

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROPOLİS VE AMOKSİSİLİN İÇEREN HYALÜRONİK ASİT-METİL
SELÜLOZ HİDROJEL MÜREKKEPLERİN DOKU İSKELELERİNİN
FABRİKASYONU İÇİN GELİŞTİRİLMESİ**

Pelin TOKAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Hasan SADIKOĞLU

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILMAZER

Şubat, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROPOLİS VE AMOKSİSİLİN İÇEREN HYALÜRONİK ASİT-METİL
SELÜLOZ HİDROJEL MÜREKKEPLERİN DOKU İSKELELERİNİN
FABRİKASYONU İÇİN GELİŞTİRİLMESİ**

Pelin TOKAT tarafından hazırlanan tez çalışması 24.02.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimya Mühendisliği Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hasan SADIKOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILMAZER
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Hasan SADIKOĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Nil ACARALI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ, Üye
Marmara Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Hasan SADIKOĞLU ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILMAZER sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Propolis Ve Amoksisilin İçeren Hyalüronik Asit-Metil Selüloz Hidrojel Mürekkeplerin Doku İskelelerinin Fabrikasyonu İçin Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Pelin TOKAT

İmza

Aileme



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana bilgileriyle yol gösteren ve sahip oldukları birikimleri bana aktaran danışmanım Prof. Dr. Hasan SADIKOĞLU ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILMAZER'e,

Tez çalışmamda sağladıkları katkılardan dolayı Doç Dr. Hale BERBER, Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YILMAZER, Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ, Dr. Öğr. Üyesi Songül ULAÇ, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ŞENGÖR, Fadime ÇETİN, Ar. Gör. Hilal METE GÜNAYDIN ve Dr. Günay ATAK'a,

Beni her zaman destekleyen ve her zaman yanımda olan canım ailem ve canım arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Pelin TOKAT

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	17
1.1 Literatür Özeti	17
1.2 Tezin Amacı	18
1.3 Hipotez	18
2 LİTERATÜR	19
2.1 Cilt Yanıklarının Sınıflandırılması	19
2.2 Doku İskeleleri	20
2.3 Biyopolimerler	21
2.4 3B Biyoyazıcıların Sınıflandırılması.....	22
2.4.1 Mürekkep püskürtmeli 3B biyoyazıcılar.....	24
2.4.1.1 Termal mürekkep püskürtmeli yazıcılar.....	24
2.4.1.2 Piezoelektrik mürekkep yazıcı.....	24
2.4.2 Ekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcılar	24
2.4.3 Lazer destekli 3B biyoyazıcılar	25
2.5 Hidrojel Özellikleri.....	27
2.6 Metil Selüloz	27
2.7 Hyalüronik Asit	29
2.8 Akrilamid	29
2.9 İç İç Geçen Polimer Ağlar (IPN).....	30
2.9.1 Akrilamid polimerleşme mekanizması.....	31
2.9.2 Akrilamid polimerleşme mekanizmasını etkileyen parametreler	32
2.10 Propolis	32
2.11 Amoksisilin.....	34
2.12 Konuyla İlgili Yapılmış Çalışmalar	34
3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	36
3.1 Materyal.....	36
3.2 Jel Numunelerin Üretilmesi.....	36
3.3 3B Biyobasım	37

3.4 Doku İskelelerinin Basılabilirlik Karakterizasyonu.....	37
3.5 Doku İskelelerinin Morfolojik Özellikleri	37
3.6 Doku İskelelerini Kimyasal Yapı Karakterizasyonu	38
3.7 Doku İskelelerini Termal Karakterizasyonu	38
3.8 Doku İskelelerinin Şişme Davranışları	38
3.9 Doku İskelelerinin Biyobozunurluğu	38
3.10 Doku İskelelerinin Bakteriyel Hassasiyet Deneyleri	39
3.11 Doku İskelelerinin Hücre Kültürü Deneyleri	39
3.12 Propolis ve AMX'in Salınım Testleri	40
4 DENEYSEL SONUÇLAR	41
4.1 Jellerin Basılabilirliği	41
4.2 Morfolojik Özelliklerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi.....	42
4.3 Doku İskelelerinin FTIR Sonuçları.....	44
4.4 Doku İskelelerinin Termal Analiz Sonuçları.....	46
4.5 Doku İskelelerinin Şişme Testi Sonuçları	49
4.6 Doku İskelelerinin Biyobozunum Testi Sonuçları	52
4.7 Doku İskelelerinin Bakteriyel Hassasiyet Testi Sonuçları	54
4.8 Hücre Canlılığı Biyouyumluluk Testi Sonuçları.....	55
4.9 Propolis ve AMX'in Salınım Sonuçları.....	57
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKÇA	62
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	67

