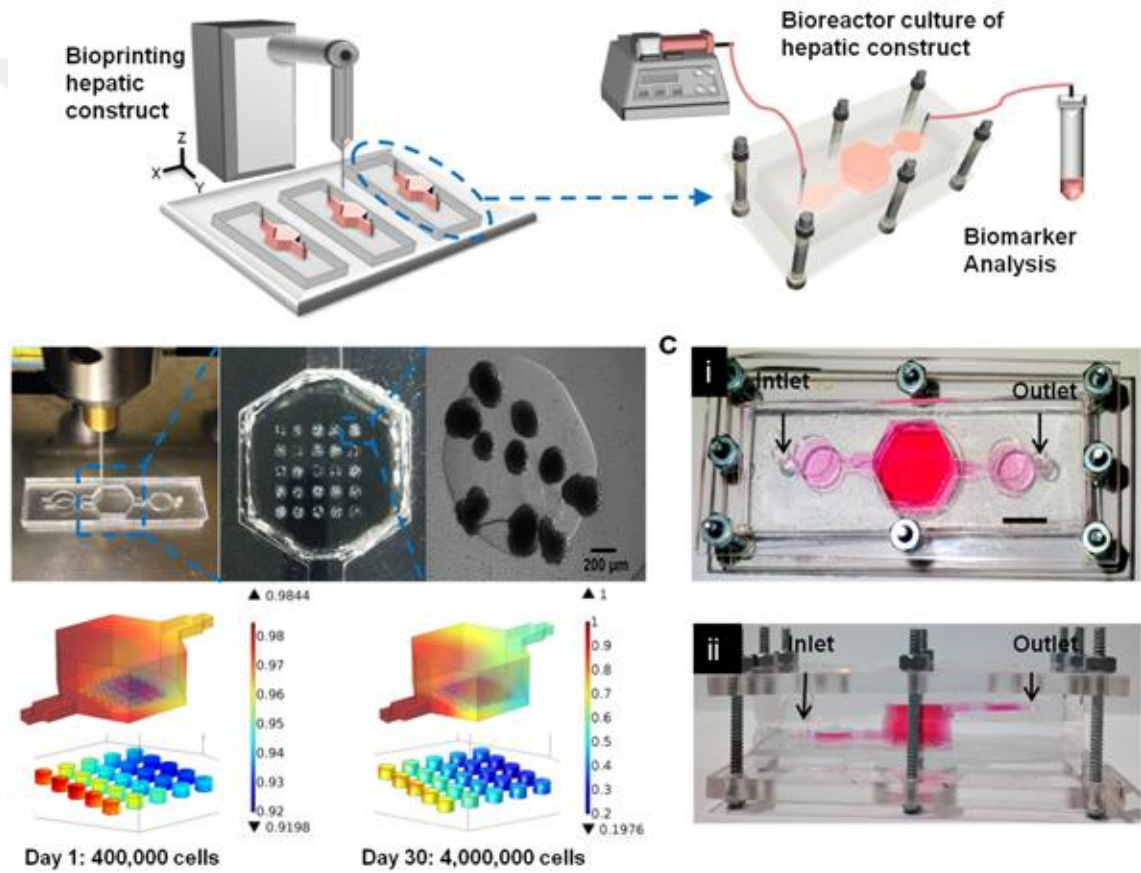
Şekil 2.16 Çalışmada alginat kullanılarak 3BB işlemi ile üretilen kalp doku modeli

Çalışmada üretimi tamamlanan modellerin mekanik olarak kalp dokusunun özelliklerinin taklit ettiği görülmüştür. Her ne kadar kardiyak bir model oluşturulsa bile diğer organ sistemlerinin total olarak 3BB ile üretilmesine katkı sağlayacağı belirtilmiştir. Ayrıca geliştirilen bu modelin cerrahi eğitim aracı olarak kullanılmaya oldukça ideal bir aday olduğu öngörülmüştür.



Şekil 2.17 Geliştirilen model üzerinde yapılan mekanik, cerrahi iplik tutma testlerine ait görüntüler

3B biyoyazıcı sistemleri doku mühendisliği alanında yaygın kullanılmaktadır ancak biyoalgılama ya da mikroakışkan çip sistemlerinde de günümüzde kullanımı oldukça artmış durumdadır. Bu alanda yapılan çalışmalara örnekler verilecek olursa; 2016 yılında yapılan bir çalışmada mikroakışkan çip içerisinde karaciğer dokusunun taslağı oluşturulmuştur ve ilaç etkileşimi incelenmiştir. Biyomürekkep olarak Jel-MA kullanılan bu çalışmada HepG2/C3A hücre hattı seçilmiştir. Asetaminofen isimli antibiyotik etkileşiminin incelendiği çalışmada kullanılan mikroakışkan çip ve üretilen doku taslağının özellikleri **şekil 2.18**' de gösterilmiştir.



Şekil 2.18 Çalışmada kullanılan mikroakışkan çip ve oluşturulan modelin görüntüleri

Çalışmada geliştirilen çipte-karaciğer platformunda hücrelerin 30 günlük kültür sürecinde canlılıklarını korudukları, Acetaminophen isimli antibiyotik etkileşimi sonucunda hayvan ve in-vitro modellerdekine benzer sonuçlar alındığı belirtilmiştir. Geliştirilen bu çipte-doku platformunun diğer dokular için de yüksek verimde ilaç taraması çalışmaları için önemli bir adım olabileceği vurgulanmıştır (Bhise vd. 2016).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan tüm deneysel çalışmalar ile ilgili detaylı bilgiler verilmektedir. İlk olarak tez süresince kullanılan kimyasal, biyolojik maddeler ve kullanılan cihazlar belirtilmiş, sonrasında ise tez ile ilgili yapılan tüm deney ve analizler detaylandırılmıştır.

3.1 Materyal

Bu tez çalışması kapsamında, jelatin temelli modifiye biyomürekkep sentezlenmesi aşamalarında kullanılan temel materyaller olan Jelatin (Tip A, 300 bloom) ve metakrilik anhidrit Sigma Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Sentez sonrasında saflaştırma için kullanılan ve diyaliz membran (MWCO: 12-14 kDa, Genişlik:43 mm) Sigma Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Jel-MA sentezinin tamamlanması sonrasında kompozit biyomürekkeplerin hazırlanması aşamalarında kullanılan nano ölçekte hidroksiapatit (HAp) Sigma Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmış, HAp kaplı manyetik nanoparçacıklar ise daha önce Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü Doku Mühendisliği, Biyomalzemeler ve Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı'nda (DMBNL) sentezlenmiş ve bu çalışma için DMBNL'dan temin edilmiştir. Ayrıca biyomürekkep hazırlama aşamalarında katkılanan fotobaşlatıcı 2-Hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiyofenon (Irgacure® 2959) yine Sigma Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Çalışmada 3BB ile oluşturulan perio/osteo mikro-doku modeli için kullanılan insan alveolar osteoblast hücre hattı ATCC (ABD) ve insan periodontal ligament fibroblast hücreleri Lonza (İsviçre) firmalarından temin edilmiştir. Bu hücrelerin kültürü aşamalarında kullanılan α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle-Alpha) ve DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) besiyerleri, penisilin-

streptomisin, L-glutamin, PBS (Phosphate Buffered Saline) ve fetal sığır serumu (FBS) Biological Industries (İsrail) firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında rutin olarak kullanılan steril kültür kapları, steril pipet uçları, serolojik pipetler Corning (ABD) firmasından satın alınmıştır. Hücre kültürü çalışmaları Labconco (ABD) laminar akışlı kabin ve Thermo Scientific Heracell 150i marka - modelli inkübatör içerisinde gerçekleştirilmiştir.

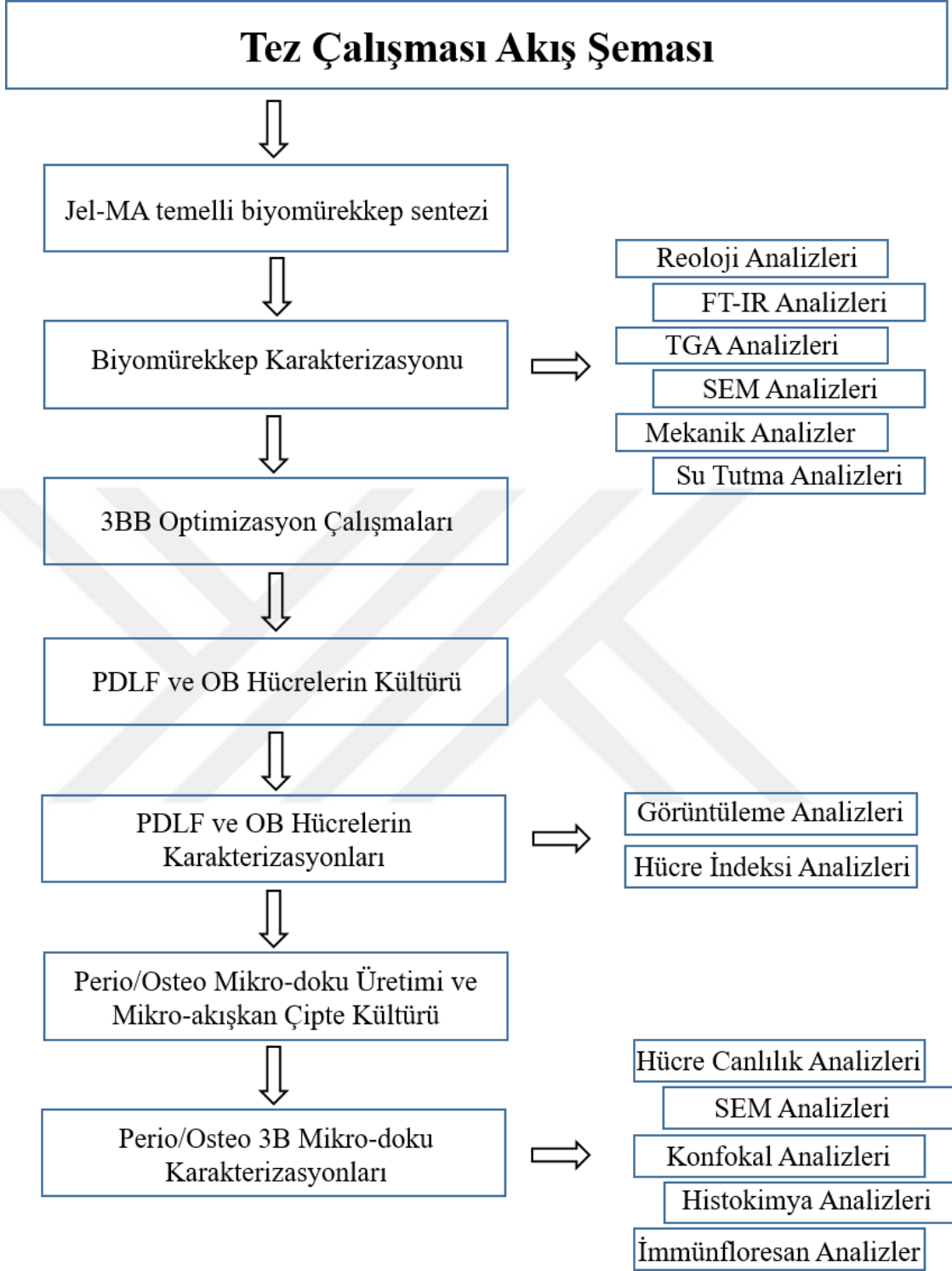
Kültüre edilen hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin belirlenmesi için eş-zamanlı hücre analiz sistemi Agilent xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (ABD) sistemi kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında hücre sayımı için tripan mavisi temeline dayanan hücre sayım cihazı Bio-Rad, TC20 (ABD) kullanılmıştır. Kültür sonrası istenen sayıdaki hücrelerin süspansiyonu ile hazırlanan biyomürekkebin homojen olarak karıştırılması için CellInk, Cellmixer (İsveç) aparatı kullanılmıştır ve doğrudan 3mL hacimli CellInk kartuşa doldurulmuştur.

3BB işlemleri CellInk Inkredible+ (İsveç) marka modelli mikroekstrüzyon temelli üç-boyutlu biyoyazıcı ile gerçekleştirilmiştir. Hücreli biyomürekkeplerin 3BB işlemlerinin tamamı cihaz laminar akışlı kabin içerisine yerleştirilerek gerçekleştirilmiştir.

3BB işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen üç-boyutlu perio/osteo mikro-doku yapılarının hücre canlılık ve proliferasyon analizleri Thermo Fisher Scientific alamarBlue® (ABD) analiz kiti ile yapılmış, spektrofotometrik ölçümler ise Molecular Devices SpectraMax M5 (ABD) mikropilaka okuyucu ile gerçekleştirilmiştir.

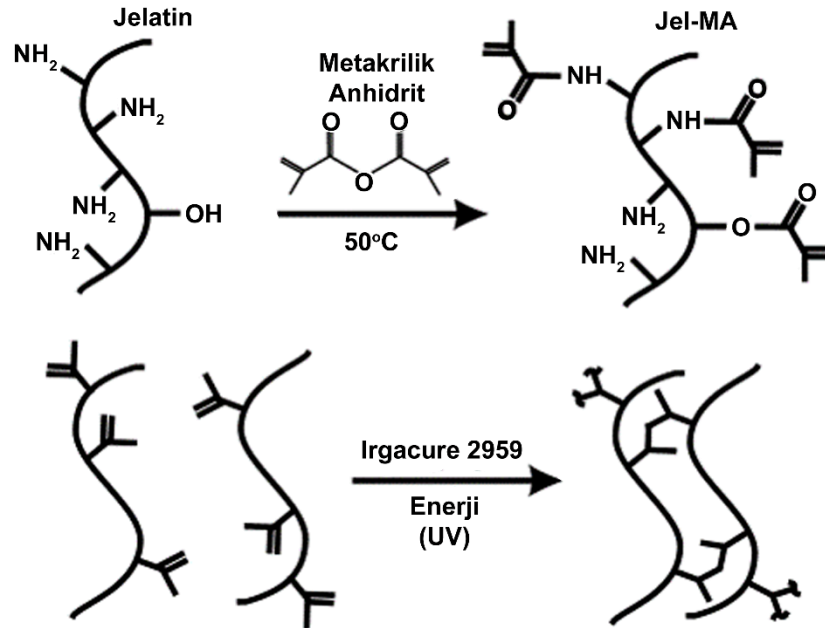
Histokimyasal analizler için örnekler %2,5 glutaraldehit (Sigma Aldrich) solüsyonunda tespit edilmiştir. Örneklerin dondurma işlemi için Tissue-Tek (Hollanda) dondurma



Şekil 3.1 Tez çalışması kapsamında yapılan sentez, optimizasyon ve karakterizasyon aşamaları

3.2.1 Jel-MA sentezi

Tez çalışması kapsamında biyomürekkep olarak kullanılan Jel-MA sentezi için toz formundaki jelatin tip A, 60°C sıcaklıktaki PBS tamponu içerisinde %10 (w:v) oranında tamamen çözülmüştür. Ardından sıcaklığı 50°C'ye düşürülen çözeltinin içerisine metakrilik anhidrit 1mL/dakika hız ile ilave edilerek reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır (**Şekil 3.2**). Toplamda 8 mL ilave edilen metakrilik anhidrit ile jelatin yaklaşık 2 saat boyunca hızlı şekilde karıştırılarak reaksiyonun yüksek verim ile devam etmesi sağlanmıştır. Bu işlemin sonrasında reaksiyonu durdurma amacı ile toplam çözelti hacminin 4 katı hacimde 40°C sıcaklıktaki PBS tamponu reaksiyon çözeltisine eklenmiştir. Elde edilen nihai çözelti diyaliz membranlarına (12-14 kDa) doldurulup yaklaşık 7 gün boyunca 40°C'de distile su dış tamponu ile diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem boyunca her gün 2 kez distile su dış tamponu değiştirilmiştir. Diyaliz ile saflaştırılan ve reaksiyona girmemiş olan içeriklerden arındırılan çözelti petri kaplarına doldurulmuş, -80°C'de dondurulup yaklaşık 7 gün boyunca liyofilizatör yardımı ile kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen kuru formdaki Jel-MA daha sonra gerçekleştirilecek optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları için -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2 Jel-MA sentezi ve fotobaşlatıcı (Irgacure 2959) ile çapraz bağlanması

3.2.2 Kompozit Biyomürekkebin hazırlanması

Sentezlenen kuru formdaki Jel-MA ile yazdırılabilir ve çapraz bağlanabilir jel oluşturma amacı ile farklı konsantrasyonlarda Jel-MA çözeltileri hazırlanmıştır. İlk etapta %18, %15, %12,5, %10 ve %5 konsantrasyonlarındaki çözeltiler hazırlanıp 3B biyoyazıcı kartuşlarına doldurulmuştur. Planlanan 3B model ve şartlarda hücresiz basımları denenilen çözeltilerden %18, %10 ve %5 konsantrasyonlarındaki çözeltilerin basımı sahip oldukları viskozitelerden ve çözünme esnasındaki problemlerden ötürü gerçekleştirilememiş olup optimizasyon çalışmalarına %15 ve %12,5'luk Jel-MA çözeltileri ile devam edilmesi gereği ortaya çıkmıştır. Bu 2 farklı konsantrasyon arasında yazdırılabilirlik açısından gözle görülür farklar tespit edilememesinden ötürü tez çalışmasının devam eden kısımlarının %12,5 konsantrasyonundaki Jel-MA ile yapılmasına karar verilmiştir.

Hazırlanan biyomürekkeplerin ileriki hücreli çalışmalarda kullanılmaya uygun hale getirilmesi amacıyla sterilizasyon işlemi 0,20 µm por büyüklüğüne sahip şırınga filtresinden (Corning CLS431212) geçirilerek denenmiştir. Bu aşamada düşük sıcaklıklarda çözelti jelleşmeye başladığından ötürü şırınga filtresinden geçişi oldukça zor olmuştur ve bu sebeple biyomürekkebin hazırlanmasının hemen ardından yaklaşık 50°C' de şırınga filtresinden geçirilerek bu problemin önüne geçilmiştir.

Biyobasımı planlanan iki katlı mikro-doku taslaklarının tasarım ve çizimleri Solidworks® yazılımı ile gerçekleştirilmiş ve ardından .stl uzantılı elde edilen dosya biyoyazıcı sistemlerine uygun olan “.gcode” formatına dönüştürülmüştür. Cihaza .gcode uzantılı şekilde yüklenen bu üç-boyutlu tasarımın basım optimizasyonları gerçekleştirilmiştir.

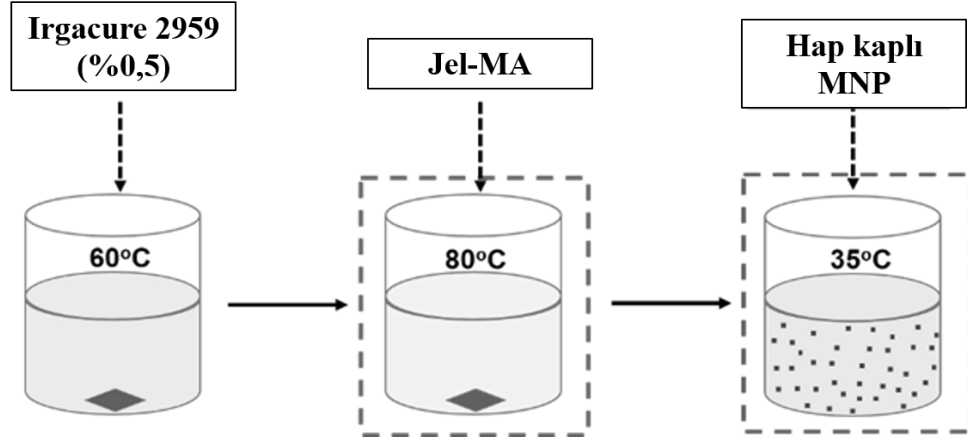
Tüm optimizasyon işlemleri sırasında ve sonrasında kullanılan ve Biovalda Sağlık Teknolojileri A.Ş. bünyesinde bulunan mikro-ekstrüzyon temelli üç-boyutlu biyoyazıcının (Cellink Inkredible+, İsveç) kartuş yuvaları 26°C sıcaklığa ayarlanmış ve 27 G konik yapıda kartuş iğnesi kullanılmıştır.

3.2.3 Çapraz bağlanma optimizasyon alışmaları

Jel-MA biyomürekkebinin çapraz bağlanabilirliğinin optimizasyon çalışmaları için basımı yapılacak çözelti %0,25, %0,5 ve %1 fotobaşlatıcı (w:v) (Irgacure 2959) içeren PBS tamponları içerisinde hazırlanmıştır. %12,5 konsantrasyona sahip Jel-MA zeltisi hazırlandıktan sonra daha öncesinde tasarımı yapılan şekilde biyobasımlar gerçekleştirilmiş ve 365 nm dalgaboyundaki UV ışığa 15 ile 120 saniye arasındaki farklı sürelerde ve 3 ile 10 santimetre arasındaki farklı mesafelerde maruz bırakılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Yazdırılma, apraz bağlanabilme ve viskozite optimizasyonları tamamlanan Jel-MA biyomürekkebinin HAp kaplı manyetik nanoparçacıklar (HAp/MNP) ile birleştirilip hibrit malzeme elde etme çalışmalarında, sırasıyla %5, %3, %2, %1, %0,5, %0,1 ve %0,05 konsantrasyonlarında HAp/MNP kullanılmıştır. İlk olarak yazdırılabilme çalışmalarının gerçekleştirildiği hibrit biyomrekkeplerden %5, %3, %2, %1 ve %0,5 oranlarında HAp/MNP ile katkılanmış biyomürekkeplerin hazırlanma aşaması ve cihazın kartuşuna doldurulma aşamasında ciddi oranlarda agregatlaşmalar ve basım yapılacak kartuş iğnesinde tıkanmalar meydana gelmiştir ve planlanan konsantrasyonlardan sapmalar yaşanmıştır.

Bu sebepten ötürü yedi farklı içeriğe sahip hibrit biyomrekkeplerden en düşük konsantrasyona sahip olan %0,1 ve 0,05 MNP içeren hibrit biyomürekkepler ile çalışmalara devam edilmiştir. Hibrit biyomürekkep hazırlanmasının şematik gösterimi şekil 3.3’de sunulmuştur.



Şekil 3.3 Jel-MA temelli hibrit biyomürekkep hazırlanmasının şematik gösterimi

3.2.4 Jel-MA temelli 3B kompozit yapıların karakterizasyonları

Bu kısımda Jel-MA ve HAp/MNP ile katkılanmış Jel-MA (Jel-MA+HAp/MNP) kompozit biyomürekkeplerinin çeşitli analizler ile karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1 Reoloji analizleri

Hap/MNP katkılanmış ve katkılanmamış jelatin temelli biyomürekkep jel sistemlerinin biyobasım öncesi reolojik davranışlarını incelemek ve sıcaklığa bağlı G' (depo modülü) ve G'' (kayıp modülü) özelliklerini belirlemek amacıyla reoloji analizleri gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkepleri reometre cihazı (Rheoplus32, Anton Paar) ile 10°C'den 40°C'ye kadar artan sıcaklık aralığında cihazın sıcaklık ayarlı plakaları arasında analize tabi tutulmuştur. Toplamda 7 farklı örneğin analize tabi tutulduğu bu çalışmada sırası ile % 18, %15, %12,5 ve %10 konsantrasyonlarında Jel-MA ve %0,05, %0,1 ve %0,5 oranlarında HAp/MNP içeren Jel-MA biyomürekkepleri kullanılmıştır. Analizlerde cihazın frekansı 1 Hz ve sıcaklık artışı 1°C/dakika olarak ayarlanmıştır. Tüm örneklerin analizlerinde toplamda 128 ölçüm noktası olacak şekilde cihaz ayarı yapılmıştır.

3.2.4.2 FTIR analizleri

Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkepleri ile hücresiz olarak gerçekleştirilen basım sonrasında elde edilen iki katlı mikro doku taslaklarının kimyasal bileşiminin incelenmesi için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Basım sonrasında elde edilen yapılar -80 C’de dondurulup liyofilize edilmiştir. Kurutulan bu örnekler homojenize edilip FTIR cihazında analize alınmıştır. Analizler 600 cm⁻¹ ile 4000 cm⁻¹ dalgaboyu aralığında Shimadzu Infinity marka-modelli cihaz ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3 SEM analizleri

Üç-boyutlu biyobasım ile elde edilmiş hücresiz iki katlı mikro doku taslaklarının yapısal bütünlüklerinin ve yüzey morfolojilerinin incelenmesi amacı ile taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Biyobasım sonrası elde edilen örnekler öncelikle 90 saniye UV maruziyeti ile çapraz bağlanma işlemine tabi tutulup sonrasında %2,5’lik glutaraldehit çözeltisi ile tespit edilip, seri etil alkol yıkamaları yapılmıştır. Görüntüleme işlemlerinden hemen öncesinde örnekler yaklaşık 10 nm kalınlığında altın kaplama işlemine tabi tutulup SEM cihazına (Zeiss, EVO 40, Almanya) yerleştirilmiştir ve farklı büyütme değerlerinde mikroskobik incelemeler gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.4 Mekanik basma testleri

Hücresiz iki katlı hibrit mikro yapıların bileşimi ve mekanik özellikleri arasında bağlantının kurulabilmesi amacıyla mekanik basma testleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde iki katlı Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkeplerinin basımı ile oluşturulan katlı mikro-doku taslakları kullanılmıştır. Basım sonrası %0,5 fotobaşlatıcı içeriğinden ötürü UV ışık kaynağı ile 90 saniye boyunca çapraz bağlanan yapılar Shimadzu AGS-X mekanik test cihazı ile 500 newton y k hücresi altında 1mm/dakika hız ile basma testine tabi tutulmuştur. Bu noktada belirlenen 90 saniyelik s reye çapraz bağlanma optimizasyonunda elde edilen ve bulgular kısmında sunulan verilerden yola

çıkılarak karar verilmiştir. Tüm basma testleri, örneklerde %50 oranında esneme oluncaya kadar sürdürülmüştür.

3.2.4.5 Termal gravimetrik analizler (TGA)

Hücreless olarak üç-boyutlu basımı gerçekleştirilmiş olan katlı hibrit doku taslakları UV ile çapraz bağlanmanın ardından, -80°C’de 24 saat boyunca dondurulup hemen akabinde 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Kurutulan örneklerin termal kararlılıklarını incelemek amacı ile TGA analizleri (DTG-60/60, Shimadzu) yapılmıştır. Tüm termal analizlerde azot ortamında artan sıcaklığa bağlı olarak yapıda meydana gelen % kütle kayıpları hesaplanmıştır. Referans ve boş panlar yerleştirildikten sonra daraları alınmış ve analiz edilecek numune yerleştirilmiştir. Analizlerde TGA cihazına uyumlu alüminyum panlar kullanılmıştır ve sıcaklık 30°C’den başlayıp dakikada 25°C sıcaklık artışı ile 600°C’ye kadar çıkartılmıştır.