SİMGE LİSTESİ

dk	Dakika
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
°C	Derece Santigrat
g	Gram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
cm ²	Santimetrekare
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

3B	3 Boyutlu
AMX	Amoksisilin
APS	Amonyum Persülfat
CAD	Bilgisayar Destekli Tasarım
DTA/TG	Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analiz
ECM	Hücre Dışı Matriks
FCS	Fetal Buzağı Serumı
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HA	Hyalüronik Asit
HaCaT	Keratinosit Hücre Hattı
IPN	İç İç Geçen Polimer Ağlar
L929	Fibroblast Hücre Hattı
MS	Metil Selüloz
MTS	3-(4, 5-Dimetiltiazol-2-İl)-5-(3-Karboksimetoksifenil)-2-(4-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum
NNMBA	N,N'-Metilen-Bisakrilamid
OD	Optik Dansite
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	Tetrametilendiamin
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Cilt yanıklarının sınıflandırılması.....	20
Şekil 2.2 Doku iskelesi	21
Şekil 2.3 3B yazıcı	23
Şekil 2.4 3B biyoyazıcıların sınıflandırılması	26
Şekil 2.5 Metil selüloz molekülü	28
Şekil 2.6 Hyalüronik asit molekülü	29
Şekil 2.7 İç içe geçen polimer ağlar sistemlerinin oluşumu (a) tam-IPN (b) yarı-IPN	30
Şekil 2.8 Akrilamidin polimerleşme mekanizması	31
Şekil 2.9 Flavonol molekülü	33
Şekil 2.10 Sinnamik asit molekülü	33
Şekil 2.11 Amoksisilin molekülü	34
Şekil 3.1 Hidrojel üretim mekanizması (a) yağ banyosunda MC çözeltisi hazırlama (b) hidrojelin +4 °C buz banyosunda döndürülmesi	36
Şekil 3.2 Doku iskelesinin 3B basım aşamaları (a) bilgisayarda çizilen CAD modeli (b) ekstrüzyon prensipli yazıcı ile 3B basım (c) basılmış doku iskelesi örneği.....	37
Şekil 4.1 Doku iskelelerinin por boyutlarının karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.2 Doku iskelesi numunelerinin SEM görüntüleri.....	43
Şekil 4.3 Ana matriks ve propolis katkılı doku iskelelerinin FTIR spektrumları....	44
Şekil 4.4 Ana makriks ve AMX katkılı doku iskelelerinin FTIR spektrumları	45
Şekil 4.5 Doku iskelelerinin FTIR spektrumları.....	45
Şekil 4.6 Propolis katkılı doku iskeleleri için DTA analizi.....	46
Şekil 4.7 Propolis katkılı doku iskeleleri için TG analizi.....	47
Şekil 4.8 AMX katkılı doku iskeleleri için DTA analizi	48
Şekil 4.9 Amoksisilin katkılı doku iskeleleri için TG analizi.....	48
Şekil 4.10 Doku iskelelerinin DTA grafiği	49
Şekil 4.11 Doku iskelelerinin TG grafiği.....	49
Şekil 4.12 Ana matriks ve propolis katkılı iskelelerin şişme oranlarının karşılaştırılması	50
Şekil 4.13 Ana matriks katkılı iskelelerin şişme oranlarının karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.14 Doku iskelelerinin şişme oranlarının karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.15 Ana matriks ve propolis katkılı iskelelerin bozunma oranlarının karşılaştırılması	52

Şekil 4.16 Ana matriks ve amoksisilin katkılı iskelelerin bozunma oranlarının karşılaştırılması	53
Şekil 4.17 Doku iskelelerinin bozunma oranlarının karşılaştırılması	53
Şekil 4.18 Doku iskelelerinin antibakteriyel duyarlılık testleri a) <i>E. Coli</i> için propolis katkılı iskeleler b) <i>S.aureus</i> için propolis katkılı iskeleler c) <i>E. Coli</i> için amoksisilin katkılı iskeleler d) <i>S.aureus</i> için amoksisilin katkılı iskeleler	54
Şekil 4.19 Doku iskelelerinin L929 hücre hatları üzerindeki canlılık oranları a) 24 saatlik test b) 48 saatlik test c) 72 saatlik test.....	56
Şekil 4.20 Doku iskelelerinin HaCaT hücre hatları üzerindeki canlılık oranları a) 24 saatlik test b) 48 saatlik test c) 72 saatlik test.....	57
Şekil 4.21 AMX içeren doku iskelelerinin kümülatif salım oranlarının karşılaştırılması	58
Şekil 4.22 Propolis içeren doku iskelelerinin kümülatif salım oranlarının karşılaştırılması	58
Şekil 4.23 AMX ve propolisin kümülatif salınım oranının karşılaştırılması	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 4. 1 Basılabilirlik hata oranları ve standart sapmalar	42
Tablo 4. 2 Antibakteriyellik testi inhibisyon çapları.....	55