3.2.4.6 Su tutma (şişme) testleri

Hazırlanan Jel-MA ve Je-MA+HAp/MNP biyomürekkeplerinin su tutma kapasiteleri ve bununla birlikte çözünme davranışlarını değerlendirmek için şişme (swelling) testleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan biyomürekkeplerin içerisine %0,1, %0,25 ve %0,5 olmak üzere 3 farklı fotobaşlatıcı (Irgacure 2959) koyuldu. Bu biyomürekkeplerin 24 kuyucuklu kültür kaplarına dökümü gerçekleştirilmiş ve 2mm yüksekliğinde 15 mm çapında disk şeklinde örnekler elde edilmiştir. Bu örnekler 48 saat süresince PBS içeren tüplerde bekletilmiş ve süre sonunda şişmiş kütleleri tartılmıştır. Örneklerin su tutma kapasiteleri aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Su Tutma} : [(\text{Son kütle} - \text{İlk kütle}) / \text{İlk kütle}] \times 100$$

3.2.5 İnsan periodontal ligament fibroblast hücrelerinin kültürü

Tez çalışması kapsamında ticari olarak temin edilen insan periodontal ligament fibroblast hücreleri (PDLF) (ATCC®), -80°C'deki dondurucudan çıkarılmasını takiben 37°C'ye ayarlı su banyosu içerisine alınmıştır. Bu aşamada kriyotüpün kapağının suyla temas etmemesine dikkat edilmiştir. Kriyotüp içindeki hücre süspansiyonunun büyük bir kısmı çözülünceye kadar, kriyotüp su banyosunda bekletilmiştir. Ardından, kriyotüpler su banyosundan çıkarılmış, dış yüzeyi %70'lik etil alkol ile silinerek, laminar akışlı kabin içerisine alınmıştır. Hemen ardından, kriyotüpteki hücre süspansiyonu bekletilmeden, içerisinde besiyeri bulunan 15 mL'lik santrifüj tüpüne yavaşça ilave edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, hücre dondurma ortamında bulunan dimetil sülfoksitin (DMSO) uzaklaştırılması amacıyla 1500 devir/dakika hızında 7 dk. süre ile santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında, süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Santrifüj tüpünün alt kısmında toplanan hücre pelleti, besiyeri ile süspanse edilmiştir. Hücrelerin ekileceği T75 (Corning) kültür kabı içerisine hücre kültürü besiyeri ilave edilerek, kap yüzeyinin tamamen besiyeri ile temas etmesi sağlanmış, ardından, besiyeri ile süspanse edilen hücreler T75 kültür kaplarına ekilmiştir.

İnsan PDLF hücrelerinin kültürü için, %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), 2 mM L-glutamin (Gibco, ThermoFisher, Waltham, MA, A.B.D.), 100 µL/mL penisilin-streptomisin (Lonza) içeren Dulbecco's modified Eagle's medium Ham's F12 (DMEM/F12) (Lonza) kültür besiyeri kullanılmıştır. T75 kültür kabına hücre ekimi sonrası, hücreler %5 CO₂, %90 nem içeren, 37°C sıcaklığa ayarlı karbondioksitli inkübatörde kültüre alınmıştır. Hücrelerin besiyeri 3-4 günde bir olacak şekilde taze besiyeri ile değiştirilip, hücrelerin karakteristik morfolojisi, inversiyon mikroskopunda (Primovert, Zeiss, Oberkochen, Almanya) takip edilerek fotoğraflanmıştır. Yaklaşık 7-10 günlük kültürün sonunda, yaklaşık %70-80 oranında bolluğa ulaşan hücreler için pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Kültür süreci sırasında yaklaşık %70-80 bolluğa ulaşan insan PDLF ve insan alveolar osteoblast hücreleri (OB), tripsin işlemi ile bir üst pasaja geçirilmiştir. Bu amaçla, kültür kabındaki hücrelerin eski besiyeri dikkatli bir şekilde atık kabına aktarılmıştır. Yıkama işlemi amacıyla, hücrelerin üzerine, 10 mL steril PBS ilave edilerek yavaşça yıkanmış ve PBS atık kabına atılmıştır. Yıkama işleminin ardından, hücreler üzerine, 4 mL %0,25 Tripsin/EDTA çözeltisi ilave edilmiş ve karbondioksitli inkübatörde yaklaşık 3-5 dakika süresince bekletilmiştir. Kültür kabının tabanına bir kaç kez hafifçe vurulup hücrelerin kültür kabı tabanından ayrılıp ayrılmadığı faz-kontrast mikroskobu ile takip edilmiştir. Hücrelerin tamamı kap tabanından ayrıldığında, hücreler %10 FBS içeren besiyeri ile kültür kabından toplanarak santrifüj tüpü içerisine aktarılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 1500 devir/dakika hızda 7 dakika süre ile oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelleti üzerine besiyeri ilave edilip yavaşça pipetleme yapılmıştır. Ardından T75 kültür kabı içerisine besiyeri ilave edilmiş ve kap yüzeyine tamamen yayılması sağlanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan T75 kültür kabına ilave edilmiştir. Kültür kabı yavaş hareketlerle sallanarak hücre süspansiyonu homojen hale getirilmiştir. Son olarak, T75 kültür kabına ekimi yapılan hücreler karbondioksitli inkübatöre kaldırılarak hücre kültürüne devam edilmiştir.

3.2.6 İnsan osteoblast hücrelerinin kültürü

Satın alınan ve -80°C’de muhafaza edilen insan alveolar osteoblast (OB) hücrelerinin (ATCC®, CRL-11372™) çözülmesi ve kültüre adapte edilmesi işleminde, insan PDLF hücreleri için kullanılan benzer çözme protokolü kullanılmıştır. Özetle, -80°C’deki dondurucudan çıkarılan hücreler, 37°C’ye ayarlı su banyosu içerisine yerleştirilmiştir. Bu işlem sırasında kontaminasyonu engellemek amacıyla, kriyotüpün kapağının suyla temas etmemesine dikkat edilmiştir. Kriyotüp içindeki hücre süspansiyonunun büyük bir kısmı çözülür çözülmez, su banyosundan çıkarılmış, dış yüzeyi %70’lik alkol ile dezenfekte edilerek, laminar akışlı kabin içerisine yerleştirilmiştir. Kriyotüp içerisinde bulunan hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 mL’lik santrifüj tüpüne yavaşça aktarılmıştır. Hücre dondurma ortamında bulunan DMSO’nun uzaklaştırılması amacıyla,

hücre süspansiyonu 1500 devir/dakika hız ile 7 dk. santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işleminin ardından, süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Santrifüj tüpünün alt kısmında toplanan hücre pelleti, besiyeri ile süspanse edilmiştir. Hücrelerin ekileceği T75 (Corning) kültür kabı içerisine hücre kültürü besiyeri ilave edilerek, kap yüzeyinin tamamen hücre kültür besiyeri ile temas etmesi sağlanmıştır. Santrifüj tüpü içerisinde, besiyeri ile süspanse edilen hücreler, T75 kültür kaplarına pipet yardımıyla ilave edilmiştir. Hemen ardından, hücrelerin kültür kabının yüzeyine homojen bir şekilde tutunması amacıyla, kültür kabı içindeki hücre süspansiyonu hafifçe karıştırılmıştır. İnsan OB hücrelerinin kültürü için, %10 fetal sıgır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 µL/mL penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's modified Eagle's medium Ham's F12 (DMEM/F12) ve Minimum Essential Medium Eagle-Alpha (α-MEM) (Lonza) kültür ortamı kullanılmıştır. Hücreler, T75 kültür kabına ekildikten sonra, %5 CO₂, %90 nem içeren, 37°C sıcaklığa ayarlı karbondioksit inkübatörüne yerleştirilmiştir. Hücrelerin besiyeri 3-4 günde bir taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Kültür süresince hücre morfolojileri, inversiyon mikroskopunda takip edilmiştir ve yaklaşık 4 ila 5 günlük kültürün sonunda, yaklaşık %80 bolluğa ulaşan hücreler tripsin işlemi ile bir üst pasaja geçirilmiştir.

İnsan OB hücresi kültür aşamalarındaki tripsinleme işlemleri, yine insan PDLF hücrelerine uygulanan tripsinleme işlemi ile benzer olarak gerçekleştirilmiştir.

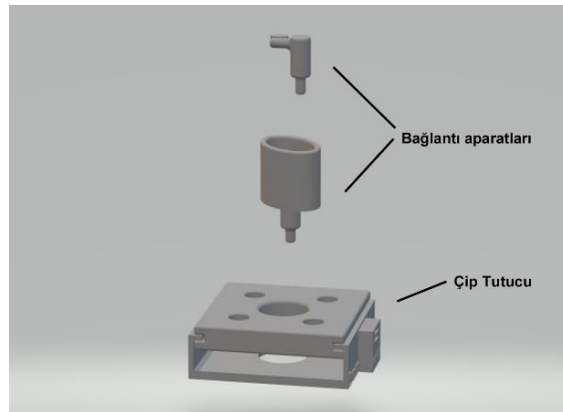
3.2.7 Kültürü yapılan hücrelerin karakterizasyonu

İnsan alveolar OB ve PDLF hücrelerinin kültür ve pasajlama sürecindeki takipleri faz-contrast mikroskobu (Primovert, Zeiss, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir ve fotoğraflanmıştır. Hücrelerin proliferasyon eğrilerinin belirlenmesi amacıyla, eş-zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence Real-Time Cell Analyzer; RTCA) kullanılmıştır. Bu amaçla, 96 kuyucuklu elektrot-plakanın (e-plaka) her bir kuyusuna 100'er µL besiyeri ilave edilip 30 dakika süre ile inkübatörde bekletilmiştir. 30 dakika sonra hücresiz kültür besiyeri background ölçümü alınmıştır. Ardından, T75 kültür kaplarında doyum noktasına ulaşan hücreler tripsin yöntemi ile ayrılmış ve besiyeri ile süspanse edilmiştir.

İlk olarak, 50.000 hücre içeren 100 μ L hücre süspansiyonu ilk kuyuya ilave edildikten sonra, seri dilüsyon yapılarak, e-plakanın diğer kuyularına farklı yoğunluklarda (25000, 12500, 6250, 3125, 1563, 781 hücre/kuyu) hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre ilavesi yapıldıktan sonra e-plaka 30 dakika bekletilmiştir. Bu süreden sonra, e-plaka üzerinde ölçümler başlatılmıştır. E-plakanın her bir kuyusundaki hücre indeksi değerleri 24 saat boyunca her 15 dakikada bir ölçüm alınarak kaydedilmiştir.

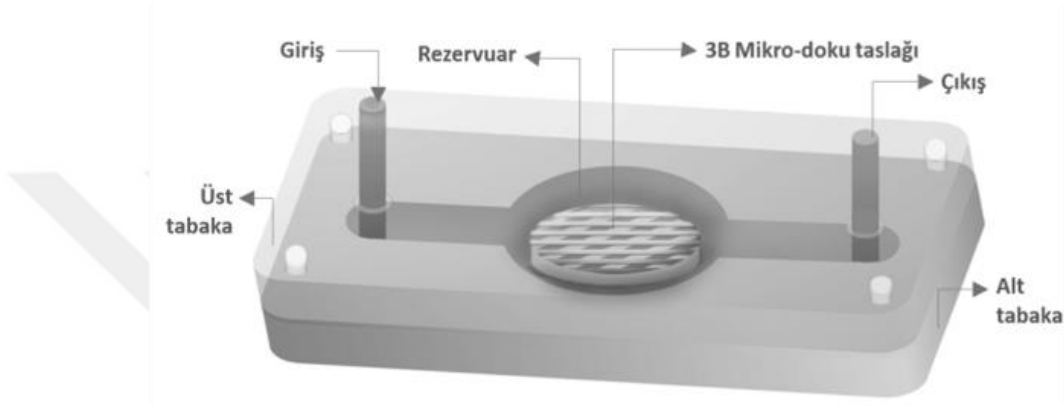
3.2.8 Mikroakışkan Çip Sisteminin Tasarımı

3BB işlemleri ile katlı hibrit perio/osteo mikro-doku taslaklarının oluşturulması sonrasında bu mikro-dokuların kültürünün sürdürüleceği mikroakışkan temelli çip sistemlerinin tasarımı yapılmış ve hizmet alımı yolu ile üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu tasarım kapsamında 3BB prosesi ile oluşturulacak mikro-doku taslaklarının yerleştirileceği rezervuar, besiyeri giriş çıkışının uygulanacağı noktalar ve ayrıca akışın sağlanacağı mikro kanallarının detaylı ölçüleri belirlenmiştir. Lazer litografi metodu ile üretimi gerçekleştirilen mikroakışkan çipler, iki kat poli(dimetil siloksan) (PDMS) polimerinden oluşan katmanların uygun platform ve vidalar ile sabitlenmesi sonucunda sızdırmaz hale getirilmiş ve **şekil 3.4’de** gösterildiği gibi besiyeri giriş çıkışı için silikon hortum bağlanmasına uygun kanal bağlantıları takılmıştır.



Şekil 3.4 Mikroakışkan temelli çip sistemi ile birlikte kullanılan sabitleme platformu ve bağlantı aparatları

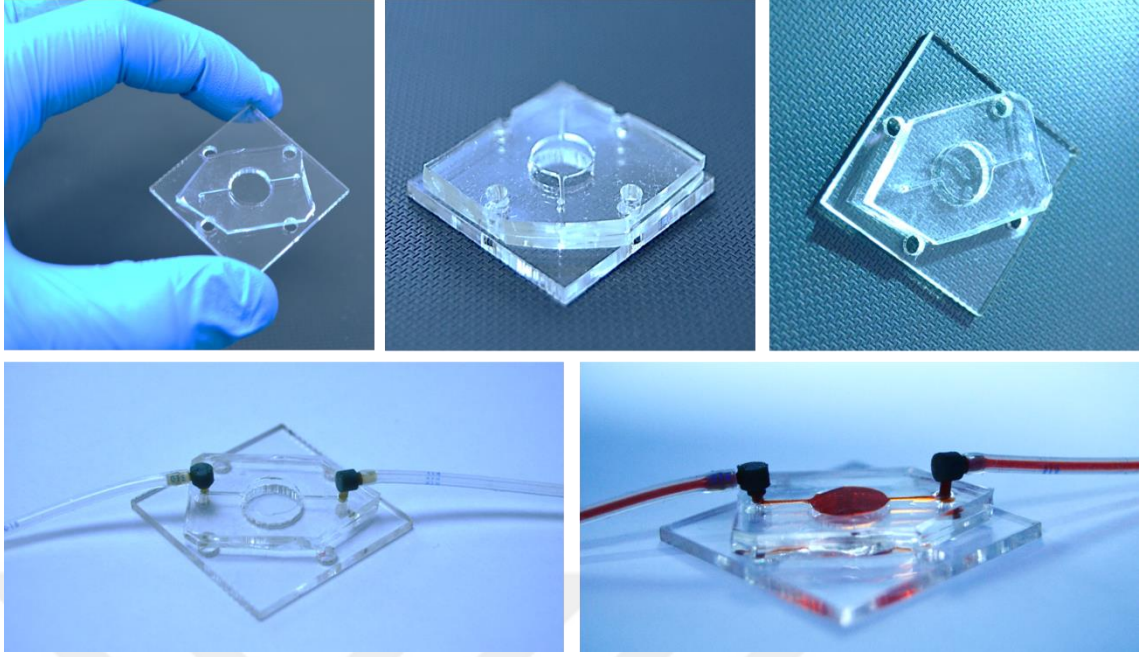
PDMS polimerinin hücre kültürü şartlarına oldukça uygun olduğu bilinmektedir. PDMS polimeri özellikle kültür ortamındaki CO₂'i geçirme özelliğine sahiptir ve kullanım sonrasında bir diğer kullanıma hazırlanması aşamasında yapılması gereken sterilizasyon işlemlerine karşı oldukça dayanıklı bir malzemedir. Üretimi gerçekleştirilen ve tez çalışmasının ilgili tüm kısımlarında kullanılan mikroakışkan temelli çiplerin şematik gösterimi **şekil 3.5**'de sunulmaktadır.



Şekil 3.5 Tez çalışması kapsamında kullanılan mikroakışkan temelli çiplerin şematik gösterimi

Hizmet alımı şeklinde ürettirilip steril olarak laboratuvarlarımıza getirilen PDMS temelli mikroakışkan çiplerin uygun besiyeri ile kültür şartlarında akış, stabilite ve sterilizasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 7 günlük besiyeri akışı ile ön denemelerin yapıldığı çiplerin rezervuar ve kanal kısımlarında herhangi bir akış bozukluğu olmadığı, uzun süreli akışlarda herhangi bir hava kabarcığı problemi ile karşılaşılmadığı görülmüş ve ayrıca mikro-kanallardan ve giriş-çıkış bağlantı noktalarından sızdırma gibi problemler ile karşılaşılmadığı belirlenmiştir. Ayrıca 121°C sıcaklıktaki su buharı sterilizasyonu işlemi sonrasında mikroakışkan çiplerde herhangi bir fiziksel deformasyon ile karşılaşılmamıştır.

Mevcut mikroakışkan çiplerin çok daha uzun sürelerde kullanımına olanak sağlayacak ve mekanik olarak daha stabil yapıda kalmaları için ayrıca çip tutucu platformlar da tasarlanıp hizmet alımı şeklinde ürettirilmiştir. Tez kapsamında kullanılan mikroakışkan çiplere ait fotoğraflar **şekil 3.6**'da verilmiştir.



Şekil 3.6 Tez kapsamında kullanılan mikroakışkan çiplere ait fotoğraflar

3.2.9 3B perio/osteo mikro-doku taslaklarının biyobasımı ve mikroakışkan temelli çip içerisinde dinamik kültürü

Periodontal dokuyu taklit edecek 2 katlı perio/osteo hibrit mikro-doku taslağının basılması işlemlerinde sırasıyla aşağıdaki adımlar takip edilmiştir. Öncelikle kullanılan üç-boyutlu biyoyazıcının kartuş yuvaları, biyobasım platformu, pnömatis sistem parçaları ve diğer önemli bileşenleri alkol ile dezenfekte edildikten sonra yaklaşık 30 dakika boyunca sistemin HEPA filtresi çalıştırılıp cihaz kabini içerisindeki hava kalitesinin yükseltilmesi sağlanmıştır ve üç-boyutlu biyoyazıcı cihazı laminar akışlı kabin içerisine yerleştirilmiştir.

Kültürü yapılan insan alveolar OB hücreleri 200 μ L besiyeri içerisinde süspanse edilmiş ve bu hücre süspansiyonu enjektör içerisine transfer edilmiştir. Diğer taraftan %12,5'lik Jel-MA içerisinde %0,1 HAp/MNP içeren kompozit biyomürekkep ayrı bir enjektöre transfer edilmiştir ve bu iki enjektör hücre karıştırıcısı (Cellink, Cellmixer) yardımı ile homojen olarak karıştırılmış, karışım yapılırken eş zamanlı olarak cihaza ait 3 mL hacme sahip steril dolum kartuş içerisine yüklenmiştir. Ayrıca aynı hacimdeki insan PDLF hücre süspansiyonu ve %12,5'lik Jel-MA biyomürekkebi de aynı işlem ile farklı bir steril dolum

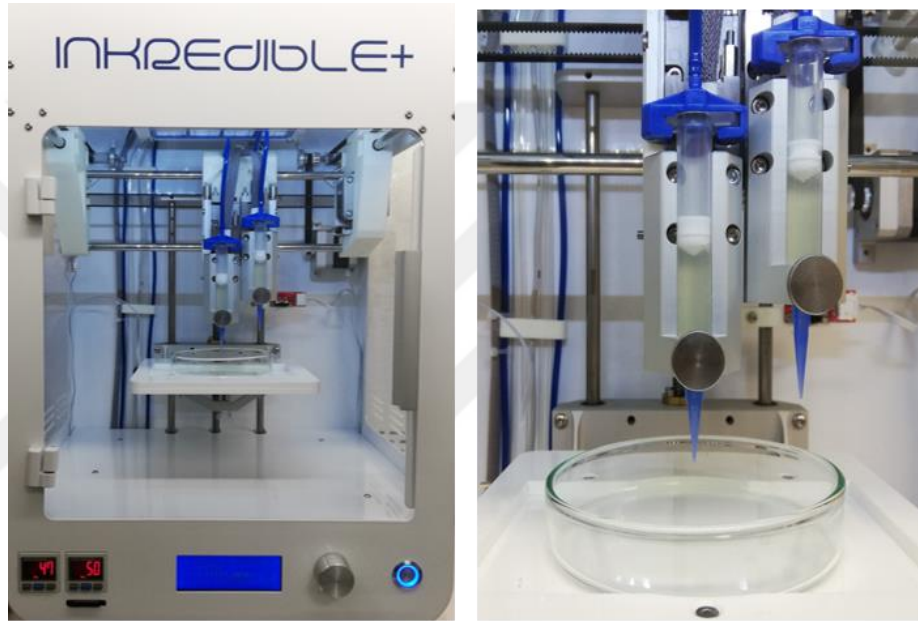
kartuşuna yüklenmiştir. Daha önce optimizasyonu sağlanan 27G konik iğneler kartuşların uçlarına bağlanmış ve dolu kartuşlar cihazın kartuş yuvalarına yerleştirilmiştir. Bu aşamalarda biyomürekkep ile karıştırılan hücrelerin yoğunluğu $4 \times 10^6/\text{mL}$ olacak şekilde ayarlanmıştır.

Biyomürekkeplerin hücreler ile karıştırılarak hazırlanması sonrasında üç-boyutlu biyoyazıcı platformuna yerleştirilen mikroakışkan temelli çipin rezervuarının x, y ve z koordinat verileri girilmiş ve çift katlı hibrit mikro-doku taslaklarının üç-boyutlu biyobasımları gerçekleştirilmiştir. Tüm biyobasım işlemlerinde kartuş yuvalarının ısıtma sistemi daha önce de optimize edildiği gibi 26°C 'ye ayarlanmıştır, yaklaşık 50-55 kPa basınç değeri ve 5mm/saniye basınç hızı ile basım gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda mikro-doku taslağının ilk katı insan alveolar kemik dokusunu taklit etme amacı ile %12,5'lik Jel-MA içerisinde %0,1 HAp/MNP içeren biyomürekkebin belirlenen desende basımı ile sağlanmıştır. İkinci kat ise diğer kartuş ile aynı bölge üzerine belirlenen katlı yapıyı oluşturma için basımı ile devam etmiştir. İlk katın biyobasım işlemi bittiğinde yaklaşık 90 saniye, ikinci katın biyobasım işlemi bittiğinde de yine 90 saniye 365 nm dalgaboyuna sahip UV ışığa maruz bırakılmıştır ve tüm yapının etkili şekilde çapraz bağlanması sağlanmıştır. Optimizasyonu tamamlanan ve tüm üç-boyutlu biyobasım işlemlerinde uygulanan parametreler **çizelge 3.1'de** sunulmuştur. Ayrıca üç-boyutlu biyobasım için kullanılan sistem ve yapılan optimizasyon çalışmalarına ait fotoğraflar **şekil 3.7'** de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Üç-boyutlu biyobasım parametreleri

Parametre	Değer
Jel-Ma Konsantrasyonu (%)	% 12,5
HAp/MNP Konsantrasyonu (%)	% 0,1
Hücre yoğunluğu	$4 \times 10^6/\text{mL}$
Irgacure 2959 (fotobaşlatıcı)	% 0,5
Sıcaklık	26°C

Basınç	50-55 kPa
Basım Hızı	5mm / sn
Nozül Boyutu	27G
UV dalgaboyu	365 nm
UV Maruziyet Süresi	90 sn



Şekil 3.7 Üç-boyutlu biyoyazıcı sistemi ve katlı hibrit mikro-doku taslaklarının biyobasım sürecine ait fotoğraflar

3BB işlemleri sonrası elde edilen 2 katlı mikro-doku taslağının mikroakışkan temelli çip içerisindeki dinamik kültürü için kullanılan tüm materyallerin steril edilmesinin akabinde kurulum gerçekleştirilmiş ve **şekil 3.8’de** de görüldüğü gibi 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ seviyelerindeki inkübatörde kültüre başlatılmıştır.

Deney düzeneğinde yalnızca peristaltik pompa inkübatör dışında konumlandırılmış, düzenekte PDMS temelli mikroakışkan çip giriş ve çıkış aparatlarına uygun olan iç çapı 1,42 mm, dış çapı 3,00 mm boyutundaki silikon hortumlar kullanılmış, pompa

düzenine bağlanmış ve son olarak peristaltik pompanın akış hızı 0,3 ml/dk olacak şekilde ayarlanmış ve akış başlatılmıştır.

İnsan alveolar OB ve PDLF hücreleri içeren Jel-MA temelli mikro-doku taslaklarının belirlenen zaman noktalarında mikroakışkan çip sisteminden ayrılması için sırasıyla pompadaki akış durdurulmuş, mikroakışkan çip deney sisteminden sökülmüş ve çip tutucuyu sabitleyen vidalar çıkartılmıştır. Sistemden ayrılan mikro-doku taslağı yapılan karakterizasyonlara uygun işlemlerden geçirilmiştir.



Şekil 3.8 3B perio/osteo mikro-doku taslaklarının mikroakışkan çip içerisindeki kültürüne ait fotoğraflar

3.2.10 Perio/osteo mikro-doku taslaklarının karakterizasyonu

3.2.10.1 Spektrofotometrik çalışmalar (Alamar Mavisi)

Alamar mavisi testi, resazurinin canlı (mitokondriyel dehidrojenaz aktivitesi bulunan) hücrelerin içerisine girmesi ve floresan özellikte kırmızı renkte olan resorufine indirgenmesi esasına dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Alamar Blue reaktifinin (resazurin sodyum tuzu) canlı hücredeki indirgenmesi

3BB prosesi ile üretilen ve 24 kuyucuklu kültür kaplarında kültürü sürdürülen 3B perio/osteo hibrit mikro-doku taslakları, belirlenen zaman noktalarında (1., 3. ve 7. gün) PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine, 1/10 oranında AlamarBlue reaktifi eklenerek 4 saat süre ile 37°C’de karanlıkta inkübe edilmiştir. Hücre içermeyen çok katlı hibrit yapılar kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örneklerden 200'er µL alınarak 96 kuyucuklu siyah kenarlı kültür kaplarına aktararak ölçümler gerçekleştirilmiş (SpectraMax® M5, Molecular Devices, USA) ve floresan yoğunlukları (570 nm eksitasyon, 590 nm emisyon) belirlenmiştir.

3.2.10.2 Konfokal lazer mikroskopi analizleri (Canlı/Ölü Testi)

İki renkli floresan boyama temelli bu yöntem, temelde kalseinin canlı hücreleri ve etidyum homodimerin ölü hücreleri işaretlemesi prensibine dayanmaktadır. Kültürü sürdürülen insan PDLF ve OB hücrelerini içeren iki katlı perio/osteo mikro-doku taslakları 1., 3. ve 7. günlerde kültürden alınarak D-PBS tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama

işlemi sonrası, D-PBS içerisinde hazırlanan, 4 μ M etidyumhomodimer-1 ve 2 μ M kalsein AM (Live/Dead® Viability/Cytotoxicity kit; Invitrogen) içeren boyama çözeltisi ile mikro-dokular 45 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda örnekler konfokal lazer mikroskobu ile analiz edilerek hücre canlılığı ve dağılımı takip edilmiştir.

3.2.10.3 SEM analizleri

Kültürü sürdürülen iki katlı perio/osteo hibrit mikro-doku taslaklarının kültür süresince yapısal bütünlüklerinin ve yüzey morfolojilerinin incelenmesi amacı ile taramalı elektron mikroskobu analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kültürün çeşitli aşamalarında SEM analizleri için örnekler alınmıştır. PBS ile yıkama işlemlerinin ardından örnekler, PBS içerisinde hazırlanmış %2,5'lik glutaraldehit çözeltisi içerisinde tespit edilmiştir. Tespit edilen numuneler, glutaraldehidin uzaklaştırılması için PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından örnekler, artan derecelerde alkol serilerinden (%50, %70, %80, %95 ve %100) geçirilerek dehidrate edilmiştir. Görüntüleme öncesinde kritik nokta kurutma işleminden geçirilen örnekler yaklaşık 10 nm kalınlığında altın tabakası ile kaplanıp SEM cihazına (Zeiss EVO 40, Almanya) yerleştirilmiş ve farklı büyütme değerlerinde mikroskobik incelemeler gerçekleştirilmiştir.

3.2.10.4 Histokimyasal analizler

Kültürü sürdürülen iki katlı perio/osteo hibrit mikro-doku taslaklarında bulunan hücrelerin ve hücre dışı matriks dağılımının değerlendirilmesi amacıyla histokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, belirlenen zaman noktalarında (3. ve 7. günler) hücreli katlı hibrit mikro-doku taslakları kültürden çıkarılıp, potasyum fosfat tamponu içerisinde hazırlanan %2,5'lik glutaraldehit içerisinde tespit edilmiştir. Tespit işleminin ardından, örnekler sırası ile potasyum tamponunda hazırlanmış % 15'lik sukroz çözeltisi ve dondurma çözeltisi (Tissue-Tek, Sakura, Zuid-Holland, Hollanda) içerisinde 30'ar dakika bekletilmiştir. Kalıplara yerleştirilen numunelerin tüm yüzeyleri, dondurma

  zeltisi ile kaplandıktan sonra -80 C’de dondurularak blok haline getirilmiştir. Kesit alma işlemleri, kriyostat cihazı (Leica Microsystems CM 1900, Nussloch, Almanya) kullanılarak, 4-5  m kalınlığında kriyokesitler alınarak gerçekleştirilmiştir. Alınan kesitler, Hematoksilin ve Eosin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyları ile boyanarak Leica Işık Mikroskopunda (Wetzler, Almanya) görüntülenmiştir.

Alınan kesitlerin Hematoksilin ve Eosin (H&E) boyaması işlemlerinde sırasıyla aşağıdaki adımlar takip edilmiştir:

- (1) Lam  zerindeki kesitler 2-3 dakika süre ile distile su ile nemlendirilmiştir.
- (2) Nemlendirilmiş olan kesitler  zerine, Hematoksilin   zeltisi ilave edilmiş ve 8 dakika süre ile bekletilmiştir.
- (3) Bu süre sonunda lam üzerindeki fazla Hematoksilini uzaklaştırmak için, kesitler 10 dakika boyunca akan suyun altında dikkatlice yıkanmıştır.
- (4) Yıkama işleminin ardından kesitler %95’lik etil alkol ile muamele edilmiştir.
- (5) Kesitler daha sonra Eosin   zeltisi ile 1 dakika süre ile muamele edilmiştir.
- (6) Eosin ile boyama sonrası, fazla boyanın uzaklaşması amacıyla kesitler % 95’lik etil alkol ile yıkanmıştır.
- (7) Boyanan kesitler havada kurutulduktan sonra ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir.

Alınan kesitlerin Periyodik Asit Schiff (PAS) boyaması işlemlerinde sırası ile aşağıdaki adımlar takip edilmiştir:

- (1) Kesitler yaklaşık 5 dakika distile su ile yıkanmıştır.
- (2) Yıkama işleminin ardından, lam üzerindeki kesitler, Periyodik asit solüsyonu ile 5 dakika süresince muamele edilmiştir.
- (3) Kesitler, distile su ile yıkanmıştır.
- (4) Bundan sonra kesitler, Schiff reaktifi ile 15 dakika muamele edilmiştir.
- (5) Kesitler, distile su ile 10 dakika yıkanmıştır.
- (6) Ardından, Hematoksilin   zeltisi ile 6 dakika muamele edilmiştir.

- (7) Kesitler, distile su ile 10 dakika yıkanmıştır.
- (8) Kesitler, asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarılmıştır.
- (9) Akan suyun altında 10 dakika yıkama yapılmıştır.
- (10) Ardından kesitler önce 1 dakika % 80'lik alkol içinde, daha sonra 1 dakika % 95'lik alkol içinde bekletilmiştir.
- (11) Son olarak, boyanan kesitler havada kurutularak ışık mikroskobunda görüntülenmiştir.

3.2.10.5 İmmünofloresan analizler

Kültürü sürdürülen katlı mikro-doku taslağı içerisindeki hücrelerin lokasyonları ve karakteristik ifadelerinin belirlenmesi amacıyla immünofloresan analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, belirlenen zaman noktalarında (1., 3. ve 7. gün) mikro-doku taslakları potasyum fosfat tamponu içerisinde hazırlanan %10'luk formaldehit çözeltisi içerisinde tespit edilmiştir. Tespit işleminin ardından, örnekler sırasıyla potasyum tamponunda hazırlanmış %15'lik sukroz çözeltisi ve dondurma çözeltisi (Tissue-Tek, Sakura, Zuid-Holland, Hollanda) içerisinde 30'ar dakika bekletilmiştir. Kalıplara yerleştirilen numunelerin tüm yüzeyleri, dondurma çözeltisi ile kaplandıktan sonra -80°C'de dondurularak blok haline getirilmiştir. Kesit alma işlemleri, kriyostat cihazı (Leica Microsystems CM 1900, Nussloch, Germany) kullanılarak, 4-5 µm kalınlığında kriyokesitler alınarak gerçekleştirilmiştir. Alınan kesitler, avidin-biyotin-peroksidaz kompleks metodu kullanılarak çok katlı yapıda yer alan her bir hücre tipine spesifik immünofloresan özellikteki belirteçler ile boyanarak floresan mikroskopta (Zeiss, Almanya) görüntülenmiştir.

Bu amaçla, yapıda yer alan periodontal katmanda bulunan PDLF hücreleri için pozitif oldukları bilinen STRO1 ve insan OB hücreleri için pozitif olduğu bilinen osteokalsin (OC) belirteçleri kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz aşamasında örnek geçirgenliklerinin artırılması amacıyla örnekler %0,1'lik Triton X-100 çözeltisi ile 30 dakika muamele edilmiştir. Ardından, %1'lik BSA (Sigma) çözeltisi ile 30 dakika süre ile inkübe edilerek spesifik olmayan bağlanmalar engellenmiştir.

Son olarak, örnekler primer antikorlar ile 37°C'de 3 saat süre ile etkileştirilmiş ve sonrasında sekonder antikorlar ile 37°C'de 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Yıkama işlemlerinin ardından örnekler floresan mikroskop altında analiz edilmiştir.

3.3 İstatistiksel Analiz

Tez kapsamında yapılan test ve analizlerden elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 9.0 programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Parametrelere bağlı olarak tek yönlü ve çift yönlü varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için Student's t-testi kullanılmıştır.

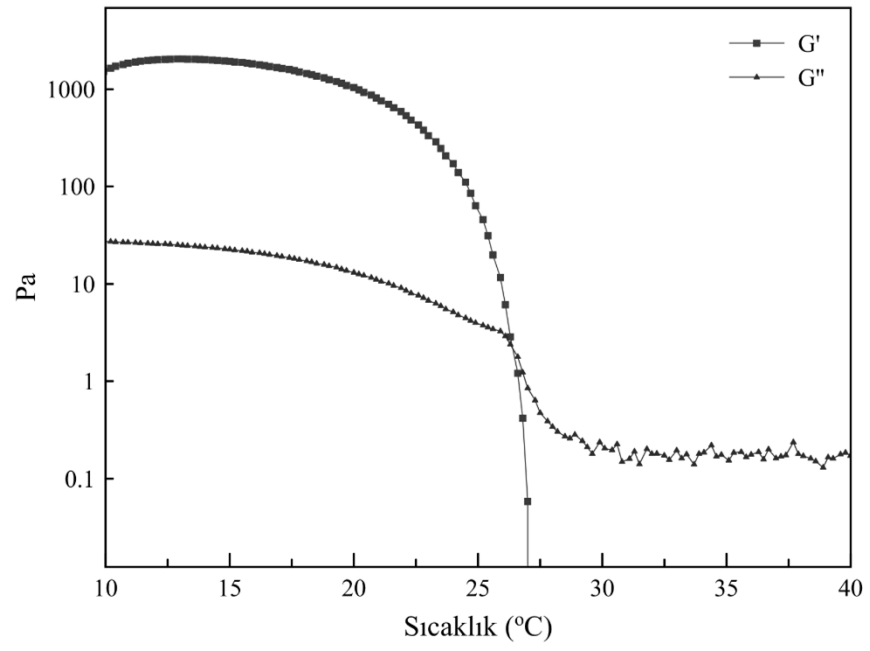
4. BULGULAR

4.1 Jel-MA Temelli Kompozit 3B Yapıların Karakterizasyonu

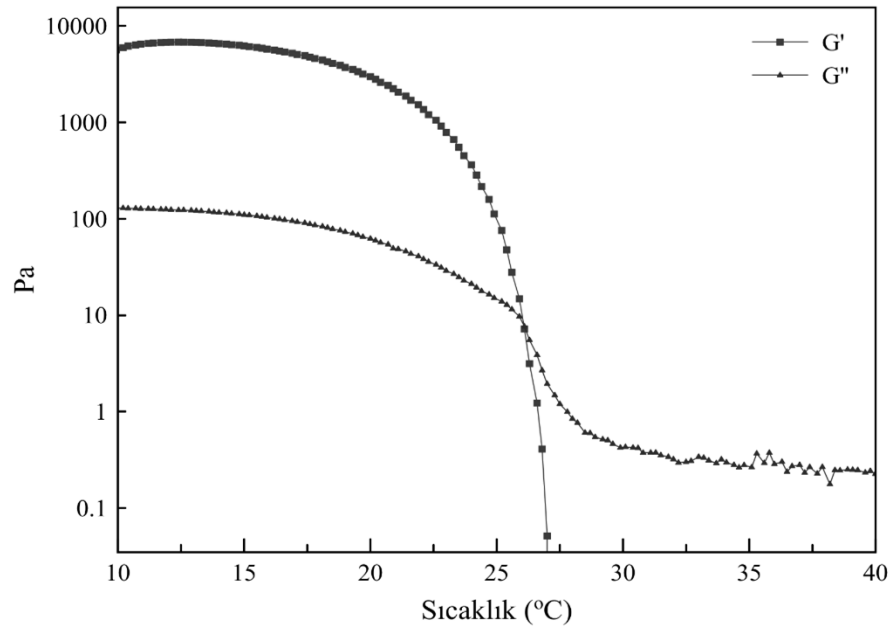
4.1.1 Reoloji bulguları

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış Jel-MA ve 3 farklı oranda HAp/MNP ile katkılanmış Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkeplerinin 10°C'den 40°C'ye kadar artan sıcaklık aralığında yapılan reoloji sonuçları **şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7**'de sunulmaktadır.

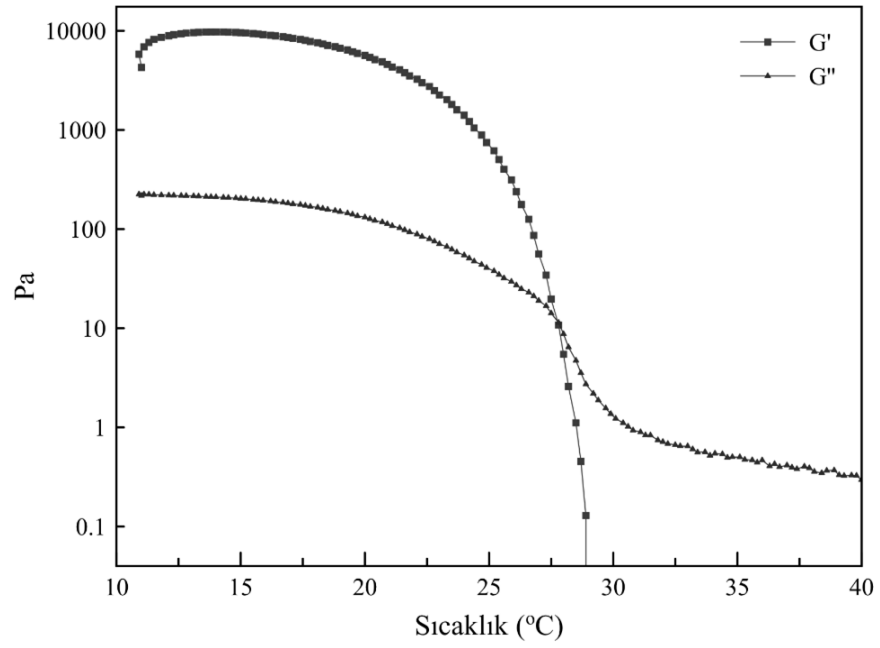
Jel-MA biyomürekkeplerinin değişen sıcaklığa karşı G' ve G'' değerleri ile G' ile G'' değerlerinin eşit olduğu jelleşme noktaları dikkate alındığında, %12,5 oranında hazırlanan Jel-MA biyomürekkebinin mevcut literatürler ve kullanılan biyoyazıcı sisteminin kullanım tavsiyeleri ile birebir uyumlu olduğu, sıcaklık artışı sağlanır iken yaklaşık 26°C'de jelleşme gösterdiği ve kullanılan biyoyazıcı ile basılmasının devam eden optimizasyon çalışmalarında da görüldüğü gibi mümkün ve verimli olduğu görülmüştür.



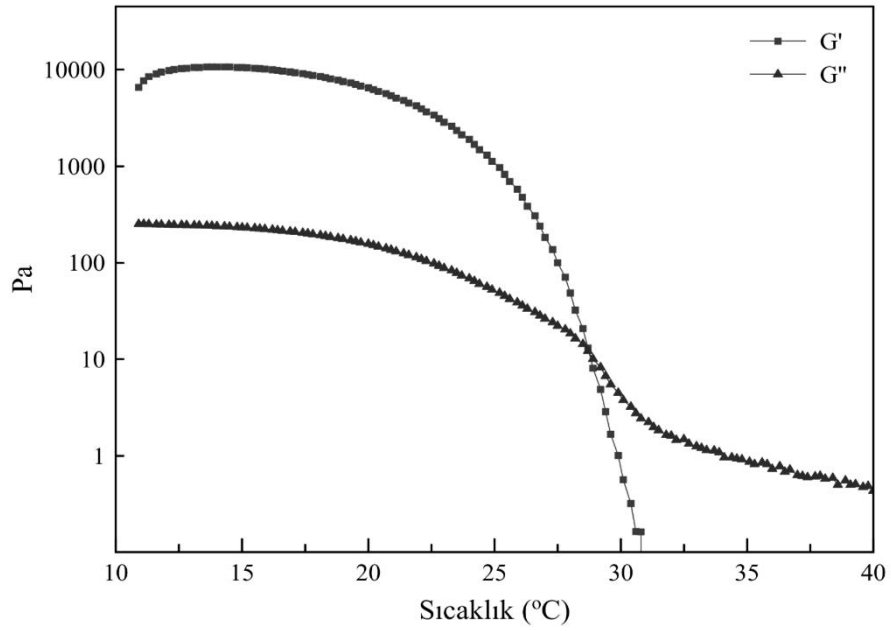
Şekil 4.1 %10 oranında hazırlanmış Jel-MA biyomürekbesine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları



Şekil 4.2 %12,5 oranında hazırlanmış Jel-MA biyomürekbesine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları



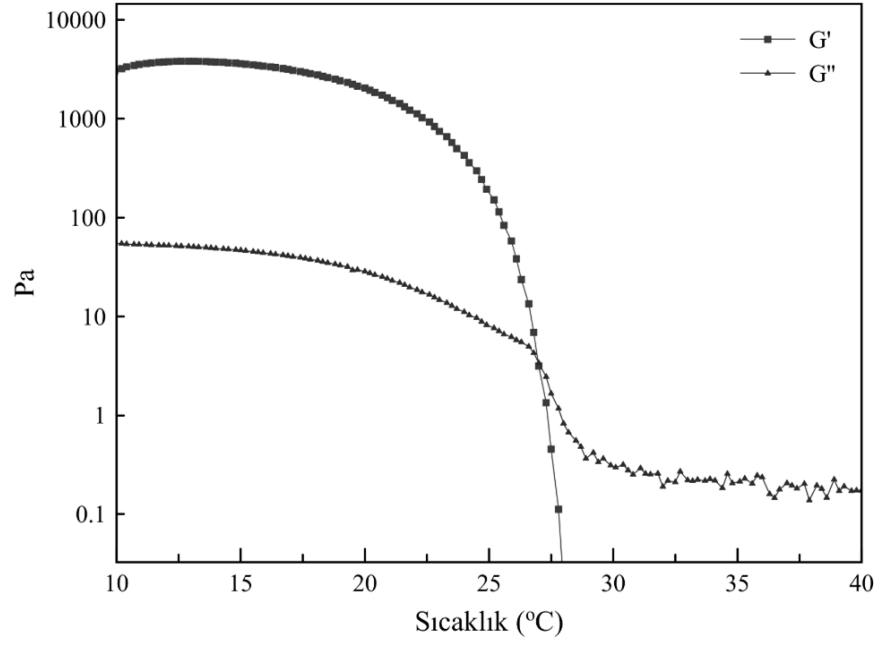
Şekil 4.3 %15 oranında hazırlanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları



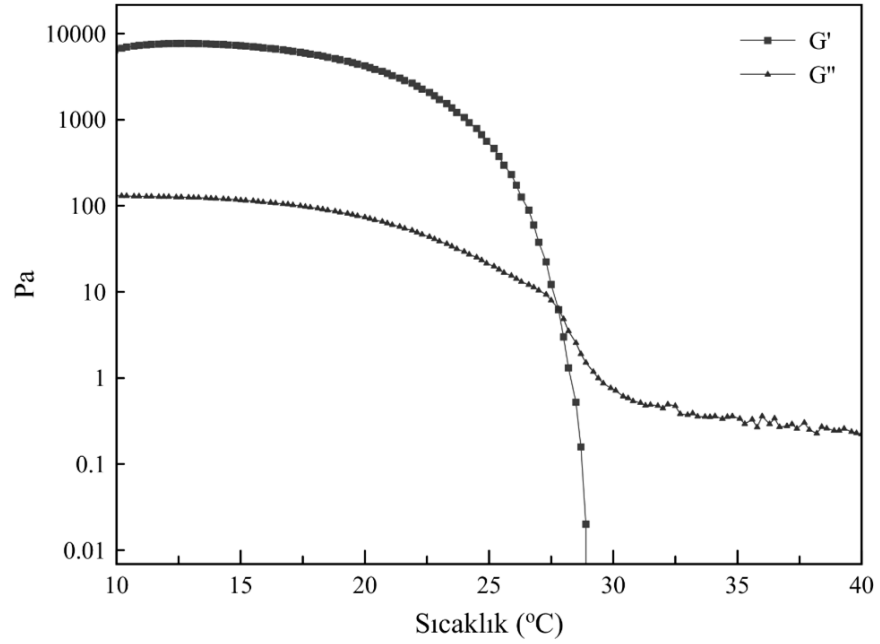
Şekil 4.4 %18 oranında hazırlanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları

Jel-MA+HAp/MNP kompozit biyomürekkeplerinde farklı bir durum söz konusu değildir. Jel-MA biyomürekkebine katılan HAp/MNP miktarındaki değişim

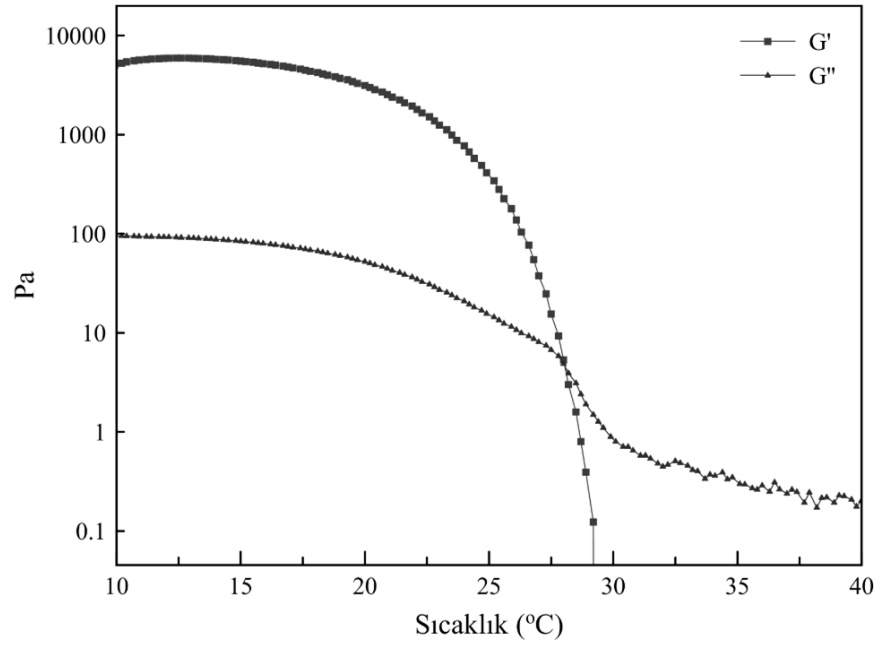
biyomürekkeplerin reolojik özellikleri üzerinde önemli değişikliklere sebep olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.5 %0,05 oranında HAp/MNP ile katkılanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları



Şekil 4.6 %0,1 oranında HAp/MNP ile katkılanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları

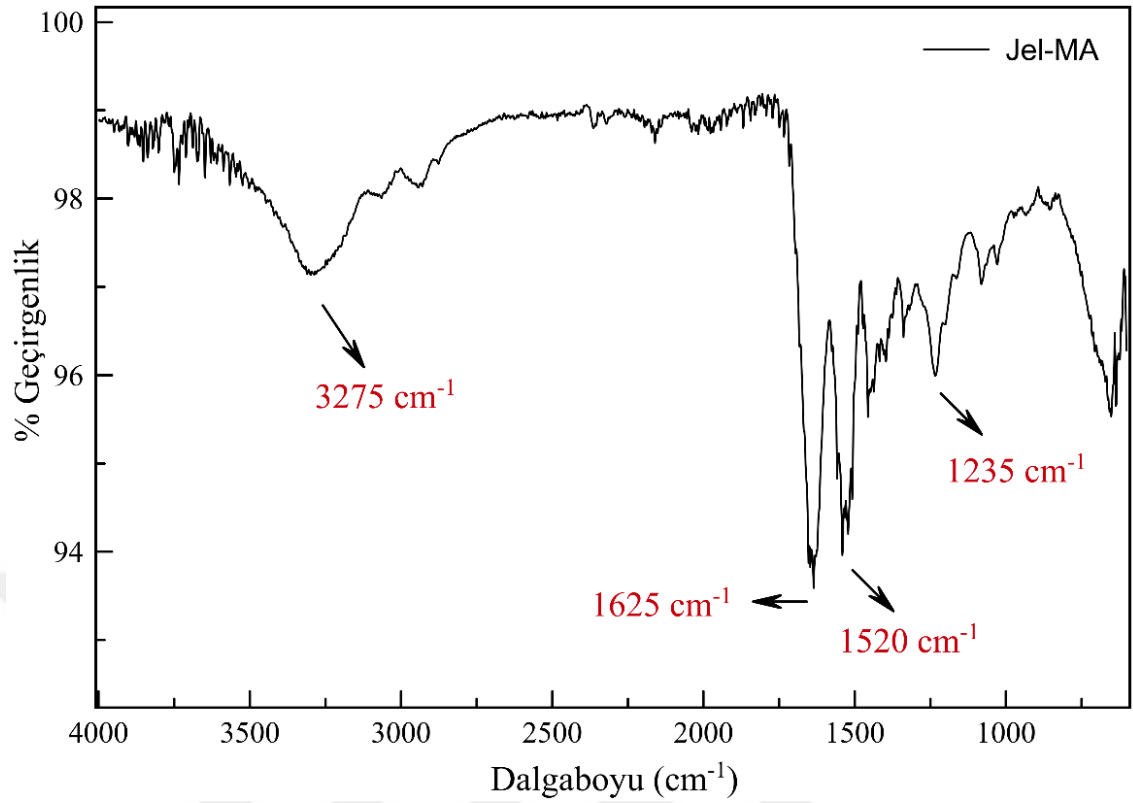


Şekil 4.7 %0,5 oranında HAp/MNP ile katkılanmış Jel-MA biyomürekkebine ait reoloji (G' ve G'') sonuçları

4.1.2 FTIR bulguları

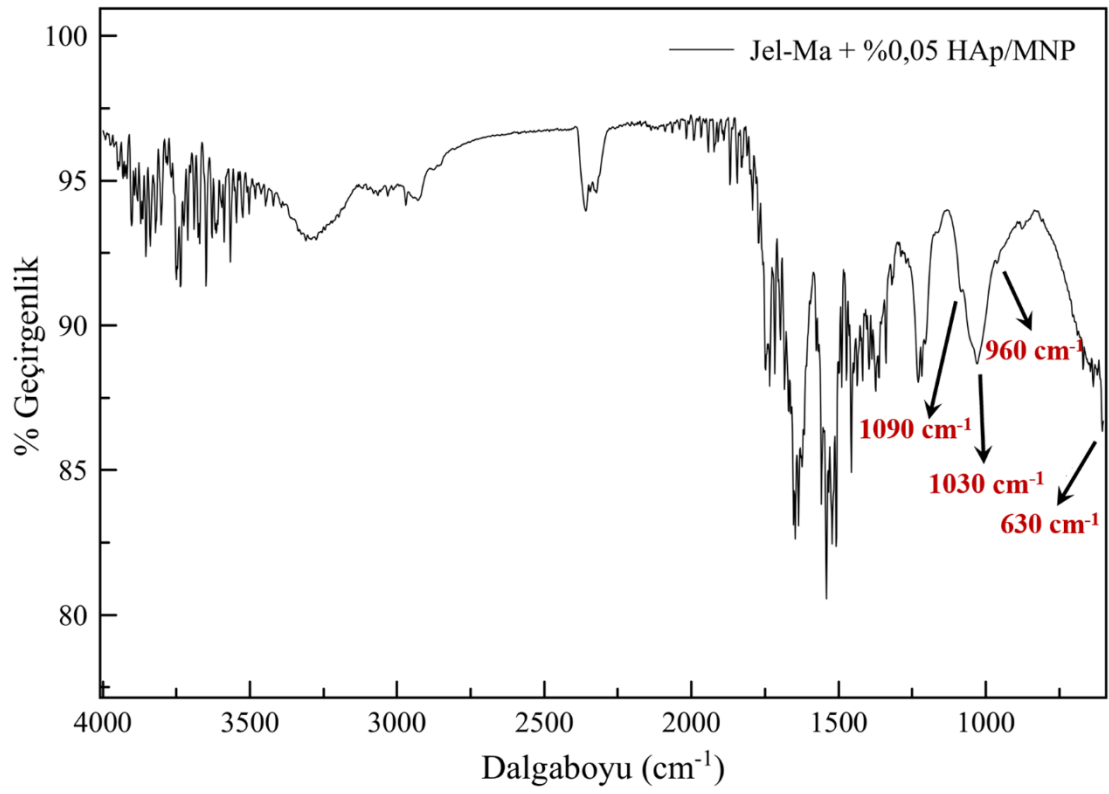
%12,5 Jel-MA konsantrasyonuna sahip biyomürekkep ile basımı gerçekleştirilen mikro-dokular ve farklı konsantrasyonlarda HAp/MNP içeren Jel-MA+HAp/MNP kompozit biyomürekkeplerin hücresiz basımı ile üretilmiş çok katlı hibrit mikro-dokuların liyofilize edildikten sonra gerçekleştirilen FTIR analizi spektrumları **şekil 4.8**, **4.9** ve **4.10**'da sunulmaktadır.