Propolis ve Amoksisilin İçeren Hyalüronik Asit-Metil Selüloz Hidrojel Mürekkeplerin Doku İskelelerinin Fabrikasyonu İçin Geliştirilmesi

Pelin TOKAT

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Hasan SADIKOĞLU

Eş-Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hakan YILMAZER

Günlük hayatımızda gerek iş kazaları gerekse ev kazalarında vücudumuzun çeşitli yerlerinde cilt yarıkları meydana gelebilmektedir. 2. ve 3. derece gibi derin cilt yarıkları enfeksiyon, doku kaybı, ödem gibi birçok sorun yaratmaktadır. Bu durum hastayı hem fizyolojik hem de psikolojik olarak etkilemektedir. Cilt yanığı tedavi edilmediğinde ölüme bile sebep olabilmektedir.

Cilt yarıklarının tedavilerinde doku iskeleleri kullanılabilmektedir. Doku iskeleleri hücreler arası matriksi taklit etmektedir. Bu sayede yaralı bölgenin tedavi edilmesine yardım edecek ve o bölgede hücre çoğalmasını sağlayacak bir ortam yaratmaktadır.

Bu doku iskeleleri çeşitli yöntemlerle üretilebilmektedir. Son zamanlarda 3 boyutlu (3B) biyoyazıcılarla doku iskelesi üretimi yaygınlık kazanmaktadır.

Bu tez kapsamında hyalüronik asit (HA), metil selüloz (MS) ve poliakrilamitten oluşan içi içe geçen polimer ağ sistemiyle oluşturulmuş bir hidrojel sistemi üretildi. Bu hidrojin 3B biyobasımı gerçekleştirildi. Ayrıca bu ana matriks hidrojele,

propolis ve amoksisilin (AMX) ile farklı oranlarda katkılandırma yapıp 3B biyobasımı yapıldı. Basım sonucu elde edilen doku iskelelerinin basılabilirlikleri karşılaştırıldı. Degradasyon ve şişme davranışları incelendi. Morfolojik (Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)), termal (Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analiz (DTA/TG)) ve kimyasal (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)) karakterizasyonları yapıldı. Ayrıca doku iskelelerinin hücre kültürü, antibakteriyellik çalışmaları gerçekleştirildi. Bu sayede cilt yanığı tedavilerinde kullanılmak üzere en iyi kombinasyona sahip doku iskelesinin bulunması öngörüldü. Sonuçlar hyalüronik asit –metil selüloz bazlı hidrojellerin 3B basım için umut verici olduğunu göstermiştir. Propolis katkılı doku iskelelerinin AMX içeren doku iskelelerine göre biyobozunurluk ve termal dayanım açısından daha dayanıklı olduğu belirlendi. Bu iskeleler hücre canlılığı açısından daha iyi performans sergiledi. Propolisli iskelelerde %20'lik propolis, AMX içeren iskelelerde ise %0.5'lik iskele daha başarılı sonuçlar gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Hyaluronik asit, metil selüloz, doku iskelesi, 3B biyobasım, iç içe geçen polimer ağlar.

Development of Hyaluronic Acid-Methyl Cellulose Hydrogel Inks Containing Propolis and Amoxicillin for Fabrication of Scaffolds

Pelin TOKAT

Department of Chemical Engineering

Master's Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Hasan SADIKOĞLU

Co-supervisor: Asst. Prof. Dr. Hakan YILMAZER

In our daily life, skin burns can occur in various parts of our body in both work and home accidents. Deep skin burns such as 2nd and 3rd degree cause many problems such as infection, tissue loss, edema. This situation affects the patient both physiologically and psychologically. Skin burns can even cause death if left untreated.

Tissue scaffolds can be used in the treatment of skin burns. Scaffolds mimic the intercellular matrix. In this way, it creates an environment that will help treat the injured area and ensure cell proliferation in that area.

These scaffolds can be produced by various methods. Recently, the production of scaffolds with 3D bioprinters has become widespread.

Within the scope of this thesis, a hydrogel system formed by an interpenetrating polymer network system consisting of hyaluronic acid (HA), methyl cellulose (MC) and polyacrylamide was produced. 3D bioprinting of this hydrogel was performed. In addition, this main matrix hydrogel was doped with propolis and amoxicillin (AMX) at different rates and 3D bioprinted. The printability of the tissue scaffolds

obtained as a result of printing was compared. Degradation and swelling behaviors were investigated. Morphological (Scanning Electron Microscopy (SEM)), thermal (Thermogravimetric and Differential Thermal Analysis (DTA/TG)) and chemical (Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)) characterizations were performed. In addition, cell culture and antibacterial studies of the scaffolds were carried out. In this way, it was envisaged to find the tissue scaffold with the best combination to be used in skin burn treatments. The results showed that hydrogels based on hyaluronic acid-methyl cellulose are promising for 3D printing. It was determined that propolis-doped scaffolds were more durable in terms of biodegradability and thermal resistance than AMX-containing scaffolds. These scaffolds performed better in terms of cell viability. Scaffolds with 20% propolis and 0.5% AMX containing scaffolds showed more successful results.