Dalga boyuna karşılık % geçirgenlik pikleri incelenerek yapıdaki bileşenler teyit edilmiş ve literatür ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen Jel-MA spektrumu (**Şekil 4.8**) incelendiğinde, 3275 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} , ve 1520 cm^{-1} ve 1235 cm^{-1} pikleri belirgin olarak görülmektedir. Bunun yanında belirgin olarak farklı bir pik ile karşılaşılmamıştır.

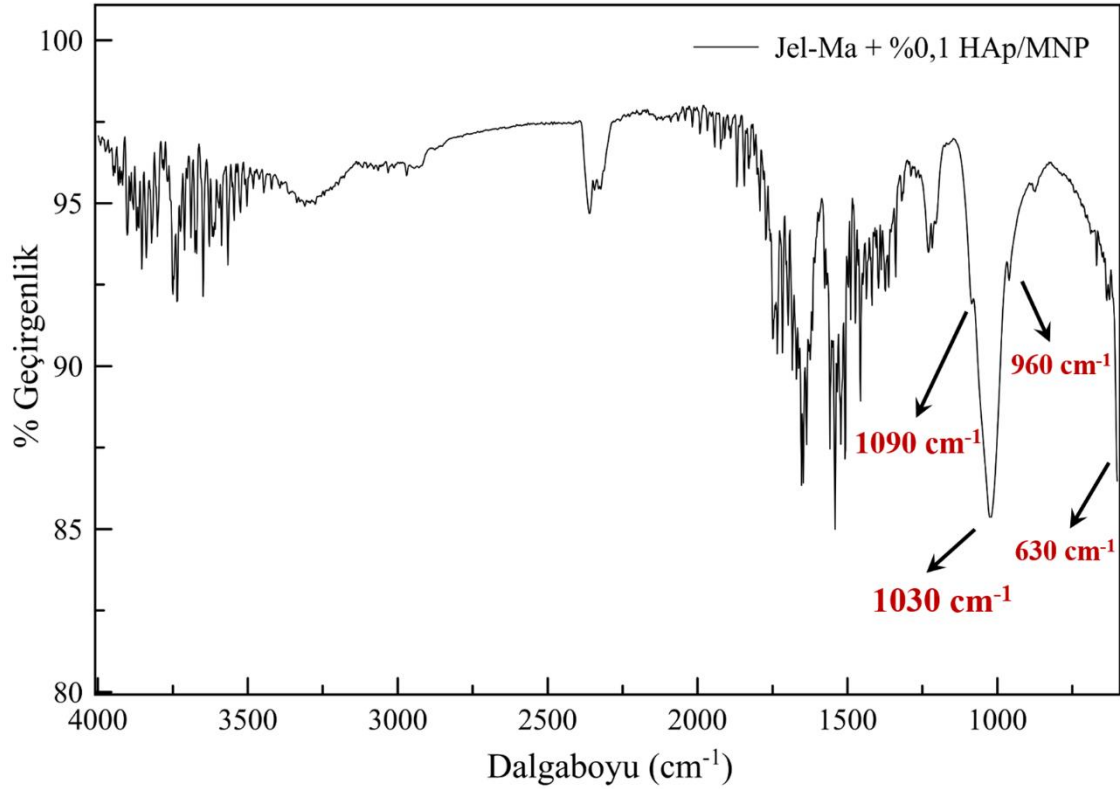


Şekil 4.8 %12,5 konsantrasyonunda hazırlanan Jel-MA biyomürekkebine ait FTIR spektrumu

Jel-MA+HAp/MNP kompozit biyomürekkepleri ile hüresiz basılan yapıların FTIR spektrumları incelendiğinde, **şekil 4.8**'de gözlenen piklere ilaveten 1030 cm^{-1} dalgaboyundaki pik belirgin biçimde gözlenebilmiştir (**Şekil 4.9**). Ayrıca HAp kaplı MNP içeriği %0,05'den %0,1'e yükseldiğinde bu pikin kuvvetlendiği görülmüştür (**Şekil 4.10**).



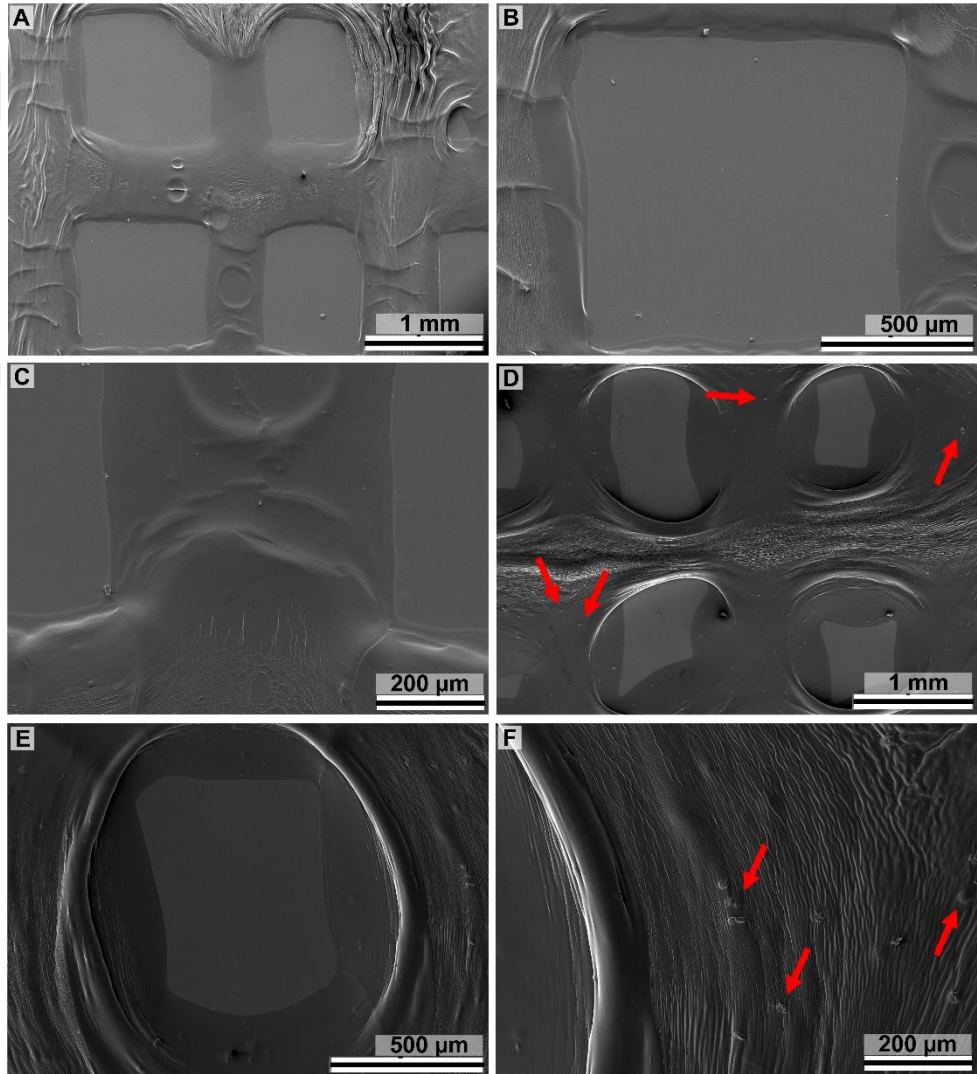
Şekil 4.9 Jel-MA + %0,05 HAp/MNP kompozit biyomürekkebine ait FTIR spektrumu



Şekil 4.10 Jel-MA + %0,1 HAp/MNP kompozit biyomürekkebine ait FTIR spektrumu

4.1.3 SEM bulguları

Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkepleri ile hücresiz olarak yapılan 3BB işlemi sonrası elde edilen yapıların SEM analizi görüntüleri **şekil 4.11**'de sunulmuştur. Farklı büyültmelerde elde edilen görüntülere göre tasarımı yapılan mikro-doku taslağı ile basım sonrası elde edilen şeklin benzerlik taşıdığı ve 500 μm olarak tasarlanan lif kalınlıklarına ulaşılabilirdiği görülmüştür. **şekil 4.11-D,E,F'** deki görüntülerde (Jel-MA + HAp/MNP) Jel-MA içerisine katkılanan HAp/MNP parçacıkları belirgin olarak görülmektedir.



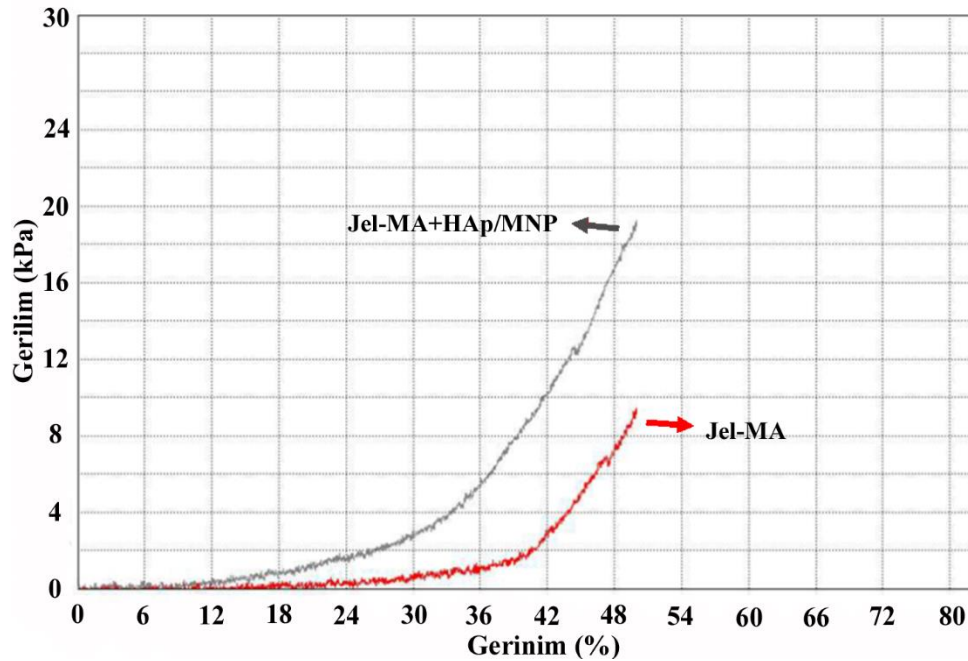
Şekil 4.11 %12,5 Jel-MA (A,B,C) ve HAp/MNP içeren Jel-MA (D,E,F) ile üç-boyutlu basımı yapılan katlı yapıların elektron mikroskobu görüntüleri.

(kırmızı oklar HAp/MNP parçacıklarını işaret etmektedir.)

4.1.4 Mekanik basma testi bulguları

Üç-boyutlu biyoyazıcı ile hücresiz olarak basılmış olan mikro-doku taslaklarının mekanik basma testi analizleri iki farklı grup için gerçekleştirilmiştir. Bu gruplar sırasıyla (i) %12,5 Jel-MA biyomürekkebi ile basılmış olan mikro-doku taslağı ve (ii) %12,5 Jel-MA + %0,1 HAp/MNP biyomürekkebi ile basılmış mikro-doku taslağıdır.

Basma testleri sonuçlarından elde edilen verilerin ortalaması ile % gerinime karşılık gerilim olarak oluşturulan grafik incelendiğinde (Şekil 4.12) Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkebi ile basılan katlı hibrit yapıların Jel-MA biyomürekkebi ile basılan katlı yapılara göre mekanik basma dayanımının %50 esneme oranında yaklaşık 2 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Mekanik basma testleri sonucunda maksimum %50'lik gerinime karşılık uygulanan maksimum gerilim değerleri, ortalama ve standart sapma değerleri çizelge 4.1'de verilmiştir. Maksimum gerilme ortalaması Jel-MA grubunda 9,320 iken Jel-MA+HAp/MNP grubunda ise 20,44 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.12 Jel-MA (kırmızı) ve Jel-MA+HAp/MNP (gri) biyomürekkepleri ile basılmış katlı yapıların mekanik basma testi (ortalama) sonuçları

Çizelge 4.1 Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkepleri ile basımı yapılan 3B yapıların basma testi maksimum gerilme ve maksimum esneme verileri

Biyomürekkep	Örnek No	Maksimum Gerilim (kPa)	Maksimum Gerinim (%)
Jel-MA	1	9,4334	50,0083
	2	10,744	49,8933
	3	7,7804	49,7750
	Ortalama	9,320	49,8922
	Standart Sapma	<u>1,485</u>	0,11665
Jel-MA + HAp/MNP	1	16,554	50,0045
	2	19,232	50,0083
	3	25,534	50,0040
	Ortalama	<u>20,44</u>	50,0056
	Standart Sapma	<u>4,61046</u>	0,002352

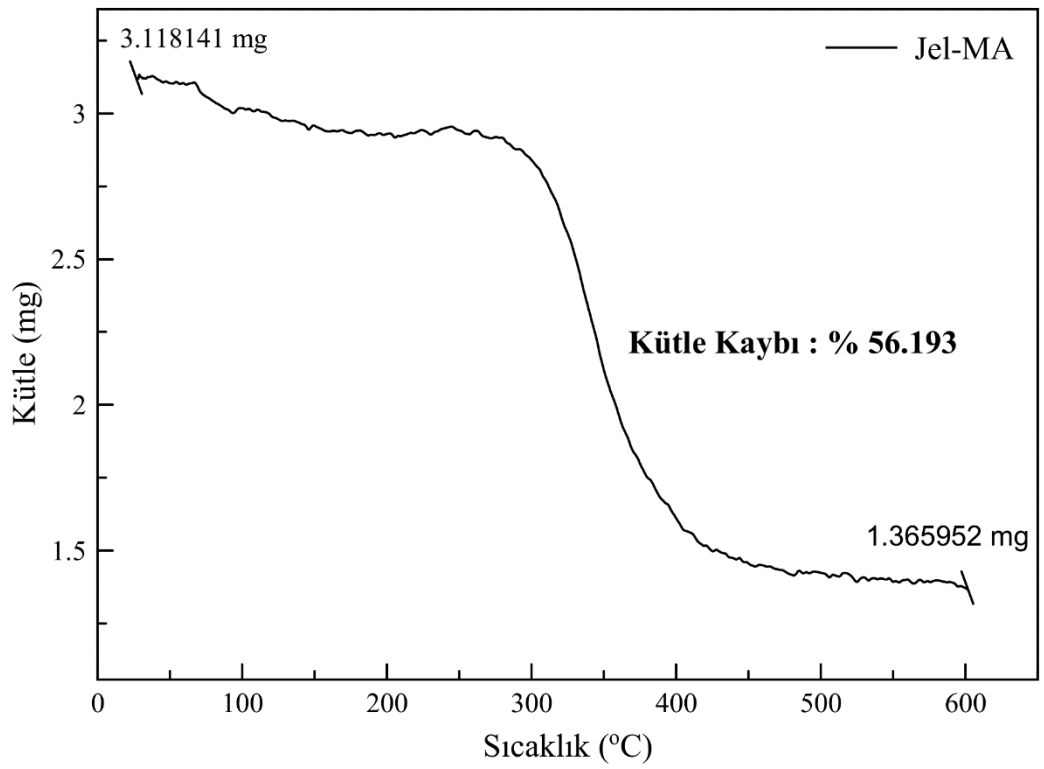
4.1.5 TGA bulguları

Kurutulan örneklerin TGA analizi sonuçları incelendiğinde %12,5 oranında Jel-MA ile hazırlanmış biyomürekkebin basımı sonrasındaki nihai yapıdan 3,118141 mg TGA panına yerleştirilmiş ve 600°C'ye ulaşıldıktan sonra yapının son kütlesinin 1,365952 mg olduğu ölçülmüştür (**Şekil 4.13**).

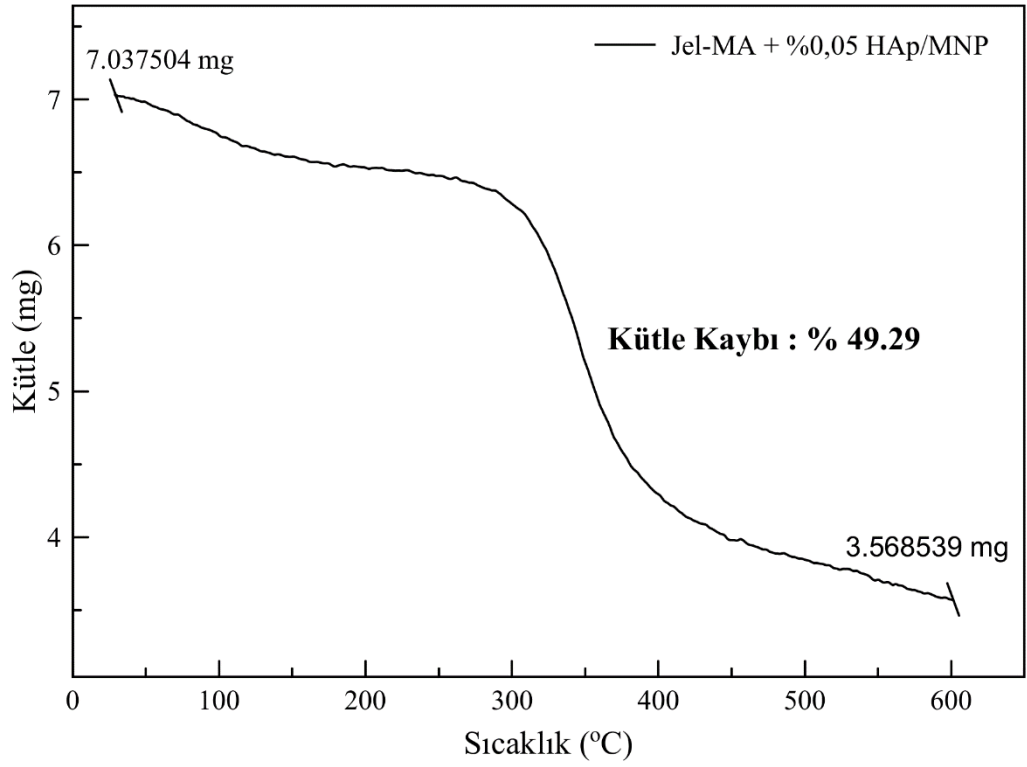
%0,05 oranında HAp/MNP içeren %12,5'lik Jel-MA biyomürekkebi ile basılmış yapıdan 7,037504 mg TGA panına yerleştirilmiş ve yine 600°C sıcaklığa ulaşıldığında 3,568539 mg kütleye sahip yapının kaldığı ölçülmüştür (**Şekil 4.14**).

%0,1 oranında HAp/MNP içeren %12,5'lik Jel-MA biyomürekkebi ile basılmış çok katlı yapıdan 8,797956 mg pana yerleştirilmiş ve 600°C'de 4,867905 mg kütleli yapının kaldığı ölçülmüştür (Şekil 4.15).

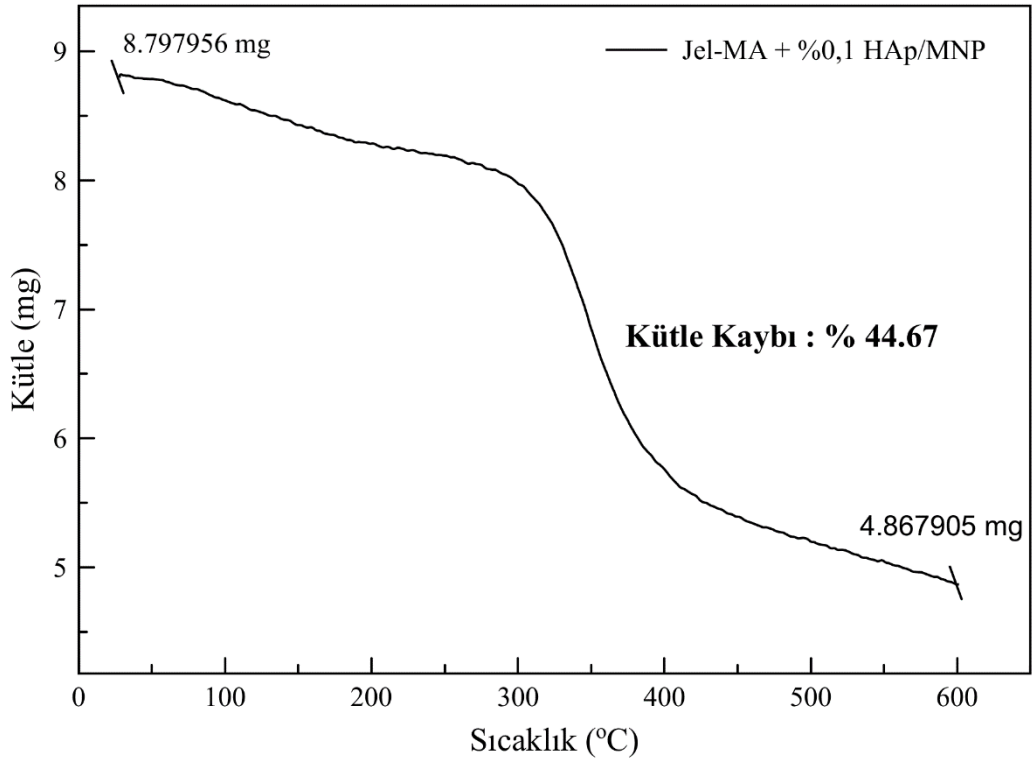
Elde edilen verilere göre Jel-MA için %56, %0,05 HAp/MNP katkılanmış Jel-MA için %49 ve %0,1 HAp/MNP katkılanmış Jel-MA için %44 kütle kaybı sonuçları elde edilmiştir.



Şekil 4.13 %12,5 Jel-MA biyomürekkebine ait TGA (% kütle kaybı) sonuçları



Şekil 4.14 %0,05 HAp/MNP ile katkılanmış %12,5 Jel-MA biyomürekkebine ait TGA (% kütle kaybı) sonuçları

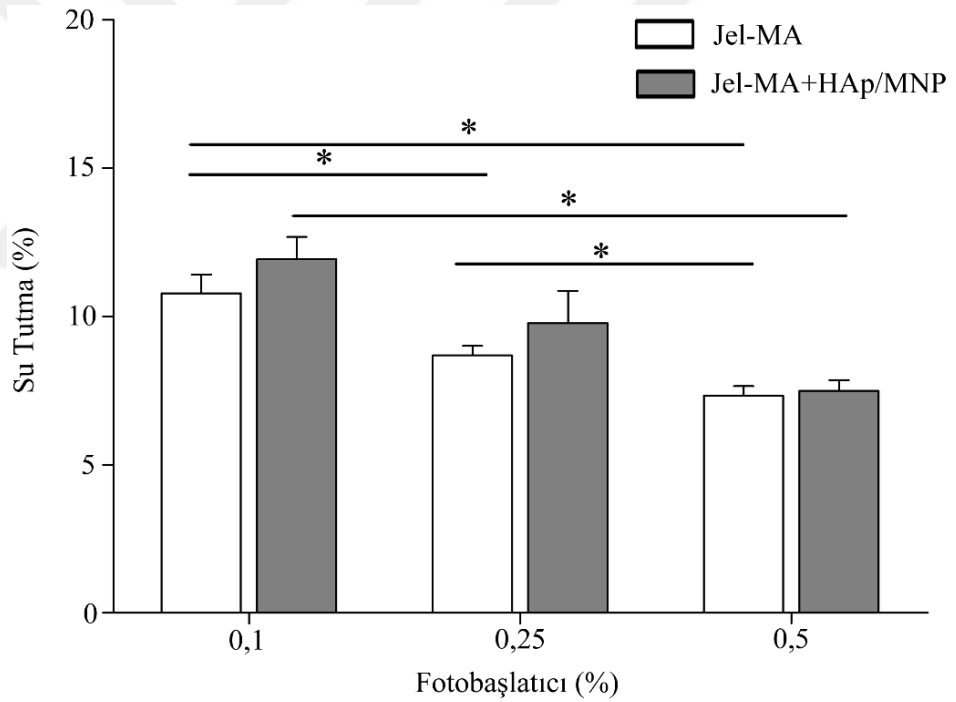


Şekil 4.15 %0,1 HAp/MNP ile katkılanmış %12,5 Jel-MA biyomürekkebine ait TGA (% kütle kaybı) sonuçları

4.1.6 Su tutma testi bulguları

%0,1, %0,25 ve %0,5 fotobaşlatıcı içeren Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkepleri ile oluşturulan yapıların 48 saat sonundaki su tutma oranlarını gösteren grafik **şekil 4.16**'da sunulmuştur. Elde edilen verilere göre, her iki biyomürekkep için içerisindeki fotobaşlatıcı oranları arttıkça su tutma (şişme) oranları belirgin şekilde düşmektedir.

Su tutma oranları incelendiğinde aynı fotobaşlatıcı oranı içeren Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkepleri arasında anlamlı farklar gözlenmemiştir.



Şekil 4.16 %0,1, %0,25 ve %0,5 fotobaşlatıcı içeren Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkepleri ile oluşturulan yapıların %Su tutma (şişme) sonuçları

(* p< 0,05)

4.2 Çapraz Bağlanma Optimizasyon Bulguları

Sentezi gerçekleştirilen Jel-MA biyomürekkebinin reolojik karakterizasyonları ile birlikte çapraz bağlanma optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda UV ışığına maruziyet süresi, UV ışık kaynağına olan mesafe ve Irgacure 2959 konsantrasyonu bakımından Jel-MA biyomürekkeplerin çapraz bağlanabilirliği ile ilgili gözlenen sonuçlara bağlı olarak yapılan skorlamalar **çizelge 4.2** ve **çizelge 4.3**' de sunulmuştur.

Çizelge 4.2 %0,25, %0,5 ve %1 Irgacure içeren biyomürekkeplerin farklı maruziyet sürelerindeki çapraz bağlanma skorlamaları.
– (etkisiz), + (etkili), ++ (çok etkili)

10 cm mesafe		UV Maruziyet Süreleri (saniye)					
		15	30	45	60	90	120
UV Fotobaşlatıcı İçeriği (%)	0,25	-	-	-	-	+	+
	0,5	-	-	-	+	+	++
	1	-	-	+	+	+	++

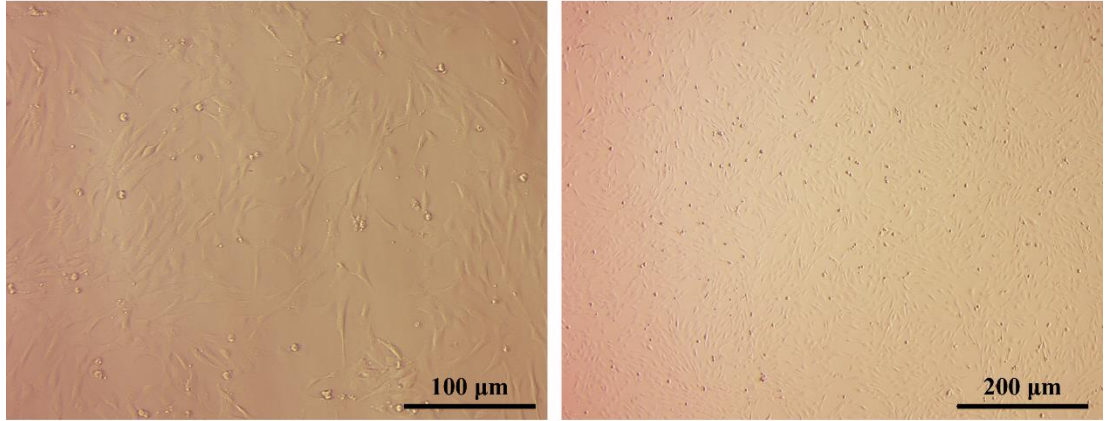
Çizelge 4.3 %0,5 Irgacure içeren biyomürekkeplerin farklı mesafe ve maruziyet sürelerindeki çapraz bağlanma skorlamaları.
– (etkisiz), + (etkili), ++ (çok etkili)

%0,5 Irgacure		UV Maruziyet Süreleri (saniye)					
		15	30	45	60	90	120
UV Işık Kaynağına Mesafe (cm)	3	-	-	+	++	++	++
	5	-	-	+	+	++	++
	7	-	-	+	+	++	++
	10	-	-	-	+	+	++

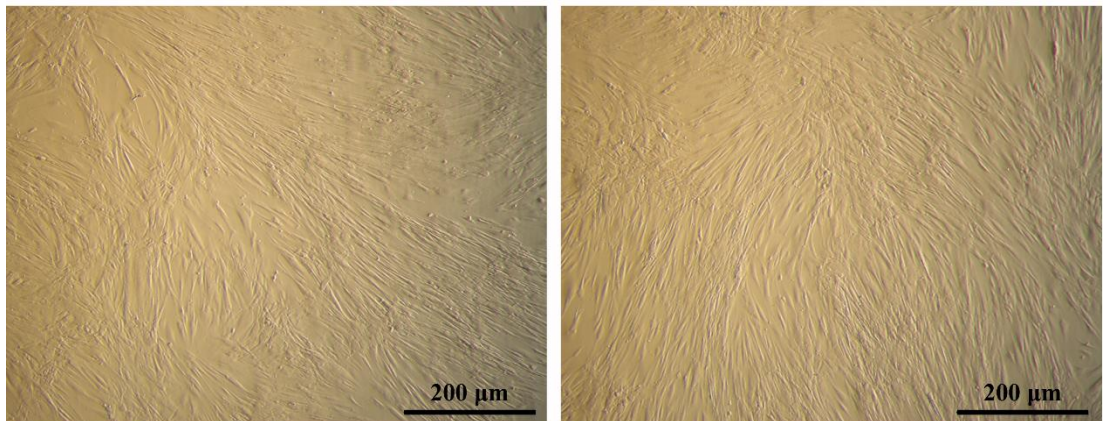
4.3 Hücre Kültürü Takibine Ait Karakterizasyon Bulguları

4.3.1 Faz-kontrast mikroskopi bulguları

Ticari olarak temin edilen insan alveolar OB ve PDLF hücrelerinin kültür ve pasajlama işlemleri boyunca çekilen farklı büyütme değerlerindeki faz-kontrast mikroskopi görüntüleri **şekil 4.17** ve **şekil 4.18**'de sunulmuştur. OB ve PDLF hücrelerinin mikroskopi görüntülerine göre tipik morfolojide oldukları ve çoğalma özelliklerini belirgin biçimde gösterdikleri görülmüştür.



Şekil 4.17 İnsan alveolar OB hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu görüntüleri

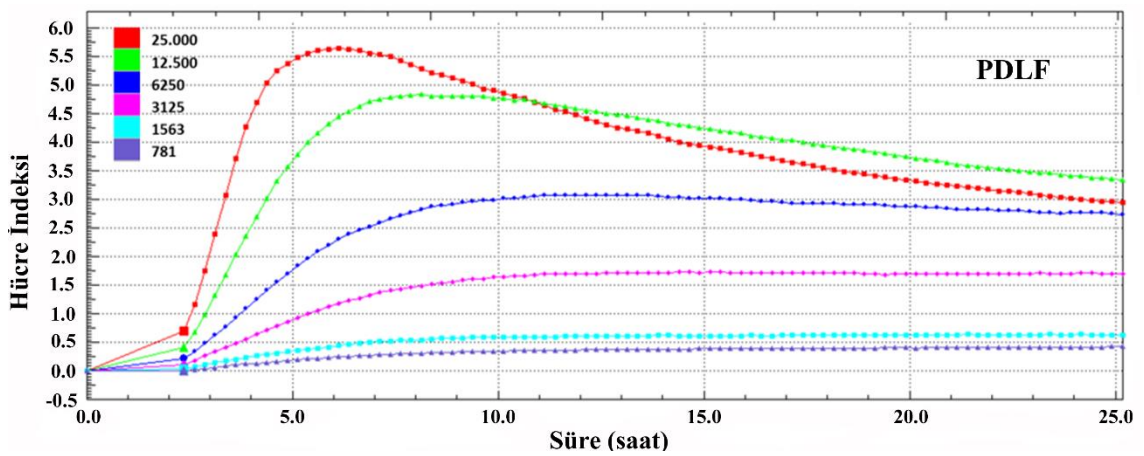


Şekil 4.18 İnsan PDLF hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu görüntüleri

4.3.2 Hücrelerin proliferasyon kapasitesi bulguları

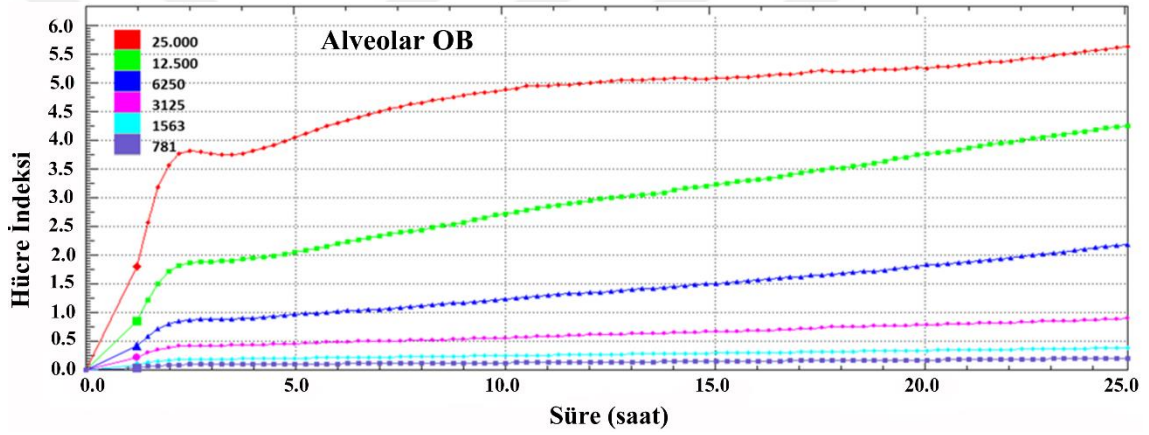
Farklı yoğunluklarda (25.000, 12.500, 6.250, 3.125, 1563 ve 781 hücre/kuyucuk) ekilen insan PDLF ve insan alveolar OB hücrelerinin proliferasyon kapasite eğrileri, sırası ile **şekil 4.19** ve **şekil 4.20**'de sunulmaktadır. Ayrıca **şekil 4.21**'de insan PDLF ve alveolar OB hücrelerinin kültür süresinde 1., 3. ve 7. Günlerdeki alamar mavisi sonuçları sunulmaktadır. **Şekil 4.19**'daki insan PDLF ve alveolar OB hücrelerinin büyüme eğrilerinden elde edilen maksimum hücre indeksi değerleri **çizelge 4.4**'de verilmiştir. Elde edilen bu veriler incelendiğinde beklendiği gibi hücre yoğunluğu arttıkça hücre indeksi değerlerinin arttığı görülmektedir.

Aynı zamanda, en yüksek hücre yoğunluğunda (25.000 hücre), maksimum hücre indeksi değerine ilk 6. saatte ulaşılırken, bu sürenin ekilen hücre sayısı azaldıkça arttığı görülmektedir. Bununla birlikte, yüksek hücre yoğunluklarında (25.000 ve 12.500 hücre), hücre indeksi değeri hücre ilavesinden hemen sonra artmış olup, maksimum değerine ulaştıktan belli bir süre sonra hücre indeksi değerlerinde bir düşüş meydana gelmiş (sırasıyla 7. ve 11. saati takiben) ve sonrasında hücre indeksi değeri sabit kalmıştır. Diğer hücre yoğunluklarında ise (6.250, 3.125, 1563 ve 781 hücre/kuyucuk) hücre indeksi değerlerinin hücre eklenmesinden hemen sonra artmaya başlayarak maksimum değere ulaştığı ve bu değerde sabit kaldığı görülmektedir.



Şekil 4.19 Farklı yoğunluklarda ekimi yapılan insan PDLF hücrelerinin 24 saat içerisinde elde edilen proliferasyon eğrileri

Şekil 4.20'deki osteoblast hücrelerinin büyüme eğrileri incelendiğinde ise, insan periodontal ligament fibroblast hücrelerinin büyüme eğrilerine benzer şekilde, hücre yoğunluğu arttıkça hücre indeksi değerlerinin arttığı görülmektedir. Fakat osteoblast hücrelerinde insan periodontal ligament fibroblast hücrelerinden farklı olarak, hücre indeksi değerlerinin 24 saat boyunca arttığı görülmektedir. Her hücre için elde edilen tüm bu verilere göre, hücre ilavesinden hemen sonra, hücre indeksi değerlerinin artmaya başladığı ve hücrelerin e-plakanın tabanına yapışmaya başladığı görülmektedir. 24 saat süresince, her iki hücrenin hücre yoğunluğuyla orantılı bir hücre indeksi değişimi gösterdiği ve her iki hücre için hücre proliferasyon kapasitesi eğrilerinin farklılık gösterdiği görülmektedir



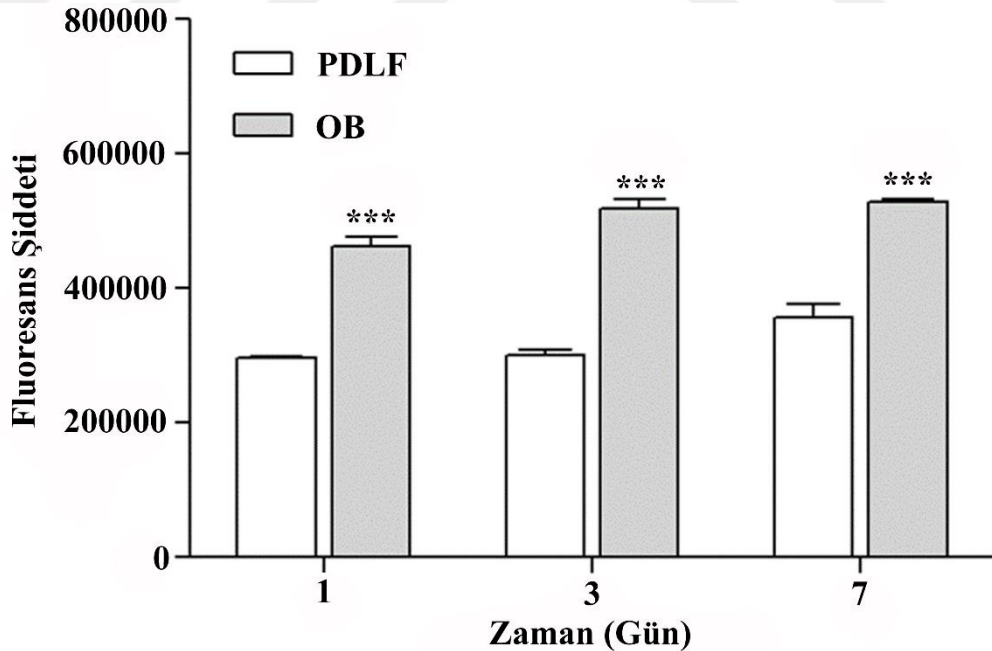
Şekil 4.20 Farklı yoğunluklarda ekimi yapılan insan alveolar OB hücrelerinin 24 saat içerisinde elde edilen proliferasyon eğrileri

Çizelge 4.4 Farklı yoğunluklarda ekimi yapılan PDLF ve alveolar OB hücrelerinin yaklaşık maksimum indeksleri

Hücre Yoğunluğu (hücre/kuyucuk)	Maksimum Hücre İndeksi (~)	
	PDLF	Alveolar OB
25000	5,5	5,6
12500	4,7	4,3
6250	3,0	2,2
3125	1,6	0,9
1563	0,5	0,4
781	0,4	0,2

Şekil 4.21'de, 6 kuyucuklu hücre kültür kabına aynı yoğunlukta ekilen insan periodontal ligament fibroblast ve osteoblast hücrelerinin 1., 3. ve 7. günlerde elde edilen Alamar mavisi test sonuçları sunulmuştur. Elde edilen bulgulara, periodontal ligament fibroblast hücrelerinin ve osteoblast hücrelerinin kültür süresince canlılıklarını arttırarak korudukları görülmektedir. Tüm zaman noktalarında, osteoblast hücrelerinin flüoresan şiddetinin periodontal ligament fibroblast hücrelerinden daha yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0.001$).

Faz-kontrast mikroskopunda günlük olarak yapılan gözlemlerde, osteoblast hücrelerinin çoğalma hızının, periodontal ligament fibroblast hücrelerinin çoğalma hızından daha fazla olduğu; dolayısı ile, osteoblast hücrelerinin daha kısa bir zamanda kültür kabında doygunluğa ulaştığı görülmüştür. Aynı zamanda, her iki hücrenin hücre büyüme eğrileri karşılaştırıldığında (**Şekil 4.19** ve **Şekil 4.20**), 24 saatin sonunda elde edilen hücre indeksi değerlerinin, 1. gündeki Alamar mavisi sonuçları ile benzer şekilde, osteoblast hücresinde daha fazla olduğu görülmektedir.

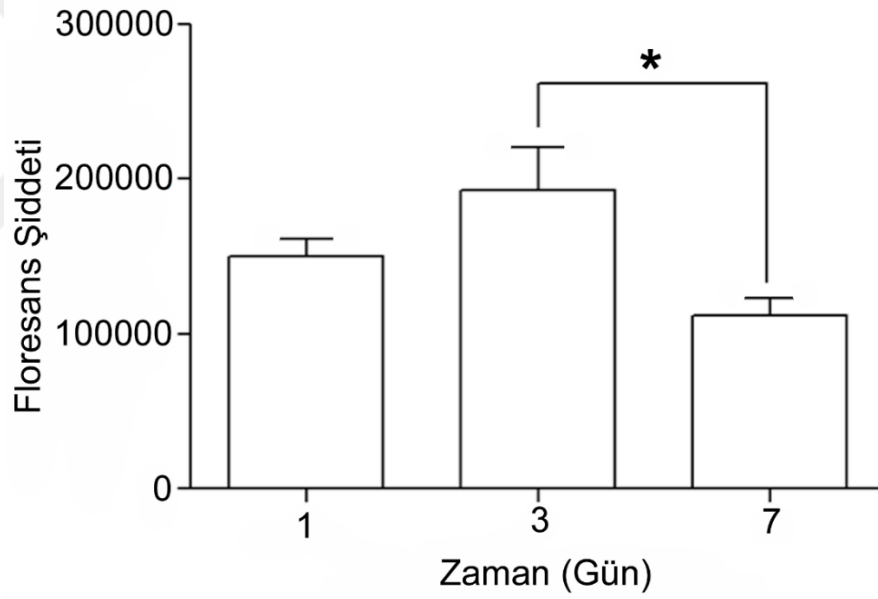


Şekil 4.21 İnsan periodontal ligament fibroblast ve osteoblast hücrelerinin Alamar mavisi test sonuçları. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiş ($n=3$), hücrelerin flüoresans değerleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizlerde iki-yönlü ANOVA ve Bonferroni post-hoc testleri kullanılmıştır (***) $p < 0.001$

4.4 Perio/Osteo mikro-doku taslaklarının karakterizasyonuna ait bulgular

4.4.1 Alamar mavisi bulguları

Mikroakışkan temelli çip içerisinde kültürü sürdürülen iki katlı perio/osteo mikro-doku taslaklarının belirlenen zaman noktalarındaki Alamar mavisi analizleri **şekil 4.22**'de sunulmaktadır. Elde edilen bulgulara, hücrelerin mitokondriyel dehidrogenaz aktivitelerini kültür süresince korudukları görülmektedir. **Şekil 4.22**'de görüldüğü gibi floresans şiddetinin 3. günde yaklaşık 1,3 kat arttığı görülmüştür. 7 günde ise 3. güne kıyasla floresans şiddetinde bir azalma ($p < 0.05$) olduğu görülmüştür.



Şekil 4.22 Hücreli basımı gerçekleştirilen perio/osteo mikro-doku taslaklarının Alamar mavisi test sonuçları

(* $p < 0.05$)

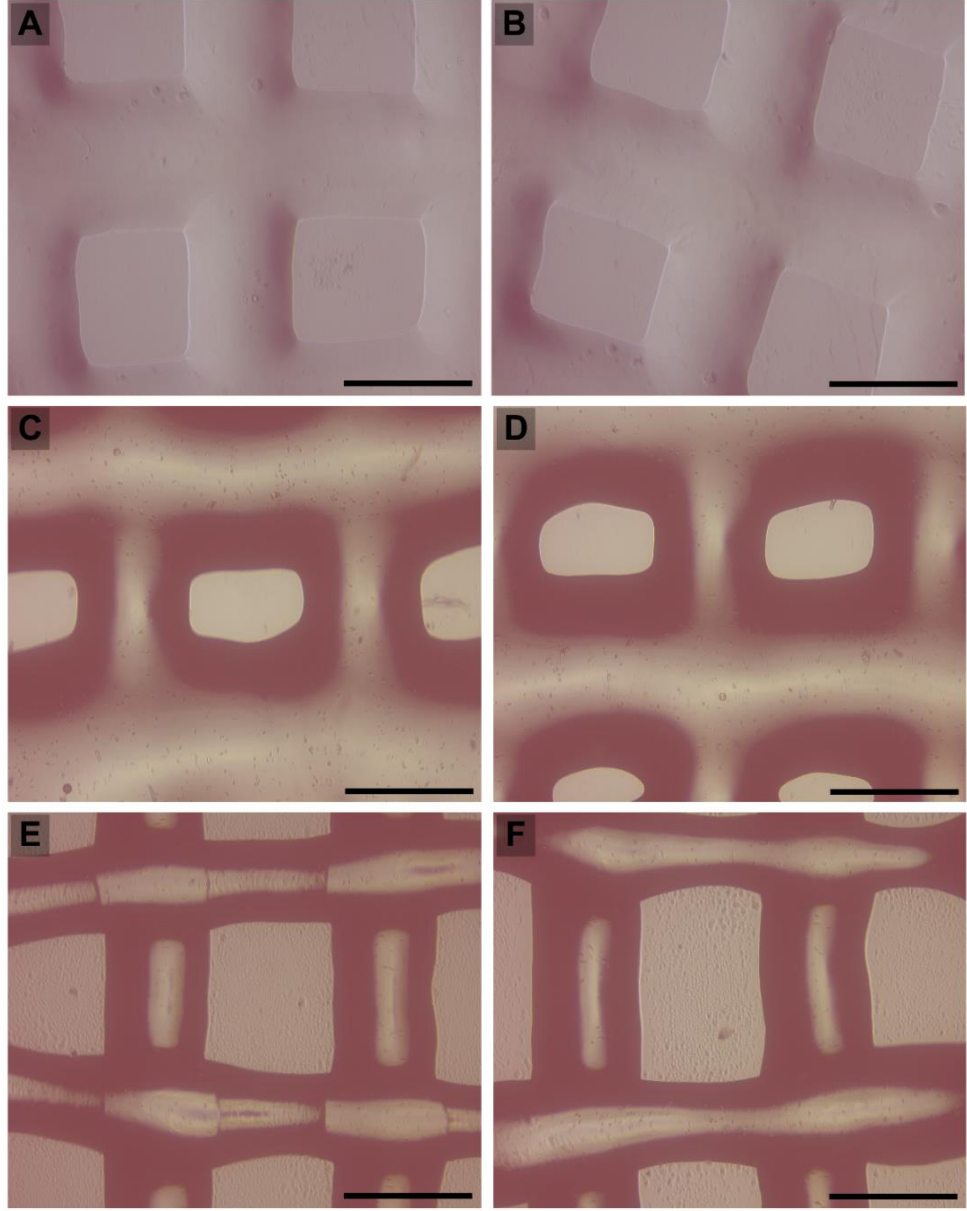
4.4.2 Mikroskopi analizlerine ait bulgular

4.4.2.1 Faz-kontrast mikroskobu bulguları

Hücreli olarak biyobasımı yapılan katlı perio/osteo mikro-doku taslaklarının 3BB işlemleri sonrası mikroskobik incelemeleri faz-kontrast mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. Hücre dağılımı ve yoğunluğunun incelendiği bu aşamada, iki farklı katmanda 2 farklı hücre kullanmak yerine her katta aynı hücre kullanılmıştır ve bu işlem alveolar OB ve PDLF hücreleri için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.

Gerçekleştirilen üç-boyutlu biyobasımlarda hücre yoğunluğu yine 4×10^6 olarak uygulanmıştır. 3BB ile hücreli ve hücreli olarak üretilen 3B yapıların mikroskop görüntüleri **şekil 4.23**'de sunulmaktadır. Elde edilen görüntüler incelendiğinde her iki hücre tipinin de biyomürekkep içerisinde yani 3B yapıda oldukça homojen bir şekilde dağıldıkları ve yoğunluklarının oldukça yeterli miktarda olduğu görülmüştür (**Şekil 4.23 C-F**).

Şekil 4.23-A,B hücreli olarak basımı yapılan biyomürekkep ile elde edilen 3B yapının mikroskop görüntüsü, **şekil 4.23-C,D** alveolar OB hücreleri ile basılmış 3B yapıların mikroskop görüntüleri, **şekil 4.23-E,F** ise PDLF hücreleri ile basılmış 3B yapıların mikroskop görüntüleridir.



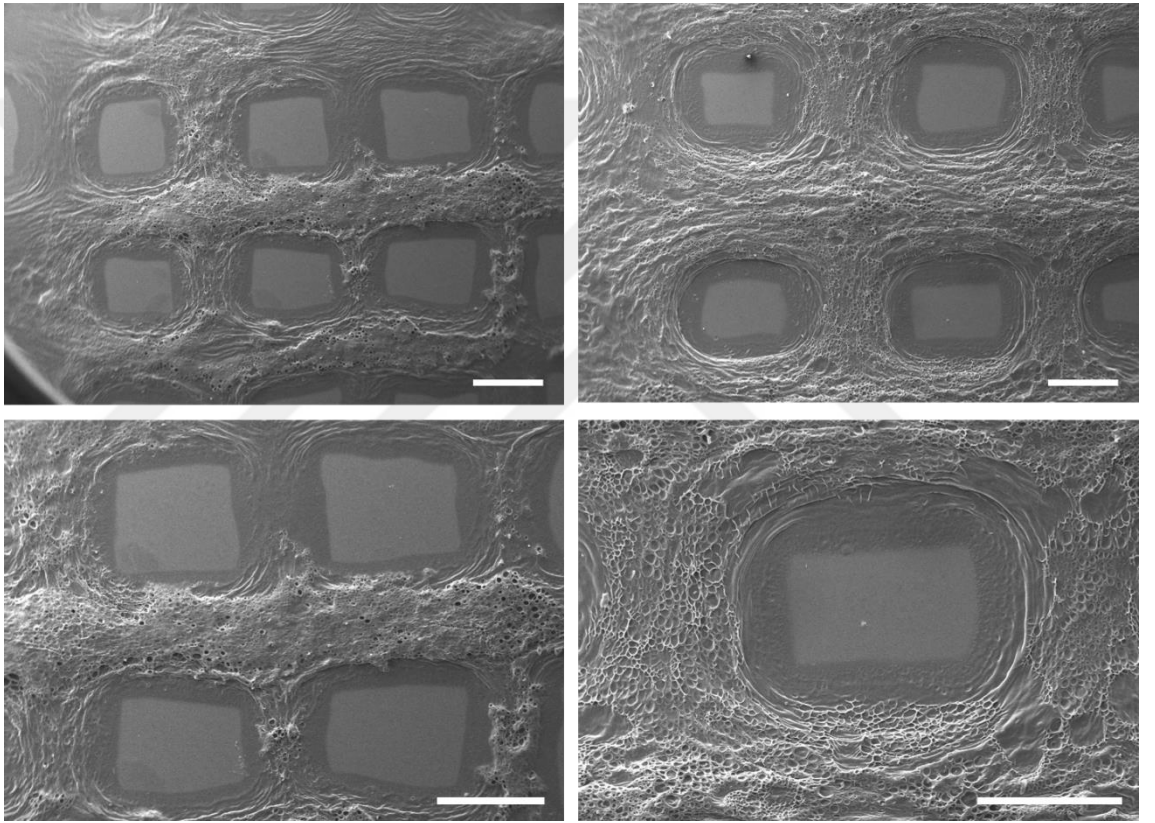
Şekil 4.23 3BB ile elde edilen yapıların faz-kontrast görüntüleri. (A,B) Hücresiz katlı yapı, (C,D) OB hücreleri ile basılmış katlı yapı, (E,F) PDLF hücreleri ile basılmış katlı yapı

Boyut çubukları: 500μm.

4.4.2.2 SEM bulguları

Mikroakışkan çip içerisinde kültürü sürdürülen katlı hibrit mikro-doku taslaklarının yapısal bütünlükleri ve yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu ile analiz edilmiş olup SEM görüntüleri **şekil 4.24**'de sunulmaktadır.

Farklı büyütme değerleri ile elde edilen görüntüler detaylı olarak incelendiğinde tasarımı yapılan mikro-doku taslağı ile biyobasım sonrası elde edilen üç-boyutlu yapının büyük ölçüde benzerlik taşıdığı ve 500 μm olarak tasarlanan lif kalınlıklarına ulaşılabilirdiği görülmüştür. Örnek hazırlama aşamasında %2,5 glutaraldehit ile tespit etme, altın ile kaplama işlemlerinde ve SEM cihazı için gereken yüksek vakum değerlerinde az da olsa deformasyona uğramalarına rağmen genel anlamda katlı 3B yapının çok yüksek oranda korunduğu görülmüştür.



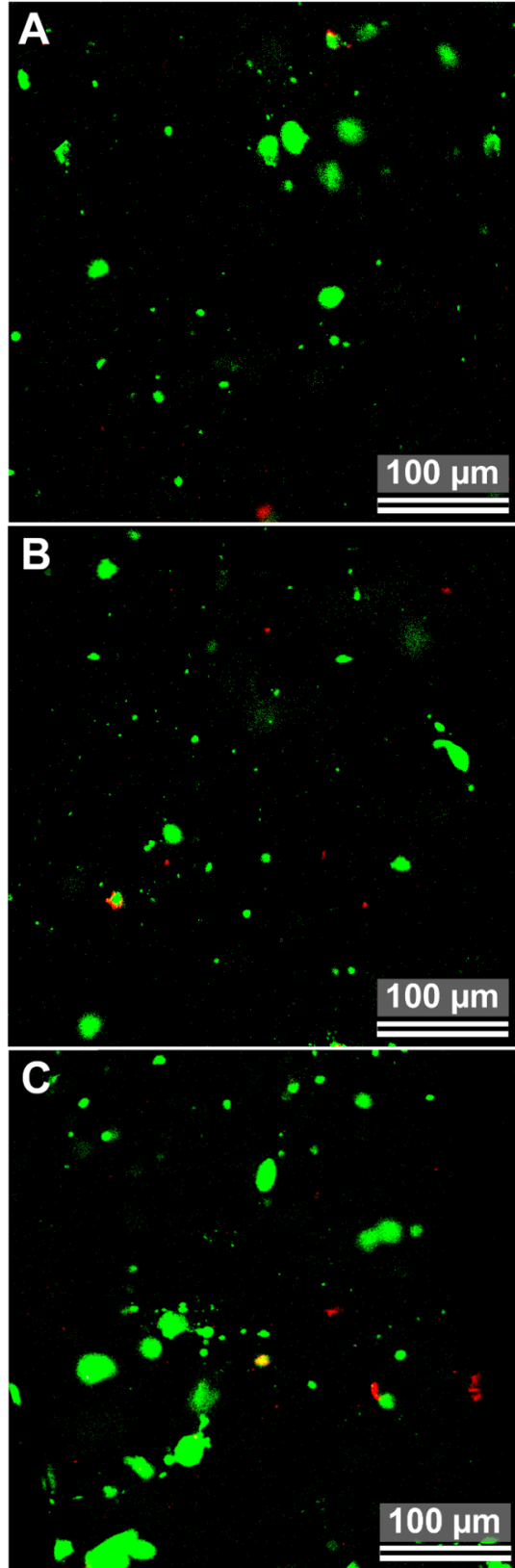
Şekil 4.24 Mikroakışkan çip içerisinde kültürü sürdürülen katlı hibrit mikro-doku taslaklarının elektron mikroskobu görüntüleri

Boyut çubukları: 500 μm .

4.4.3 Konfokal lazer mikroskopi (Live&Dead) analizine ait bulgular

Üç-boyutlu biyobasımı yapılan ve mikroakışkan temelli çip içerisinde kültürü sürdürülen örneklerin 12. saat, 3. gün ve 7. gün zaman noktalarında çekilmiş konfokal mikroskopi görüntüleri **şekil 4.25**'de sunulmaktadır.

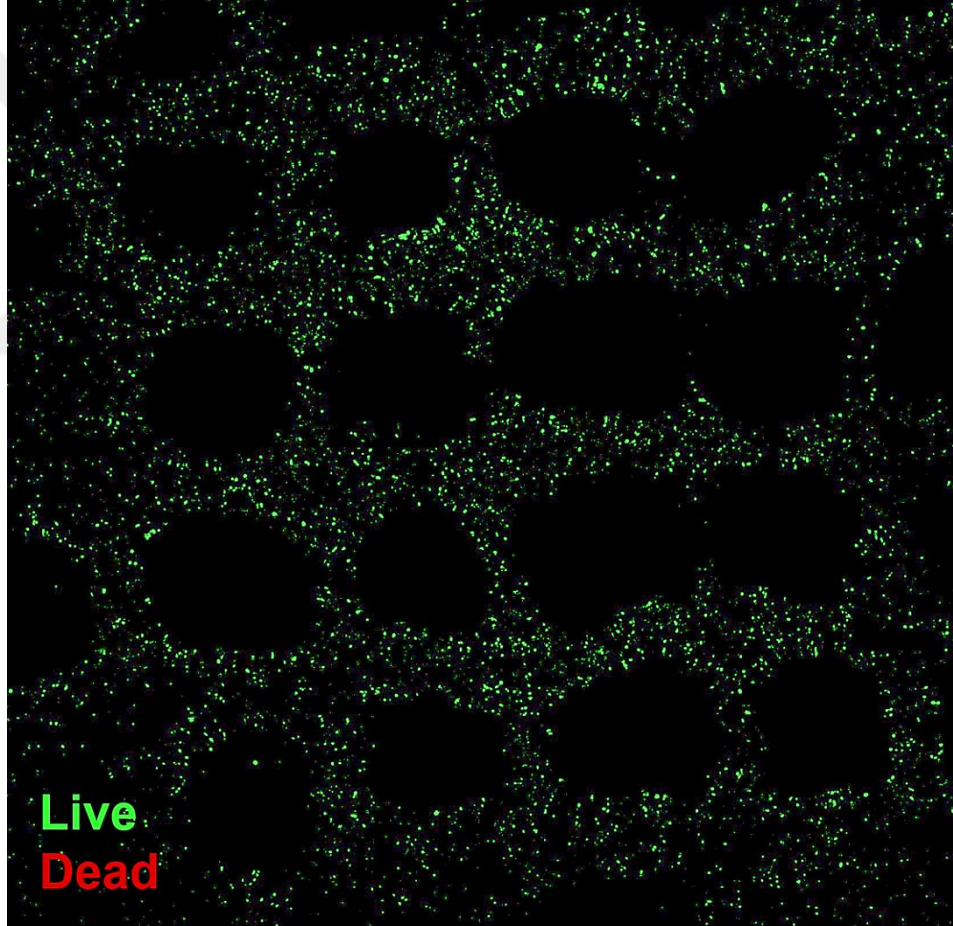
Bulgular, her üç zaman noktasında alınan görüntülerdeki hücrelerin biyobasılmış jel yapı içerisinde homojen olarak dağıldığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, canlı hücreler tarafından alınan kalsein reaktifini gösteren yeşil boyamanın tüm zaman noktalarındaki hücrelerde hâkim durumda olduğu dikkat çekmektedir (**Şekil 4.25**). Diğer yandan, kültürün 3. ve 7. günlerinde gözlemlenen çok sınırlı miktarlardaki kırmızı renkteki hücrelerin varlığı ise, ölü hücrelerin etidyum homodimer işaretlenmesini göstermektedir.



Şekil 4.25 Üç-boyutlu biyobasımı gerçekleştirilen ve mikroçip içerisinde kültüre alınan örneklerin 12. saat (A), 3. gün (B) ve 7. gün (C) zaman noktalarında alınmış konfokal mikroskopi görüntüleri

Üç-boyutlu biyobasımı gerçekleştirilen perio/osteo mikro-dokunun mikroakışkan çip içerisinde kültüre alınmadan önce çekilen konfokal mikroskopi görüntüsü de **şekil 4.26**'da verilmiştir. Elde edilen konfokal mikroskopi görüntüsüne göre hücrelerin 3B perio/osteo kafes modeli içerisinde hemen her yerde görüldükleri ve oldukça homojen dağıldıkları belirlenmiştir.

Elde edilen bu görüntüden ayrıca 3BB prosesinde uygulanan şartların biyomürekkep içerisindeki hücrelerin canlılığına herhangi bir etkisinin olmadığı da açıkça ortaya çıkmaktadır.

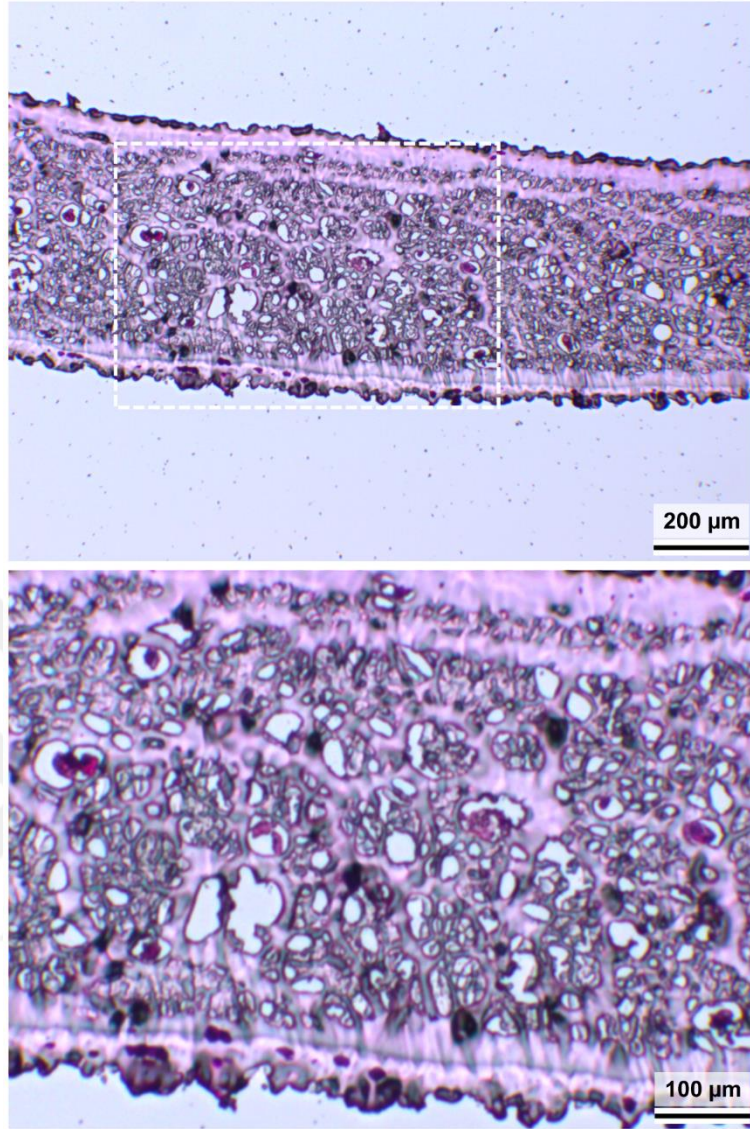


Şekil 4.26 3B mikro-dokunun mikroakışkan çip içerisinde kültüre alınmadan önce çekilen konfokal mikroskopi görüntüsü

4.4.4 Histokimyasal analizlere ait bulgular

4.4.4.1 Hematoksilin ve Eosin (H&E) boyaması bulguları

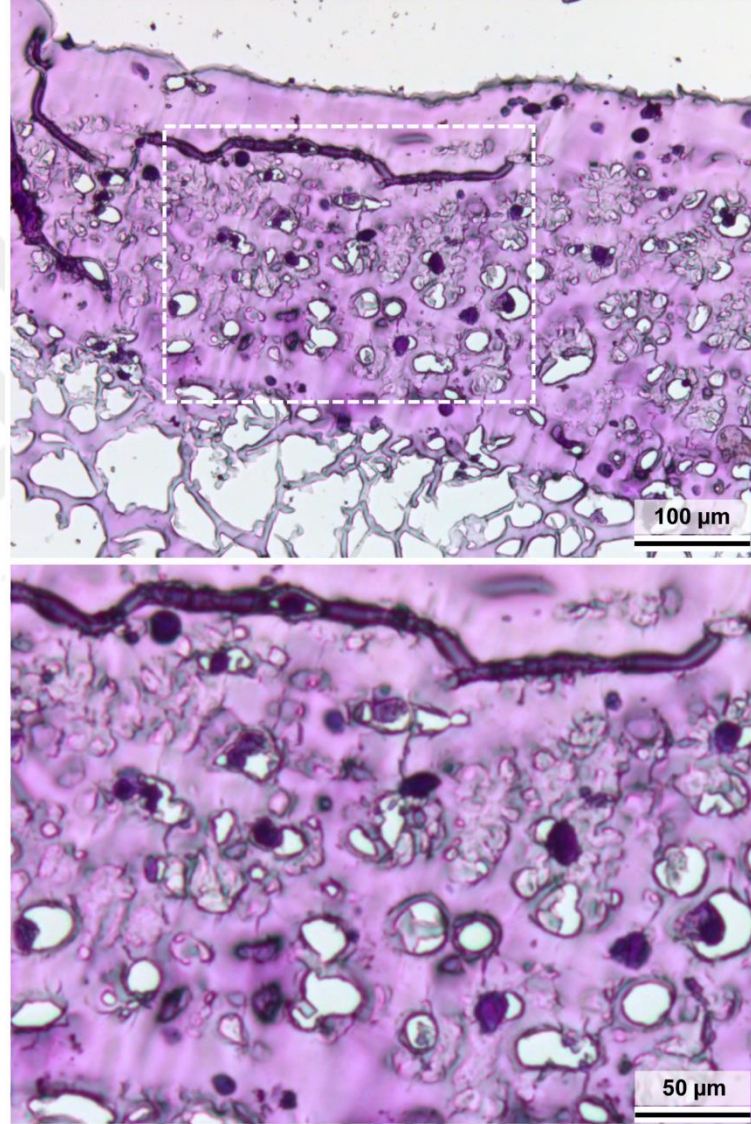
H&E boyaması, hücrelerin çekirdek ve sitoplazma ayrımında kullanılan yaygın bir histolojik boyadır. Hematoksilin hücre çekirdeğini lacivert renkte boyarken, Eosin ise hücre sitoplazmasını ve bağ dokusu elemanlarını pembe renkte boyamaktadır. Mikroçip sistemi içerisinde kültürü sürdürülen hibrit mikro-doku taslaklarındaki hücrelerin ve hücre dışı matriksin dağılımının değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen H&E boyamasına ait görüntüler **şekil 4.27**'de verilmektedir.



Şekil 4.27 Mikroakışkan temelli çip sisteminde kültürü sürdürülen hibrit mikro-dokunun 3. günde alınan ışık mikrografları (H&E boyaması)

4.4.4.2 Periyodik Asit - Schiff (PAS) boyaması bulguları

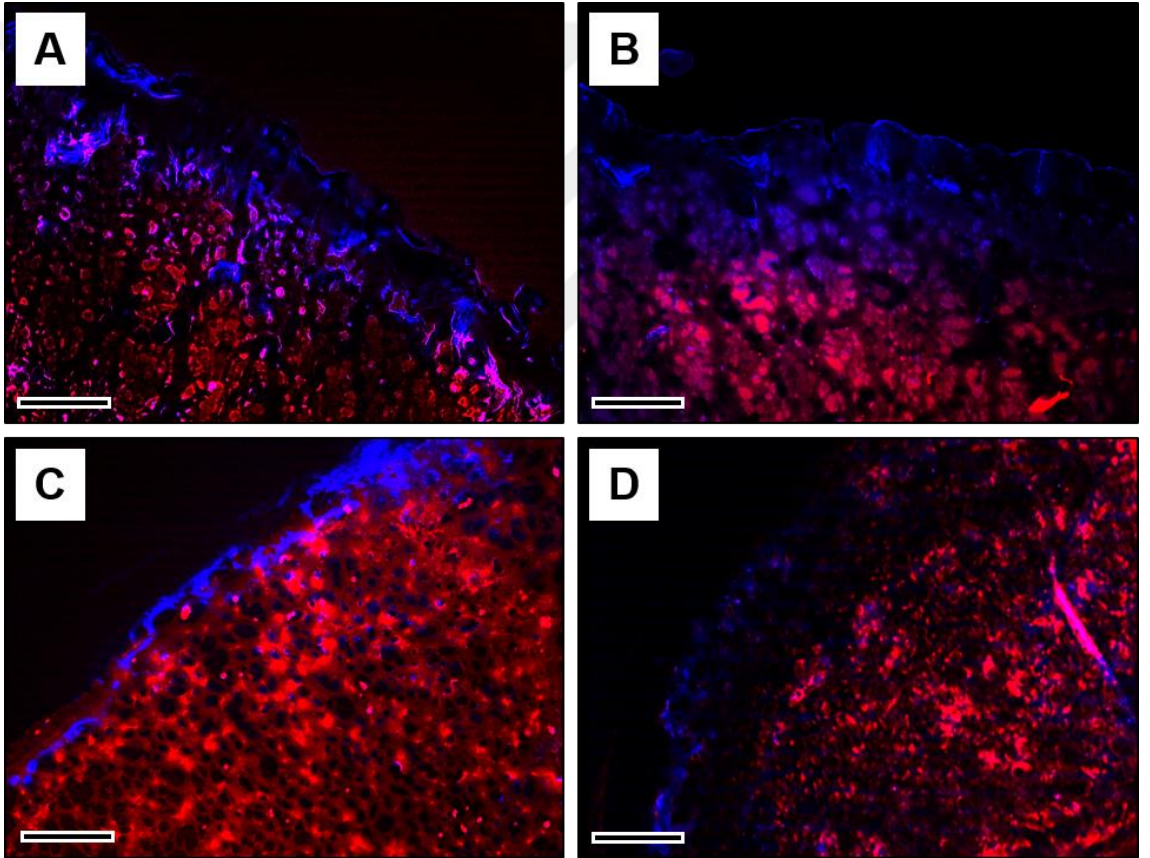
Mikroakışkan temelli çip sistemi içerisinde kültürü sürdürülen hibrit mikro-doku taslaklarındaki hücrelerin ve hücre dışı matriksin dağılımının değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen PAS boyaması bulguları **şekil 4.28**'de verilmektedir.



Şekil 4.28 Mikroakışkan temelli çip sisteminde kültürü sürdürülen hibrit mikro-dokunun 3. günde alınan ışık mikroagrafları (PAS boyaması)

4.4.5 İmmü Floresan analizlere ait bulgular

Mikroakışkan temelli çip içerisinde kültürü sürdürülen katlı hibrit mikro-doku taslaklarının yapısında yer alan periodontal ligament fibroblast hücreleri için pozitif olduğu bilinen STRO1 ve insan OB hücreleri için pozitif olduğu bilinen osteokalsin (OC) belirteçleri kullanılarak gerçekleştirilen immü floresan analizi bulguları **şekil 4.29**'da sunulmaktadır.



Şekil 4.29 OB ve PDLF tohumlanmış mikroçip sistemi içerisinde kültürü sürdürülen katlı mikro-doku taslaklarının kültürün farklı zaman noktalarına ait STRO1 ve osteokalsin immü floresan mikroskop görüntüleri

(A. 1.gün, B. 3.gün, C. 7.gün, D. 14. gün)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında üç-boyutlu biyobasım yöntemi ile kompozit ve heterojen özellikteki çift katlı perio/osteo (periodontal ligament/alveoler kemik) doku taslağı geliştirilmiş ve geliştirilen bu doku taslağının bir mikroakışkan çip içerisinde dinamik kültürü yapılmış ve detaylı karakterizasyonları incelenmiştir.

Çalışmada üç-boyutlu mikro-doku taslaklarının üretilmesi için kullanılan Jel-MA, jelatin ve metakrilik anhidritin PBS tamponu içerisindeki reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Bu yöntem ilk olarak Van Den Bulcke ve ark. tarafından yayınlanmıştır ve literatürde yaygın olarak kullanım bulan yüksek verimli bir yöntemdir (Van Den Bulcke vd. 2000, Yue vd. 2015). Ayrıca çift katlı perio/osteo doku taslağını oluşturmak için kullanılan kompozitinin bileşenlerinden birisi olan ve insan kemik dokusunun mikroçevresini taklit etmesi hedeflenen hidroksiapatit ile kaplı MNP'ler Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Doku Mühendisliği, Biyomalzemeler ve Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı'nda (DMBNL) birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenmiştir ve detaylı karakterizasyonları tamamlanmıştır.

Sentezi tamamlanan Jel-MA biyomürekkebi ve HAp/MNP katkılanmış Jel-MA kompozit biyomürekkepleri değişen sıcaklığa bağlı reoloji analizlerine tabi tutulmuş ve viskozite davranışları incelenmiştir. Kullanılan biyomürekkeplerin viskozite özellikleri mikro-ekstrüzyon temelli üç-boyutlu biyoyazıcı sistemlerinde oldukça kritik bir noktadır. Mümkün olduğu kadar yüksek viskozitede hazırlanan biyomürekkepler ile gerçekleştirilen üç-boyutlu biyobasımların çözünürlük, dayanıklılık ve yapısal bütünlük açısından daha iyi sonuçlar verdiği de bilinmektedir (Gao vd. 2018, Pepelanova vd. 2018). Tez kapsamında yapılan optimizasyon aşamalarında düşük Jel-MA konsantrasyonuna sahip biyomürekkeplerin 26°C sıcaklıkta düşük viskozite özelliklerine sahip olduğu anlaşılmıştır. %12,5 oranında hazırlanan Jel-MA biyomürekkebinin basıma uygun olduğu tespit edilmiştir. 10 ila 40°C sıcaklık değerleri arasında gerçekleştirilen reoloji analizlerinde elde edilen sonuçlar incelendiğinde %12,5 oranında Jel-MA içeren biyomürekkebin jelleşme noktasının yaklaşık 26°C olduğu gözlenmiştir. Jelleşme noktası

sıcaklığa bağlı yapılan reoloji analizlerinde G' ve G'' eğrilerinin kesişim noktasındaki sıcaklık değeri olarak tanımlanmaktadır. Farklı oranlarda yapıya katılan HAp/MNP'lerin %12,5'lik Jel-MA biyomürekkeplerinin depo modülü (G') ve kayıp modülü (G'') özelliklerinde, dolayısıyla jelleşmesinde ve jelleşme noktasının değişiminde gözle görülür bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Reoloji analizleri sonrasında gerçekleştirilen FTIR analizlerinden elde edilen spektrumlar incelendiğinde sentezlenen Jel-MA biyomürekkebinin spesifik jelatin piklerini belirgin olarak bulundurduğu görülmektedir. Elde edilen FTIR spektrumunda (Şekil 4.8) 3275 cm^{-1} 'da geniş bir pik net olarak görülmektedir ve bu pik hidroksil gruplarının gerilmesi ile ilişkilidir. Yine Jel-MA'ya spesifik $\sim 1520\text{ cm}^{-1}$ 'deki keskin pik C-N-H bükülmesine karşılık gelmektedir (Rahali vd. 2017). Ayrıca C=O gerilmesine spesifik olan yaklaşık 1625 cm^{-1} civarında görülen güçlü pik jelatin ile metakrilik anhidrit arasındaki etkileşimi sunan karbon çift bağınyı temsil etmektedir. Ayrıca 3275 ve 1625 cm^{-1} civarında görülen pikler sırası ile N-H ve C=O gerilmelerinden kaynaklıdır ve Jel-MA yapısındaki peptit bağlarını temsil etmektedir (Hermanto vd. 2013).

Spektrumda görülen tüm bu spesifik jelatin ve Jel-MA hidrojeline spesifik piklerin bulunması istenen sentezin gerçekleştiğini kanıtlamaktadır ve ayrıca bunun yanında belirgin olarak farklı bir pik ile karşılaşılmağı olması da sentezlenen ve saflaştırılan Jel-MA biyomürekkebi içerisinde önemli bir safsızlık bulunmadığının kanıtıdır. Literatürdeki farklı çalışmalarda sunulan FTIR sonuçları ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek oranda benzerlikler olduğu görülmüştür. HAp kaplı MNP ile katılan Jel-MA biyomürekkepleri ile hücresiz olarak basılan mikro-dokularının analizi sonucunda elde edilen FTIR spektrumları incelendiğinde, HAp' e spesifik olan 1000 cm^{-1} ile 1100 cm^{-1} dalgaboyu aralığındaki PO_4^{3-} piki belirgin biçimde gözlenebilmiştir. Ayrıca HAp kaplı MNP içeriğı %0,05'den %0,1'e yükseldiğinde HAp'e spesifik olan bu pikin güçlendiğı de belirgin şekilde gözlenmiştir. Hidroksiapatite ait 1030 cm^{-1} deki pik dışında literatür ile benzer şekilde yine PO_4^{3-} gerilmesinden kaynaklı olarak 1090 cm^{-1} ve 960 cm^{-1} dalgaboyunda, hidroksil gerilmesinden kaynaklı olarak da 630 cm^{-1} dalgaboyunda hidroksiapatite spesifik pikler görülmüştür (Wang vd. 2007, Vurat vd. 2018).

Jel-MA ve HAp/MNP içeren Jel-MA biyomürekkeplerinin hücresiz olarak gerçekleştirilen 3BB prosesleri sonrasında gerçekleştirilen taramalı elektron mikroskop analizi görüntüleri incelendiğinde tasarımı yapılan mikro-doku taslağı ile basım sonrası elde edilen üç-boyutlu yapının şeklinin benzerlik taşıdığı ve 500 µm olarak tasarlanan lif kalınlıklarına ulaşılabilirdiği görülmüştür. Örnek hazırlama aşamasında %2,5 glutaraldehit ile tespit etme, altın ile kaplama işlemlerinde ve SEM cihazı için gereken yüksek vakum değerlerinde az da olsa deformasyona uğramalarına rağmen genel anlamda katlı üç-boyutlu yapının korunduğu görülmüştür.

Hücresiz olarak basılan mikro-doku taslaklarının mekanik basma testleri iki grup üzerinde gerçekleştirilmiştir. İlk grup %12,5 Jel-MA biyomürekkebi ile basımı yapılan örnekler, ikinci grup ise %12,5 Jel-MA üzerine %0,1 HAp/MNP katkılanması ile hazırlanmış biyomürekkep basımı ile oluşturulan örneklerdir. Basma testinin sonucunda % gerinim'e karşılık gerilim olarak oluşturulan grafik incelendiğinde HAp/MNP içeren Jel-MA biyomürekkebi ile basılan katlı hibrit yapıların Jel-MA biyomürekkebi ile basılan katlı yapıya göre mekanik basma dayanımının %50 esneme noktalarında yaklaşık 2 kat olduğu belirlenmiştir. %50 oranında esnemeye kadar elde edilen veriler yine grafikten incelendiğinde her esneme değerinde HAp/MNP içeren Jel-MA biyomürekkebi ile basımı gerçekleştirilen yapının basma dayanımının yüksek olduğu kanıtlanmıştır.

Mekanik test sonucunda her grup için hazırlanan 3 örneğin maksimum %50'lik gerinim karşılık uygulanan maksimum gerilim değerleri, ortalama ve standart sapma değerlerine bakıldığında maksimum gerilim ortalaması Jel-MA grubunda 9,32 kPa iken Jel-MA+HAp/MNP grubunda ise 20,44 kPa olarak ölçülmüştür. Yine bu değerlerde de Jel-MA+HAp/MNP grubu örneklerinin yaklaşık 2 kat yüksek basma dayanımına sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen bu veriler sonucunda Jel-MA biyomürekkepi içerisine katkılanan HAp/MNP'ların uygulanan çapraz bağlanmanın verimini etkilemediği anlaşılmıştır. Ayrıca yapı içerisindeki hidroksiapatit kaplı parçacıkların beklenildiği şekilde yapının mekanik dayanımını arttırdığı belirlenmiştir. Bunun önemli sebeplerinden birisi, hidroksiapatitin hidrofilik özellikte olması ve hidrojel ile zayıf hidrojen bağları kurabilmesidir. Literatürdeki çalışmalar da incelendiğinde elde edilen bulgularla benzer sonuçlar görülmüştür. Hidroksiapatit kullanımı ile mekanik özelliklerin değiştiği ve

özellikle uygun oranlarda kullanıldığında malzeme dayanım özelliklerini geliştirdiği bilinmektedir (Wenz vd. 2017). Doku mühendisliği alanında kullanılan çoğu hidrojel temelli kompozitler için uygun oranlarda hidroksiapatit katkılanması yapının mekanik özelliklerinin yanında jelleşme hızını da önemli ölçüde arttırmaktadır (Ren vd. 2018).

Hüresiz olarak üç-boyutlu basımı gerçekleştirilen iki katlı mikro-doku taslaklarının termal kütle kaybı davranışlarının incelenmesi termal gravimetri analizi ile gerçekleştirilmiştir. Hidrojellere uygulanan termal analizlerde hidrojel konsantrasyonu, çapraz bağlama etkisi ve yapıdaki inorganik bileşenlerin oranları arttıkça termal degradasyonun ters orantılı olarak azaldığı bilinmektedir (Thürmer vd. 2014, Aldana vd. 2019, Zhou vd. 2014).

Basım sonrası çapraz bağlanma işlemleri ve sonrasındaki kurutma işlemleri tamamlanan 3 farklı örnek TGA analizlerine tabi tutulmuş ve %12,5 oranında Jel-MA ile hazırlanmış biyomürekkebin basımı sonrasındaki nihai yapıdan 3,118141 mg TGA panına yerleştirilmiş ve 600°C'ye ulaşıldıktan sonra yapının son kütlelerinin 1,365952 mg olduğu ölçülmüştür. Bu sonuç doğrultusunda yapıda yaklaşık %56 oranında kütle kaybı meydana geldiği görülmüştür. %0,05 oranında HAp/MNP içeren %12,5'lik Jel-MA biyomürekkebi ile basılmış yapıdan 7,037504 mg TGA panına yerleştirilmiş ve yine 600°C sıcaklığa ulaşıldığında 3,568539 mg kütleyle sahip yapı kaldığı ölçülmüş ve toplam kütle kaybı yaklaşık %49 olarak hesaplanmıştır. Son olarak %0,1 oranında HAp/MNP içeren %12,5'lik Jel-MA biyomürekkebi ile basılmış çok katlı yapıdan 8,797956 mg cihazın panına yerleştirilmiş ve 600°C'de 4,867905 mg kütleli yapının kaldığı ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda yapıda meydana gelen kütle kaybının yaklaşık %44 olduğu belirlenmiştir.

Tüm bu analiz sonuçları ve hesaplamaların ışığında %12,5'lik hazırlanan Jel-MA çözeltisine HAp/MNP katkılanması %12,5'lik Jel-MA biyomürekkebinin termal kararlılığında artışa sebep olmuş ve herhangi bir deformasyona sebep olmadığı kanıtlanmıştır. Ayrıca gerçekleştirilen TGA analizi bulguları, yapılan mekanik basma testinin bulguları ile paralel sonuçlar vermiştir.

Hidrojellerin şişme (su tutma) kapasiteleri temelde kimyasal bileşimlerine ve konsantrasyonlarına bağlıdır (Serafim vd. 2014). Tez kapsamında kullanılan Jel-MA ve Jel-MA+HAp/MNP biyomürekkeplerinin %0,1, %0,25 ve %0,5 gibi 3 farklı konsantrasyonda Irgacure 2959 ile çapraz bağlandıktan sonraki su tutma bulguları incelendiğinde, çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun %0,1'den %0,5'e artışı ile şişme (su tutma) oranının azaldığı görülmüştür. Bunun sebebi Irgacure 2959 oranının artması ile daha etkili çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi ve daha etkili çapraz bağlanma ile yapıdaki Jel-MA hidrojelinin gözeneklerinde azalma meydana gelmesi ve bununla birlikte suyun yapı içerisine difüzyonunun zorlaşması olarak tartışılabilir (Bukhari vd. 2015).

Jel-MA hidrojelleri farklı çapraz bağlanma yöntemlerine uygun yapıda ise de, radikalik fotobaşlatıcı yardımı ile çapraz bağlama oldukça yaygın ve tercih edilen yöntem durumundadır. Bunun yanı sıra, radikalik fotobaşlatıcılar arasında Irgacure 2959 (2-Hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiyofenon)'un oldukça düşük sitotoksosite gösterdiği de bilinmektedir (Klotz vd. 2016). Ayrıca Jel-MA hidrojelinin çapraz bağlanma özellikleri UV maruziyet süresi ve fotobaşlatıcı konsantrasyonu parametreleri ile doğrudan ilgilidir (Schuurman vd. 2013).

Üç-boyutlu biyobasım ile üretilen mikro-doku taslaklarının çapraz bağlanma verimini değerlendirmek ve arttırmak amacı ile bazı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 365 nm dalgaboyundaki UV ışığa maruziyet süreleri, fotobaşlatıcı (Irgacure 2959) içeriği ve UV ışık kaynağına mesafeleri açısından değerlendirme yapıldığında, maruziyet süreleri arttıkça çapraz bağlanma verimi artmaktadır. Elde edilen sonuçlar ve yapılan skorlamalar incelendiğinde %0,5 ve %1 Irgacure içeren biyomürekkepler 15 ile 120 saniye arasında farklı sürelerde UV ışığına maruz bırakılmış ve 60 saniye ve üzerindeki maruziyetlerde iki farklı UV fotobaşlatıcı konsantrasyonuna sahip biyomürekkeplerde etkili çapraz bağlanma görülmüş, 120 saniyede ise üç-boyutlu yapı tamamen rijit hale gelmiş ve herhangi bir deformasyon ile karşılaşmamıştır. Kullanılan fotobaşlatıcı konsantrasyonunun %0,5 ve %1 olmasının çapraz bağlanma özelliklerinde önemli farklılıklara neden olmadığı anlaşıldığından, devam eden tüm çalışmalarda UV fotobaşlatıcı konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde biyomürekkep hazırlığı yapılmıştır. Ayrıca literatür incelendiğinde %0,1 ile %1 arasındaki fotobaşlatıcı konsantrasyonuna

sahip Jel-MA biyomürekkeplerinin kullanımı mevcuttur (Lee vd. 2016, Yin vd. 2018, Nichol vd. 2010).

Optimizasyon çalışmalarının devamında çapraz bağlanma verimi %0,5 UV fotobaşlatıcı konsantrasyonuna sahip biyomürekkeplerin farklı maruziyet süreleri ve farklı mesafelere göre değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre oluşturulan skorlamalar incelendiğinde çapraz bağlanmanın 45. saniyede kısa mesafelerde başladığı açıkça anlaşılmıştır. 60 saniyelik süre sonunda UV ışık kaynağına yalnızca 3 cm mesafede bulunan üç-boyutlu yapının etkili çapraz bağlandığı izlenmiş, 90 ve 120 saniye sonunda ise daha uzak mesafede bulunan yapıların da etkin şekilde çapraz bağlandığı g r lm ştir. Tüm bu sonuçlara göre devam eden çalışmalar için kullanılan, üç-boyutlu biyobasımı gerçekleştirilen mikro-doku taslakları yaklaşık 7 cm mesafeden 90 saniyelik 365 nm dalgaboyundaki UV ışığa maruz bırakılmıştır ve bu sayede yüksek verimde çapraz bağlanmış yapılar elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında detaylı karakterzasyonları gerçekleştirilen Jel-MA temelli biyomürekkeplerin belirlenen hücreler ile birleştirilip tasarlanan mikro-doku taslaklarının oluşturulması ve bunların detaylı analizleri ele alınmıştır.

Tez kapsamında üç-boyutlu perio/osteo yapılarının oluşturulması için Jel-MA temelli biyomürekkepler ile birlikte insan periodontal ligament fibroblast ve insan alveolar osteoblast hücreleri kullanılmıştır. Ticari olarak temin edilen bu hücreler, ilk aşamada standart kültür şartlarında oğaltılmış ve morfolojileri kültür süresince faz-kontrast mikroskobunda izlenmiştir. Elde edilen mikroskop görüntülerinde periodontal ligament fibroblast hücrelerinin, karakteristik iğsi bir morfoloji sergiledikleri ve bu fibroblastoid morfolojilerini kültür süresince korudukları g r lm ştir (İnanç vd. 2009). Osteoblast hücrelerinin faz-kontrast görüntüleri incelendiğinde, hücrelerin kültür kabı yüzeyine sıkı bir şekilde tutunmuş olduğu ve uzamış bir morfolojiye sahip oldukları g r lm ştir. Aynı zamanda, hızlı hücre çoğalma özellikleri nedeniyle osteoblast hücrelerinin kültür kabında üst üste geldiği g r lm ştir.

Periodontal ligament fibroblast ve osteoblast hücrelerinin yüzeye bağlanma ve çoğalma davranışları empedansa dayalı hücre analiz sistemi ile de incelenmiştir. Bu analiz sistemi hücre adhezyonu, çoğalması ve ölümü gibi hücreysel davranışları herhangi bir işaretleyiciye gerek duyulmadan, anlık olarak belirleyebilen bir analiz sistemidir. Temel prensibi, elektrot empedans ölçümüne dayanan bu sistemde, zemin kısmında altın mikro-elektrotlar bulunan ve elektrot-plaka (e-plaka) adı verilen çok kuyucuklu kültür kapları kullanılmaktadır. Hücreler bu kültür kaplarına ekilmekte ve mikroelektrotların empedansındaki değişim (hücre indeksi) anlık olarak belirlenebilmektedir. E-plakalar üzerindeki hücrelerin hücre indeksi değerleri, hücrelerin biyolojik durumları hakkında kantitatif bilgiler vermektedir (Kustermann vd. 2013, Kramer vd. 2014).

96 kuyucuklu e-plakalara farklı yoğunluklarda ekilen insan periodontal ligament fibroblast ve osteoblast hücrelerinin çoğalma davranışları hücre analiz sistemi ile eş-zamanlı olarak belirlenmiştir ve her iki hücrenin hücre indeksi eğrilerinin birbirinden oldukça farklı olduğu göze çarpmaktadır. Farklı hücre türleri, farklı profillere sahip hücre indeksi eğrileri oluşturabilmektedir (Kho vd. 2015). İnsan periodontal ligament fibroblast hücrelerinin büyüme eğrileri incelendiğinde, beklendiği gibi hücre yoğunluğu arttıkça hücre indeksi değerlerinin arttığı görülmektedir. Aynı zamanda, hücrelerin substrattaki çoğalma sınırlarına ulaştıkları (maksimum hücre indeksi) ve büyüme eğrilerinin platoya dönüştüğü zamanın, hücre yoğunluğu ile bağlantılı olduğu görülmektedir. En yüksek hücre yoğunluğunda (25.000 hücre), maksimum hücre indeksi değerine ilk 6. saatte ulaşılırken, bu sürenin ekilen hücre sayısı azaldıkça arttığı görülmektedir (Kho vd. 2015). Hücre sayısının daha yüksek olması, hücre indeksinin artmasına ve hücrelerin plato fazına daha hızlı ulaşmasına neden olmaktadır (Selli vd. 2016). Diğer yandan, yüksek hücre yoğunluklarında (25.000 ve 12.500 hücre), hücre indeksi değerinin maksimum değerine ulaştıktan belli bir süre sonra azaldığı görülmektedir. Hücre indeksindeki bu azalmanın sebebinin, aşırı hücre yoğunluğunun sebep olduğu temas (kontakt) inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Urcan vd. 2010). Yüksek hücre yoğunluklarında (25.000 ve 12.500 hücre), hücre ilavesinden hemen sonra hücre indeksinde keskin bir artış olduğu, ardından hücreler doyum noktasına ulaştıktan sonra aşırı hücre yoğunluğu nedeniyle adhezyon yapan hücrelerin bir kısmının zeminden ayrıldığı düşünülmektedir. Doyum noktasından sonra ise, yüzeye bağlı olan hücrelerin sabit plato fazına geçtiği (Kozak vd.

2018) ve hücre indeksinin sabit kaldığı görülmektedir. Diğer hücre yoğunluklarında ise (≤ 6.250 hücre/kuyu) hücre indeksi değerlerinin hücre ilavesinden hemen sonra artmaya başlayarak maksimum değere ulaştığı ve bu değerde sabit kaldığı görülmektedir.

Osteoblast hücrelerinin büyüme eğrileri incelendiğinde ise, insan periodontal ligament fibroblast hücrelerinin büyüme eğrilerinden farklı bir profil göze çarpmaktadır. Elde edilen veriler incelendiğinde, insan periodontal ligament fibroblast hücrelerinin büyüme eğrilerinde olduğu gibi hücre yoğunluğu arttıkça hücre indeksi değerlerinin arttığı görülmektedir. Beklendiği gibi, daha fazla sayıda hücre tohumlandığında, maksimum hücre indeksine ulaşma süresinin azaldığı görülmektedir (Lebourgeois vd. 2018). Bunlara ek olarak, hücre indeksi değerlerinin hücre ilavesinden hemen sonra artmaya başladığı görülmektedir. Fakat, osteoblast hücrelerinde insan periodontal ligament fibroblast hücrelerinden farklı olarak, hücre indeksi değerlerinin 24 saat boyunca sürekli olarak arttığı görülmektedir. İnsan periodontal ligament fibroblast hücrelerinde, yüksek hücre yoğunluklarının (25.000 ve 12.500 hücre) neden olduğu temas inhibisyonundan dolayı meydana gelen hücre indeksindeki azalma, aynı yoğunluklardaki osteoblast hücrelerinin büyüme eğrilerinde gözlenmemiştir. Bu durumun, periodontal ligament fibroblast hücrelerinin osteoblast hücrelerden yapı olarak daha büyük olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Aynı sayıdaki periodontal ligament fibroblast hücrelerinin kapladığı alan, osteoblast hücrelerinin kapladığı alandan daha fazladır (Salih ve Zaric, 2016).

Bu sonuçlara ilaveten, her iki hücrenin hücre indeksi eğrileri karşılaştırıldığında, maksimum hücre indeksine ulaşma zamanının osteoblast hücrelerinde (≤ 3 saat) daha kısa olduğu görülmektedir. Bu durum osteoblast hücrelerinin çoğalma hızının daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (Kozak vd. 2018). Faz-kontrast mikroskopunda günlük olarak yapılan gözlemlerde de, osteoblast hücrelerinin çoğalma hızının, periodontal ligament fibroblast hücrelerinin çoğalma hızından daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, 6 kuyucuklu kültür kabına aynı yoğunlukta ekilen her iki hücrenin, 1., 3. ve 7. günlerde elde edilen Alamar mavisi test sonuçları incelendiğinde, 3. gündeki flüoresans şiddetindeki artışın osteoblast hücrelerinde daha fazla olduğu görülmektedir.

Bu durum, osteoblast hücrelerinin periodontal ligament fibroblast hücrelerine kıyasla 3. günde daha hızlı çoğaldıklarını doğrulamaktadır.

Mikroakışkan temelli çip içerisinde dinamik kültürü sürdürülen iki katlı perio/osteo mikro-doku taslaklarının 1, 3 ve 7. günlerdeki Alamar mavisi analizleri sonuçları incelendiğinde 3. Gündeki hücre canlılığının 1. güne kıyasla yaklaşık 1,3 kat arttığı görülmüştür. 7 günde ise 3. güne kıyasla floresans şiddetinde bir azalma olduğu görülmüştür, ancak bu 7 günlük kültür sürecinde hücrelerin mitokondriyel aktivitelerini koruduğu sonucuna ulaşılmıştır.

İnsan alveolar OB ve PDLF hücreleri ile basımı yapılan canlı perio/osteo mikro-doku taslaklarının 3BB prosesinin hemen akabinde alınan faz-kontrast görüntüleri incelendiğinde her iki hücre tipinin de lokalize oldukları biyomürekkeplerde oldukça homojen olarak dağıldıkları ve yeterli miktarda oldukları belirlenmiştir. Ayrıca istenen 3B modelin çok yüksek ölçüde sağlanabildiği görülmüştür. Yine yapılan SEM görüntülemelerinde de faz-kontrast mikroskopi görüntülerine paralel olarak 3B yapının yüksek oranda korunduğu belirlenmiştir.

Yapılan konfokal mikroskopi analizi bulgularında elde edilen sonuçlara göre 3BB prosesi ile oluşturulan yapıların içerisinde hücrelerin homojen olarak dağıldığı, yanısıra kalsein reaktifi ile boyanan (yeşil) canlı hücrelerin 12.saat, 3. Gün ve 7. Günlerde oldukça yoğun olduğu gözlenmiştir. Etidyum homodimer ile boyanmış (kırmızı) ölü hücrelerin sayısında ciddi bir artış olmaması da 3B yapıların hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığını göstermiştir. Konfokal lazer mikroskopisi analizleri, Alamar mavisi test analizleri ile paralellik göstermekte olup, üç-boyutlu biyobasım yöntemi kullanılarak canlı perio/osteo doku çip sisteminin oluşturulabildiğini ve oluşturulan yapının mikroakışkan çip içerisindeki dinamik kültüre uygun olduğunu göstermektedir.

3BB ile oluşturulan hibrit mikro-dokuların mikroakışkan çip içerisindeki dinamik kültürlerinin 3. gününde yapıdaki polisakkaritlerin yanı sıra hücrelerin yoğunluğu ve dağılımını değerlendirmek amacı ile histokimyasal Periyodik Asit-Schiff (PAS) ve

Hematoksilen&Eosin boyaması gerçekleştirilmiştir. Bilindiği üzere PAS boyaması periodontal ligamanın alveolar kemiğe yapışmasına katkıda bulunan yaygın bir glikozaminoglikan olan kondroitin sülfat dahil olmak üzere karbonhidrat bakımından zengin makromolekülleri boyamaktadır (Fujii ve Hirabayashi 1999). İncelenen mikroskop görüntülerinde iki katlı mikro-dokuların içerisinde kapsüllenmiş hücrelerin homojen şekilde dağıldığı görülmüş, ayrıca uzun kültür süresinde histolojik değerlendirmeler yapılmadığından 2 kat arasında oluşabilecek kollajen liflere rastlanmamıştır.

İki katlı hibrit perio/osteo mikro-doku içindeki her iki hücre tipinin dağılımı ve lokalizasyonu immünfloresan mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir. STRO1 PDLF hücreleri için, osteokalsin ise OB hücreleri için pozitif olan yüzey belirteçleridir (Park vd. 2011, Arpornmaeklong vd. 2009). Kültürün erken aşamalarında çok katlı mikro-dokuda hücrelerin tohumlandıkları katlarda lokalize oldukları gözlenmiştir. Kültür devam ettiğinde ise katmanları oluşturan biyomürekkebin degradasyonuna ve hücrelerin çoğalmasına bağlı olarak STRO1 pozitif PDLF hücrelerinin (mavi) belli oranda osteoblastik hücrelerin bulunduğu diğer katmana doğru göç ettikleri dikkat çekmiştir. Bu durum, biyo-baskımı yapılan yapıların hücrelerin göçüne veya çoğalmasına izin veren geçirgenliği ile açıklanabilmektedir veya mikroakışkan kültür koşulları altında jellerin bir dereceye kadar bozunmasıyla çoğunlukla STRO-1 + (mavi) hPDLF hücrelerinin OSC + (kırmızı) osteoblastik alt tabakaya göç etmesi olarak yorumlanabilir.

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm çalışmalar ve alınan sonuçlar değerlendirildiğinde Jel-MA temelli biyomürekkep ile birlikte HAp kaplı MNP ve insan alveolar OB ve insan PDLF hücrelerini barındıran perio/osteo çift katlı mikro-doku taslağı başarılı olarak geliştirilmiştir. Geliştirilen bu model herhangi bir deformasyona uğramadan uzun süre mikroakışkan çip içerisinde dinamik şartlar altında kültüre edilebilmiştir. Başarı ile geliştirilmiş bu çift katlı perio/osteo modeli çeşitli ilaç etkileşimi ve ilaç Emilimi çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilecektir ve çalışmada kullanılan mikroakışkan temelli çip sayesinde eş zamanlı analizlere uygun bir klinik öncesi platform elde edildiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aldana, A.A., Malatto, L., Rehman, M.A.U., Boccaccini, A.R. and Abraham, G.A. 2019. Fabrication of Gelatin Methacrylate (GelMA) Scaffolds with Nano- and Micro-Topographical and Morphological Features. *Nanomaterials*, 9(1); 120.
- Armitage, G.C. 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1); 1-6.
- Arpornmaeklong, P., Brown, S.E., Wang, Z. and Krebsbach, P.H. 2009. Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 18(7); 955-968.
- Ashammakhi, N., Ahadian, S., Xu, C., Montazerian, H., Ko, H., Nasiri, R., Barros, N. and Khademhosseini, A. 2019. Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs. *Materials Today Bio*, 1, 100008.
- Basdra, E.K. and Komposch, G. 1997. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *The European Journal of Orthodontics*, 19(6); 615-621.
- Baykan, E., Koc, A., Elcin, A.E. and Elcin, Y.M. 2014. Evaluation of a biomimetic poly(ϵ -caprolactone)/ β -tricalcium phosphate multispiral scaffold for bone tissue engineering: in vitro and in vivo studies. *Biointerphases*, 9(2); 029011.
- Belibasakis, G.N., Kast, J.I., Thurnheer, T., Akdis, C.A. and Bostanci, N. 2015. The expression of gingival epithelial junctions in response to subgingival biofilms. *Virulence*, 6(7); 704-709.
- Bhise, N.S., Manoharan, V., Massa, S., Tamayol, A., Ghaderi, M., Miscuglio, M., Lang, Q., Zhang, Y.S., Shin, S.R. and Calzone, G. 2016. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication*, 8; 014101.
- Bose, S., Roy, M., and Bandyopadhyay, A. 2012. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30(10); 546-554.
- Brougham, C.M., Levingstone, T.J., Shen, N., Cooney, G.M., Jockenhoevel, S., Flanagan, T.C. and O'Brien, F.J. 2017. Freeze-Drying As A Novel

Biofabrication Method for Achieving A Controlled Microarchitecture within Large, Complex Natural Biomaterial Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*, 6 (21); 1700598.

Brown, J.A., Pensabene, V., Markov, D.A., Allwardt, V., Neely, M.D., Shi, M., Britt, C.M., Hoilett, O.S., Yang, Q., Brewer, B.M., Samson, P.C., McCawley, L.J., May, J.M., Webb, D.J., Li, D., Bowman, A.B., Reiserer, R.S. and Wikswo, J.P. 2015. Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip: A novel neurovascular microfluidic bioreactor. *Biomicrofluidics*, 9(5); 054124.

Bukhari, S.M.H., Khan, S., Rehanullah, M. and Ranjha, N.M. 2015. Synthesis and characterization of chemically cross-linked acrylic acid/gelatin hydrogels: effect of pH and composition on swelling and drug release. *International Journal of Polymer Science*, 2015; 1-15.

Cao, H., Chen, X., Yao, J. and Shao, Z. 2013. Fabrication of an alternative regenerated silk fibroin nanofiber and carbonated hydroxyapatite multilayered composite via layer-by-layer. *Journal of Materials Science*, 48(1); 150-155.

Carranza, F.A. and Bernard, G.W. 2003. *Carranza's Clinical Periodontology*, (ed 9). Philadelphia: WB Saunders.

Cortesini, R. 2005. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. *Transplant Immunology*, 15(2); 81-89.

Dabra, S., Chhina, K., Soni, N. and Bhatnagar, R. 2013. Tissue engineering in periodontal regeneration: a brief review. *Dental Research Journal*, 9(6); 671-680.

Daly, A.C. and Kelly, D.J. 2019. Biofabrication of spatially organised tissues by directing the growth of cellular spheroids within 3D printed polymeric microchambers. *Biomaterials*, 197, 194-206.

Das, S., Kim, S. W., Choi, Y.J., Lee, S., Lee, S. H., Kong, J.S., Park, H.J., Cho, D.W. and Jang, J. 2019. Decellularized extracellular matrix bioinks and the external stimuli to enhance cardiac tissue development in vitro. *Acta biomaterialia*, 95, 188-200.

Dinca, V., Kasotakis, E., Catherine, J. Morka, A., Ranella, A., Ovsianikov, A., Chichkov, B.N., Farsari, M., Mitraki, A. and Fotakis, C. 2008. Directed three-dimensional patterning of self-assembled peptide fibrils. *Nano Letters*, 8; 538-543.

- Dolati, F., Yu, Y., Zhang, Y. De Jesus, A.M., Sander, E.A. and Ozbolat, I.T. 2014. In vitro evaluation of carbon-nanotubereinforced bioprintable vascular conduits. *Nanotechnology*, 25(14); 145101.
- Dominical, V.M., Vital, D.M., O'Dowd, F., Saad, S.T., Costa, F.F., Conran, N. 2015. In vitro microfluidic model for the study of vaso-occlusive processes. *Experimental Hematology*, 43(3); 223-228.
- Duan, B., Hockaday, L.A., Kang, K.H. and Butcher, J.T. 2013. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(5); 1255-1264.
- Duarte Campos, D.F., Blaeser, A., Buellesbach, K., Sen, K.S., Xun, W., Tillmann, W., and Fischer, H. 2016. Bioprinting organotypic hydrogels with improved mesenchymal stem cell remodeling and mineralization properties for bone tissue engineering. *Advanced healthcare materials*, 5(11); 1336-1345.
- Eddie, S.L., Kim, J.J., Woodruff, T.K. and Burdette, J.E. 2014. Microphysiological modeling of the reproductive tract: a fertile endeavor. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, NJ), 239(9); 1192-1202.
- Edwards, P.C. and Kanjirath, P. 2010. Recognition and management of common acute conditions of the oral cavity resulting from tooth decay, periodontal disease, and trauma: an update for the family physician. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 23(3); 285-294.
- Elçin, Y.M. 2003. *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies*. AEMB Series:534, Kluwer-Plenum Publisher, 350, ISBN 0-306-47788-2, NY & London.
- Elçin, Y.M. 2004. Stem cells and tissue engineering. In *Biomaterials*, Springer, Boston, MA, 301-316.
- Elçin, Y.M., Inanç, B. and Elçin, A.E. 2010. Human embryonic stem cell differentiation on periodontal ligament fibroblasts. *Human Embryonic Stem Cell Protocols*, Humana Press, 269-281.
- Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S. and Vertuani, S. 2018. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers*, 10(7);701.
- Fujii, T. and Hirabayashi, Y. 1999. Histochemical studies of glycosaminoglycans in developing periodontal ligaments of ICR mice. *The Anatomical Record: An*

Official Publication of the American Association of Anatomists, 254(4); 465-473.

Gao, T., Gillispie, G.J., Copus, J.S., Seol, Y.J., Atala, A., Yoo, J.J. and Lee, S.J. 2018. Optimization of gelatin–alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. *Biofabrication*, 10(3); 034106.

Gopinathan, J. and Noh, I. 2018. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomaterials research*, 22(1); 11.

Guillemot, F., Souquet, A., Catros, S., Guillotin, B., Lopez, J., Faucon, M., Pippenger, B., Bareille, R., Remy, M., Bellance, S., Chabassier, P., Fricain, J.C. and Amedee, J. 2010. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 6(7); 2494-2500.

Gungor-Ozkerim, P.S., Inci, I., Zhang, Y.S., Khademhosseini, A. and Dokmeci, M.R. 2018. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials science*, 6(5); 915-946.

Harris, L.D., Kim, B.S. and Mooney, D.J. 1998. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 42(3); 396-402.

Henriksson, I., Gatenholm, P. and Hägg, D.A. 2017. Increased lipid accumulation and adipogenic gene expression of adipocytes in 3D bioprinted nanocellulose scaffolds. *Biofabrication*, 9(1); 015022.

Hermanto, S., Sumarlin, L. O. and Fatimah, W. 2013. Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin Based on Spectroscopic and Electrophoretic Analysis. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 1(3); 26-73.

Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D. and Ozbolat, I.T. 2017. The bioink: a comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology advances*, 35(2); 217-239.

Hözl, K., Lin, S., Tytgat, L., Van Vlierberghe, S., Gu, L. and Ovsianikov, A. 2016. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*, 8(3); 032002.

Hsu, W.M., Carraro, A., Kulig, K.M., Miller, M.L., Kaazempur-Mofrad, M., Weinberg, E., Entabi, F., Albadawi, H., Watkins, M.T., Borenstein, J.T., Vacanti, J.P. and

- Neville, C. 2010. Liver-assist device with a microfluidics-based vascular bed in an animal model, *Annals of Surgery*, 252(2); 351-357.
- Huh, D., Torisawa, Y.S., Hamilton, G.A., Kim, H.J. and Ingber, D.E. 2012. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips, *Lab on a Chip*, 12(12); 2156-2164.
- Huh, D.D. 2015. A human breathing lung-on-a-chip. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(Supplement 1); 42-44.
- Hutmacher, D.W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24); 2529-2543.
- İnanç, B., Arslan, Y.E., Şeker, Ş., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2009. Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90(1); 186-195.
- İnanç, B., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2009. In vitro differentiation and attachment of human embryonic stem cells on periodontal tooth root surfaces. *Tissue Engineering Part A*, 15(11); 3427-3435.
- İnanç, B., Elçin, A.E., Elçin, Y.M. 2007. Effect of osteogenic induction on the in vitro differentiation of human embryonic stem cells cocultured with periodontal ligament fibroblasts. *Artificial Organs*, 31(11); 792-800.
- İnanç, B., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2009. In vitro differentiation and attachment of human embryonic stem cells on periodontal tooth root surfaces. *Tissue Engineering Part A*, 15(11); 3427-3435.
- İnanç, B. and Elçin, Y.M. 2011. Stem cells in tooth tissue regeneration-challenges and limitations. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(3); 683-692.
- Jang, J., Kim, T.G., Kim, B.S., Kim, S.W., Kwon, S.M. and Cho, D.W. 2016. Tailoring mechanical properties of decellularized extracellular matrix bioink by vitamin B2-induced photo-crosslinking. *Acta biomaterialia*, 33, 88-95.
- Jia, W., Gungor-Ozkerim, P.S., Zhang, Y.S., Yue, K., Zhu, K., Liu, W., Pi, Q., Byambaa, B., Dokmeci, M.R., Shin, S.R. and Khademhosseini, A. 2016. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials*, 106, 58-68.

- Jiang, N., Guo, W., Chen, M., Zheng, Y., Zhou, J., Kim, S. G., Embree M.C., Songhee Song, K., Marao, H.F. and Mao, J.J. 2015. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement. In *Tooth Movement*, 18, 1-8.
- Kantarci, A., Hasturk, H. and Van Dyke, T.E. 2015. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontology* 2000, 68(1); 66-82.
- Karp, J.M., Dalton, P.D. and Shoichet, M.S. 2003. Theme article–scaffolds for tissue engineering. In *Materials Research Society*, 28, 94841.
- Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C.P., O'Carroll, S.J., Mez, E.D., Angel, C.E. and Graham, E.S. 2015. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors*, 5(2); 199-222.
- Kim Y, Lobatto ME, Kawahara T, Lee Chung B, Mieszawska AJ, Sanchez-Gaytan BL, Fay, F., Senders, M.L., Calcagno, C., Becraft, C., Saungh, M.T., Gordoni, R.E., Stroesc, E.S.G., Ma, M., Farokhzadj, O.C., Fayad, Z.A., Mulder, W.I.B., Langer, R. 2014. Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(3); 1078-1083.
- Kim, B.S., Baez, C.E. and Atala, A. 2000. Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology*, 18(1); 2-9.
- Kim, B.S., Lee, J.S., Gao, G. and Cho, D.W. 2017. Direct 3D cell-printing of human skin with functional transwell system. *Biofabrication*, 9(2); 025034.
- Kim, J.H., Seol, Y.J., Ko, I.K., Kang, H.W., Lee, Y.K., Yoo, J.J., Atala, A. and Lee, S.J. 2018. 3D bioprinted human skeletal muscle constructs for muscle function restoration. *Scientific Reports*, 8(1); 1-15.
- Klotz, B.J., Gawlitta, D., Rosenberg, A.J., Malda, J., Melchels, F.P. 2016. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in Biotechnology*, 34(5); 394-407.
- Knowlton, S., Onal, S., Yu, C.H., Zhao, J.J., Tasoglu, T. 2015. Bioprinting for cancer research. *Trends in Biotechnology*, 33(9); 504-513.
- Ko, H.C.H., Milthorpe, B.K. and McFarland, C.D. 2007. Engineering thick tissues-the vascularisation problem. *European Cells and Materials*, 14, 1-18.

- Koch, L., Deiwick, A., Schlie, S., Michael, S., Gruene, M., Coger, V., Zychlinski, D., Schambach, Axel., Reimers, K., Vogt, P.M. and Chichkov, B. 2012. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7); 1855-1863.
- Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspantini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R. and Quarto, R. 2000. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 49(3); 328-337.
- Kondiah, P.J., Kondiah, P.P., Choonara, Y.E., Marimuthu, T. and Pillay, V. 2020. A 3D Bioprinted Pseudo-Bone Drug Delivery Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, 12(2); 166.
- Kozak, J., Wdowiak, P., Maciejewski, R. and Torres, A. 2018. A guide for endometrial cancer cell lines functional assays using the measurements of electronic impedance. *Cytotechnology*, 70(1); 339-350.
- Kramer, A.H., Joos-Vandewalle, J., Edkins, A.L., Frost, C.L. and Prinsloo, E. 2014. Real-time monitoring of 3T3-L1 preadipocyte differentiation using a commercially available electric cell-substrate impedance sensor system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(4); 1245-1250.
- Kunze, A., Lengacher, S., Dirren, E., Aebischer, P., Magistretti, P.J. and Renaud, P. 2013. Astrocyte-neuron co-culture on microchips based on the model of SOD mutation to mimic ALS. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences From Nano to Macro*, 5(7); 964-975.
- Kuo, C.K. and Tuan, R.S. 2003. Tissue engineering with mesenchymal stem cells. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 22(5); 51-56.
- Kustermann, S., Boess, F., Buness, A., Schmitz, M., Watzele, M., Weiser, T., Singer, T., Suter, L. and Roth, A. 2013. A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicology in Vitro*, 27(5); 1589-1595.
- La Carrubba, V., Pavia, C.F., Brucato, V. and Piccarolo S. 2008. PLLA/PLA Scaffolds Prepared via Thermally Induced Phase Separation (TIPS): Tuning of Properties and Biodegradability. *International Journal of Material Forming*, 1(1); 619-622.

- Lai, K.K., Renneberg, R. and Mak, W.C. 2016. High efficiency single-step biomaterial-based microparticle fabrication via template-directed supramolecular coordination chemistry. *Green Chemistry*, 18(6); 1715-1723.
- Lalegül-Ülker, Ö., Vurat, M.T., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2019. Magnetic silk fibroin composite nanofibers for biomedical applications: Fabrication and evaluation of the chemical, thermal, mechanical, and in vitro biological properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(41); 48040.
- Lam, R.H., Cui, X., Guo, W. and Thorsen, T. 2016 High-throughput dental biofilm growth analysis for multiparametric microenvironmental biochemical conditions using microfluidics. *Lab on a Chip*, 16(9); 1652-1662.
- Langer, R. and Vacanti, J.P. 1993. Tissue engineering. *Science* (New York, NY) 260, 920-926.
- Larsson, L., Decker, A.M., Nibali, L., Pilipchuk, S.P., Berglundh, T., Giannobile, W.V. 2016. Regenerative Medicine for Periodontal and Peri-implant Diseases. *Journal of Dental Research*, 95(3); 255-266.
- Lebourgeois, S., Fraisse, A., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., and Martin-Latil, S. 2018. Development of a real-time cell analysis (RTCA) method as a fast and accurate method for detecting infectious particles of the adapted strain of hepatitis A virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 335.
- Lee, B.H., Lum, N., Seow, L.Y., Lim, P.Q. and Tan, L.P. 2016. Synthesis and Characterization of Types A and B Gelatin Methacryloyl for Bioink Applications. *Materials*, 9(10); 797.
- Lee, J.M. and Yeong, W.Y. 2016. Design and printing strategies in 3D bioprinting of cell-hydrogels: A review. *Advanced healthcare materials*, 5(22); 2856-2865.
- Lee, V., Singh, G., Trasatti, J.P. Bjornsson, C., Xu, X., Tran, T. N., Yoo, S.S., Dai, G. and Karande, P. 2014. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 20(6); 473-484.
- Leong, K.F., Chua, S.C., Sudarmadji, N. and Yeong, W.Y. 2008. Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1(2); 140-152.

- Listl, S., Galloway, J., Mossey, P.A. and Marcenes, W. 2015. Global Economic Impact of Dental Diseases. *Journal of Dental Research*, 94(10); 1355-1361.
- Liu, X. and Ma, P.X. 2004. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3); 477-486.
- Loh, Q.L. and Choong, C. 2013. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6); 485-502.
- Lv, Q. and Feng, Q. 2006. Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(12); 1349-1356.
- Ma, P.X. 2004. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials today*, 7(5); 30-40.
- Mammoto, T., Mammoto, A., Torisawa, Y.S., Tat, T., Gibbs, A., Derda, R., Mannix R, de Bruijn, M., Yung, C.W., Huh, D. and Ingber, D.E. 2011. Mechanochemical control of mesenchymal condensation and embryonic tooth organ formation. *Development Cell*, 21(4); 758-769.
- Mandal, B.B. and Kundu, S.C. 2009. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*, 30(15); 2956-2965.
- Mauney, J.R., Volloch, V. and Kaplan, D.L. 2005. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue engineering*, 11(5-6); 787-802.
- Mooney, D.J., Baldwin, D.F., Suh, N.P., Vacanti, J.P. and Langer, R. 1996. Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 17(14); 1417-1422.
- Murphy, S.V. and Atala, A. 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8); 773-785.
- Murugan, R. and Ramakrishna, S. 2007. Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue Engineering*, 13(8); 1845-1866.
- Myers, D.R., Sakurai, Y., Tran, R., Ahn, B., Hardy, E.T., Mannino, R., Kita, A., Tsai, M. and Lam, W.A. 2012. Endothelialized Microfluidics for Studying Microvascular Interactions in Hematologic Diseases. *Journal of Visualized Experiments*, (64), e3958.

- Nettles, D.L., Vail, T.P., Morgan, M.T., Grinstaff, M.W. and Setton, L.A. 2004. Photocrosslinkable hyaluronan as a scaffold for articular cartilage repair. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3); 391-397.
- Neufurth, M., Wang, X., Schröder, H.C., Feng, Q., Diehl-Seifert, B., Ziebart, T., Steffen, R., Wang, R., Wang, S., and Müller, W.E.G. 2014. Engineering a morphogenetically active hydrogel for bioprinting of bioartificial tissue derived from human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Biomaterials*, 35(31); 8810-8819.
- Nichol, J.W., Koshy, S.T., Bae, H., Hwang, C.M., Yamanlar, S. and Khademhosseini, A. 2010. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 31(21); 5536-5544.
- O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V. and Gibson, L. 2004. Influence of Freezing Rate on Pore Structure in Freeze-Dried Collagen-GAG Scaffolds. *Biomaterials*, 25(6); 1077-1086.
- O'brien, F.J. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today* 14(3), 88-95.
- Ong, S.G., Huber, B.C., Lee, W.H., Kodo, K., Ebert, A.D., Ma, Y., Nguyen, P.K., Diecke, S., Chen, W.Y. and Wu, J.C. 2015. Microfluidic Single-Cell Analysis of Transplanted Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes After Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 132(8); 762-771.
- Oz, H.S. and Puleo, D.A. 2011. Animal Models for Periodontal Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 8.
- Ozbolat, I.T. 2015. Scaffold-based or scaffold-free bioprinting: competing or complementing approaches?. *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 6(2).
- Ozbolat, I.T. 2015. Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. *Trends in Biotechnology*, 33(7); 395-400.
- Pagella, P., Neto, E., Jimenez-Royo, L., Lamghari, M. and Mitsiadis, T.A. 2014. Microfluidics co-culture systems for studying tooth innervation. *Frontiers in Physiology*, 5,326.
- Park, J.C., Kim, J.M., Jung, I.H., Kim, J.C., Choi, S.H., Cho, K.S. and Kim, C.S. 2011. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells

- (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(8); 721-731.
- Parmaksiz, M., Dogan, A., Odabas, S., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2016. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomedical Materials*, 11(2); 022003.
- Pellegrini, G., Seol, Y.J., Gruber, R. and Giannobile, W.V. 2009. Pre-clinical Models for Oral and Periodontal Reconstructive Therapies. *Journal of Dental Research*, 88(12); 1065-1076.
- Pepelanova, I., Kruppa, K., Scheper, T. and Lavrentieva, A. 2018. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting. *Bioengineering*, 5(3); 55.
- Pereira, R.F. and Bártolo, P.J. 2015 3D bioprinting of photocrosslinkable hydrogel constructs. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(48).
- Petersen, P.E. and Ogawa, H. 2012. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology 2000*, 60(1); 15-39.
- Poursamar, S.A., Hatami, J., Lehner, A.N., da Silva, C.L., Ferreira, F.C. and Antunes, A.P.M. 2015. Gelatin porous scaffolds fabricated using a modified gas foaming technique: Characterisation and cytotoxicity assessment. *Materials Science and engineering: C*, 48, 63-70.
- Qian, X., Nguyen, H.N., Song, M.M., Hadiono, C., Ogden, S.C., Hammack, C., Yao, B., Hamersky, G.R., Jacob, F., Zhong, C., Yoon, K.J., Jeang, W., Lin, L., Li, Y., Thakor, J., Berg, D.A., Zhang, C., Kang, E., Chickering, M., Nauen, D., Ho, C.Y., Wen, Z., Christian, K.M., Shi, P.Y., Maher, B.J., Wu, H., Jin, P., Tang, H., Song, H. and Ming, G.L. 2016. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell*, 165(5); 1238-1254.
- Qiang, L.V. and QingLing F. 2006. Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(12); 1349-1356.
- Qu, H., Fu, H., Han, Z. and Sun, Y. 2019. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Advances*, 9(45); 26252-26262.

- Rahali, K., Ben Messaoud, G., Kahn, C., Sanchez-Gonzalez, L., Kaci, M., Cleymand, F., Fleutot, S., Linder, M., Desobry, S. and Arab-Tehrany, E. 2017. Synthesis and Characterization of Nanofunctionalized Gelatin Methacrylate Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12); 2675.
- Ren, B., Chen, X., Du, S., Ma, Y., Chen, H., Yuan, G., Li, J., Xiong, D., Tan, H., Ling, Z., Chen, Y., Hu, X. and Niu, X. 2018. Injectable polysaccharide hydrogel embedded with hydroxyapatite and calcium carbonate for drug delivery and bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1257-1266.
- Robertson, G., Bushell, T.J. and Zagnoni, M. 2014. Chemically induced synaptic activity between mixed primary hippocampal co-cultures in a microfluidic system. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences From Nano to Macro*, 6(6); 636-644.
- Sachlos, E. and Czernuszka, J.T. 2003. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cell and Materials*, 5(29); 39-40.
- Salerno, A.E.D.M., Di Maio, E., Iannace, S. and Netti, P.A. 2012. Tailoring the pore structure of PCL scaffolds for tissue engineering prepared via gas foaming of multi-phase blends. *Journal of Porous Materials*, 19(2); 181-188.
- Salih, V., and Zaric, S. 2016. The periodontal ligament (PDL). *Essential Clinical Oral Biology*, 57.
- Schuurman, W., Levett, P.A., Pot, M.W., van Weeren, P.R., Dhert, W.J., Hutmacher, D.W., Melchels, F.P. W., Klein, T.J. and Malda, J. 2013. Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs. *Macromolecular Bioscience*, 13(5); 551-561.
- Seliktar, D., Dikovsky, D. and Napadensky, E. 2013. Bioprinting and Tissue Engineering: Recent Advances and Future Perspectives. *Israel Journal of Chemistry*, 53(9-10), 795-804.
- Sellgren, K.L., Butala, E.J., Gilmour, B.P., Randell, S.H. and Grego, S. 2014. A biomimetic multicellular model of the airways using primary human cells. *Lab on a Chip*, 14(17); 3349-3358.

- Selli, C., Erac, Y. and Tosun, M. 2016. Effects of cell seeding density on real-time monitoring of anti-proliferative effects of transient gene silencing. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 23(1); 1-8.
- Seol, Y.J., Lee, H., Copus, J.S., Kang, H.W., Cho, D.W., Atala, A., Lee, S.J. and Yoo, J.J. 2018. 3D bioprinted biomask for facial skin reconstruction. *Bioprinting*, 10, e00028.
- Serafim, A., Tucureanu, C., Petre, D.G., Dragusin, D.M., Salageanu, A., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P. and Stancu, I.C. 2014. One-pot synthesis of superabsorbent hybrid hydrogels based on methacrylamide gelatin and polyacrylamide. Effortless control of hydrogel properties through composition design. *New Journal of Chemistry*, 38(7); 3112-3126.
- Shah, P., Fritz, J.V., Glaab, E., Desai, M.S., Greenhalgh, K., Frachet, A., Niegowska, M., Estes, M., Jäger, C., Seguin-Devaux, C., Zenhausem, F. and Wilmes, P. 2016. Microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human-microbe interface. *Nature Communications*, 7(1); 1-15.
- Shin, H., Jo, S. and Mikos, A.G. 2003. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(24), 4353-4364.
- Smith, L.A., Beck, J.A. and Ma, P.X. 2007. Nanofibrous scaffolds and their biological effects. *Nanotechnologies for the Life Sciences*: Online.
- Sodek, J. and McKee, M.D. 2000. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology*, 24(1), 99-126.
- Stichler, S., Böck, T., Paxton, N., Bertlein, S., Levato, R., Schill, V., Smolan, W., Malda, J., Blunk, T. and Groll, J. 2017. Double printing of hyaluronic acid/poly (glycidol) hybrid hydrogels with poly (ϵ -caprolactone) for MSC chondrogenesis. *Biofabrication*, 9(4); 044108.
- Stratesteffen, H., Köpf, M., Kreimendahl, F., Blaeser, A., Jockenhoevel, S. and Fischer, H. 2017. GelMA-collagen blends enable drop-on-demand 3D printability and promote angiogenesis. *Biofabrication*, 9(4); 045002.
- Subia, B., Kundu, J. and Kundu, S.C. 2010. Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. *Tissue engineering*, 141.
- Terranova, V.P. 1993. Biologically active factors in the treatment of periodontal disease. *Current Opinion in Periodontology*, 129-135.

- Thomson, R.C., Shung, A.K., Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G., 2000. Polymer Scaffold Processing. *Principles of Tissue Engineering*, 2, 251-262.
- Thürmer, M.B., Diehl, C.E., Brum, F.J.B. and Santos, L.A.D. 2014. Preparation and characterization of hydrogels with potential for use as biomaterials. *Materials Research*, 17, 109-113.
- Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H. and Reichl, F.X. 2010. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 26(1); 51-58.
- Van Den Bulcke, A.I., Bogdanov, B., De Rooze, N., Schacht, E. H., Cornelissen, M. and Berghmans, H. 2000. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules*, 1(1), 31-38.
- Verbridge, S.S., Chakrabarti, A., DelNero, P., Kwee, B., Varner, J.D., Stroock, A.D. and Fischbach, C. 2013. Physicochemical regulation of endothelial sprouting in a 3D microfluidic angiogenesis model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(10); 2948-2956.
- Verneti, L.A., Senutovitch, N., Boltz, R., DeBiasio, R., Shu, n T.Y., Gough, A. and Taylor, D.L. 2016. A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, NJ), 241(1); 101-114.
- Vurat, M.T., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2018. Osteogenic composite nanocoating based on nanohydroxyapatite, strontium ranelate and polycaprolactone for titanium implants. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 28(9); 1763-1773.
- Vurat, M.T., Ergun, C., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2020. 3D Bioprinting of Tissue Models with Customized Bioinks. In *Bioinspired Biomaterials* (Springer, Singapore), 67-84.
- Wang, A., Liu, D., Yin, H., Wu, H., Wada, Y., Ren, M., Jiang, T., Cheng, Xiaonong and Xu, Y. 2007. Size-controlled synthesis of hydroxyapatite nanorods by chemical precipitation in the presence of organic modifiers. *Materials Science and Engineering: C*, 27(4); 865-869.

- Wang, Y.I., Abaci, H.E. and Shuler, M.L. 2017. Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(1); 184-194.
- Wenz, A., Borchers, K., Tovar, G.E. and Kluger, P.J. 2017. Bone matrix production in hydroxyapatite-modified hydrogels suitable for bone bioprinting. *Biofabrication*, 9(4); 044103.
- Whitford, W.G. and Hoying, J.B. 2016. A bioink by any other name: terms, concepts and constructions related to 3D bioprinting. *Future Science*, 2(3).
- Winkler, J.R., Matarese, V., Hoover, C.I., Kramer, R.H. and Murray, P.A. 1988. An in vitro model to study bacterial invasion of periodontal tissues. *Journal of Periodontology*, 59(1); 40-45.
- Wu, Y., Lin, Z.Y.W., Wenger, A.C., Tam, K.C. and Tang, X.S. 2018. 3D bioprinting of liver-mimetic construct with alginate/cellulose nanocrystal hybrid bioink. *Bioprinting*, 9, 1-6.
- Wu, Z., Su, X., Xu, Y., Kong, B., Sun, W. and Mi, S. 2016. Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Scientific Reports*, 6(1); 1-10.
- Xu, F., Celli, J., Rizvi, I., Moon, S., Hasan, T. and Demirci, U. 2011. A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. *Biotechnology Journal*, 6(2); 204-212.
- Xu, T., Gregory, C.A., Molnar, P., Cui, X., Jalota, S., Bhaduri, S.B. and Boland, T. 2006. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method. *Biomaterials* 27(19), 3580-3588.
- Xu, T., Binder, K.W., Albanna, M.Z., Dice, D., Zhao, W., Yoo, J.J. and Atala, A. 2012. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication*, 5(1); 015001.
- Yang, X., Lu, Z., Wu, H., Li, W., Zheng, L. and Zhao, J. 2018. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 83, 195-201.
- Yi, H.G., Choi, Y.J., Jung, J.W., Jang, J., Song, T.H., Chae, S., Ahn, M., Choi, T.H., Rhie, J. and Cho, D.W. 2019. Three-dimensional printing of a patient-specific

engineered nasal cartilage for augmentative rhinoplasty. *Journal of Tissue Engineering*, 10, 2041731418824797.

Yin, J., Yan, M., Wang, Y., Fu, J. and Suo, H. 2018. 3D Bioprinting of Low-Concentration Cell-Laden Gelatin Methacrylate (GelMA) Bioinks with a Two-Step Cross-linking Strategy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(8); 6849-6857.

Yu, C., Ma, X., Zhu, W., Wang, P., Miller, K. L., Stupin, J., Hairabedian, A. and Chen, S. 2019. Scanningless and continuous 3D bioprinting of human tissues with decellularized extracellular matrix. *Biomaterials*, 194, 1-13.

Yu, Y., Zhang, Y., Martin, J.A. and Ozbolat, I.T. 2013. Evaluation of cell viability and functionality in vessel-like bioprintable cell-laden tubular channels. *Journal of Biomechanical Engineering*, 135(9).

Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M.M., Tamayol, A., Annabi, N. and Khademhosseini, A. 2015. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, 73, 254-271.

Zhang, H.B., Xing, T.L., Yin, R.X., Shi, Y., Yang, S.M. and Zhang, W.J. 2016. Three-dimensional bioprinting is not only about cell-laden structures. *Chinese Journal of Traumatology*, 19(4); 187-192.

Zhang, T., Yan, K.C., Ouyang, L. and Sun, W. 2013. Mechanical characterization of bioprinted in vitro soft tissue models. *Biofabrication*, 5(4); 045010.

Zhou, L., Tan, G., Tan, Y., Wang, H., Liao, J. and Ning, C. 2014. Biomimetic mineralization of anionic gelatin hydrogels: effect of degree of methacrylation. *RSC Advances*, 4(42); 21997-22008.