Keywords: Hyaluronic acid, methyl cellulose, tissue scaffold, 3D bioprinting, interpenetrating polymer networks.

1.1 Literatür Özeti

Deri, vücudun dış çevreden korunmasında çok önemli bir rol oynar. Homeostazinin, bağışıklığın, termoregülasyonun ve duyunun korunmasında fiziksel bir bariyer olarak görev almaktadır. Derideki dokuların işlevleri yanık durumunda zarar görmektedir [1].

Doku mühendisliği, doku işlevini veya tüm organı yenileyen, koruyan veya iyileştiren biyolojik ikamelerin geliştirilmesine yönelik mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir alandır [2].

Doku iskeleleri, hücre dışı matrisin (ECM) yerine geçen, neovaskülarizasyon, hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşması için ortam sağlayan 3B yapılardır. Doku iskelelerinin pek çok varyasyonu mevcuttur. İyileşmeyi arttırmak için iskeleye büyüme faktörleri ve hücreler eklenebilir. Doku iskeleleri; sıvı kaybı ve enfeksiyondan koruyan normal derinin yapısı ve işlevini taklit etmeli, hücrelerin yara iyileşmesi için çoğalmasını sağlamalı, inflamatuvar olmayan, toksik olmayan ve immünojenik olmayan bileşim özelliklerine sahip olmalıdır [3].

Doku mühendisliğinde hidrojeller, hidrofiliklikleri ve hücre dışı matrise yapısal benzerlikleri nedeniyle çok dikkat çekmiştir. ECM'yi taklit etmek için minimum bir gereklilik olarak, doku mühendisliğinde hidrojeller, biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirliğin yanı sıra 3B mikro ortam ve doku iskelesinin içinde ve dışında madde taşınımı sağlamalıdır. İskelelerde gözenekli yapı oluşturularak veya yüksek geçirgenliğe sahip iskele malzemesi seçilerek etkili kütle transferi sağlanmaktadır [4].

Hidrojeller çok çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmıştır ve doku mühendisliği alanında büyük potansiyel göstermektedir. Hidrojeller, yüksek su içeriğini tutabilen makromoleküler bir ağ oluşturan, suda çözünür polimerlerin üç boyutlu çapraz bağlı yapı iskeleleridir. Genellikle zayıf mekanik bütünlükleri

nedeniyle hidrojel, bazı insan yumuşak dokularına yapısal benzerlik gösteren yumuşak jeller olarak sınıflandırılır [5].

Hyaluronik asit (HA) ve metilselüloz (MS) içeren hidrojel, 3B biyobaskı uygulamaları için umut verici sonuçlar göstermiştir. Retina onarımı, dermal yara onarımı, omurilik onarımı ve felç tedavilerinde kullanılmaktadır [5].

3B baskı, bir yapının katman katman üst üste eklenerek üretildiği bir üretim sürecini kullanır. İskele oluşumu için biriktirilen malzemeler, ısı, ultraviyole ışık veya bağlayıcı çözeltiler yoluyla çapraz bağlanabilir veya polimerize edilebilir. Bu teknoloji yardımıyla, optimize edilmiş 3B baskılı iskeleler doku mühendisliğinde kullanılabilir [6].

1.2 Tezin Amacı

Yapılan bu tezin amacı, yanık tedavilerinde kullanılmak üzere en iyi propolis ve amoksisilin kombinasyonuna sahip doku iskeleleri geliştirmektir. Bunun için metil selüloz, hyalüronik asit ve poliakrilamitten oluşan polimer matriks hidrojel oluşturulmuştur. Oluşturulan bu ana matrikse yanık tedavisinin sağlanması için propolis ve amoksisilin katkıları farklı oranlarda eklenmiştir. Propolis vitamin ve minerel açısından oldukça zengin kompleks bir malzeme olduğu için seçilmiştir. Amoksisilin ise doku iskelesinin antibakteriyel özelliğe sahip olması için eklenmiştir. Hem ana matriksin hem de katkı matrikslerin ekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcıda basılabilirliğine bakılmıştır. Basım sayesinde elde edilen doku iskelelerinin termal, kimyasal, morfolojik, şişme, biyobozunma, hücre canlılığı ve antibakteriyellik testleri yapılmıştır. Testlerin sonucuna göre yanık tedavisi için en uygun orandaki matriks ve katkı maddeleri belirlenmiş olacaktır.

1.3 Hipotez

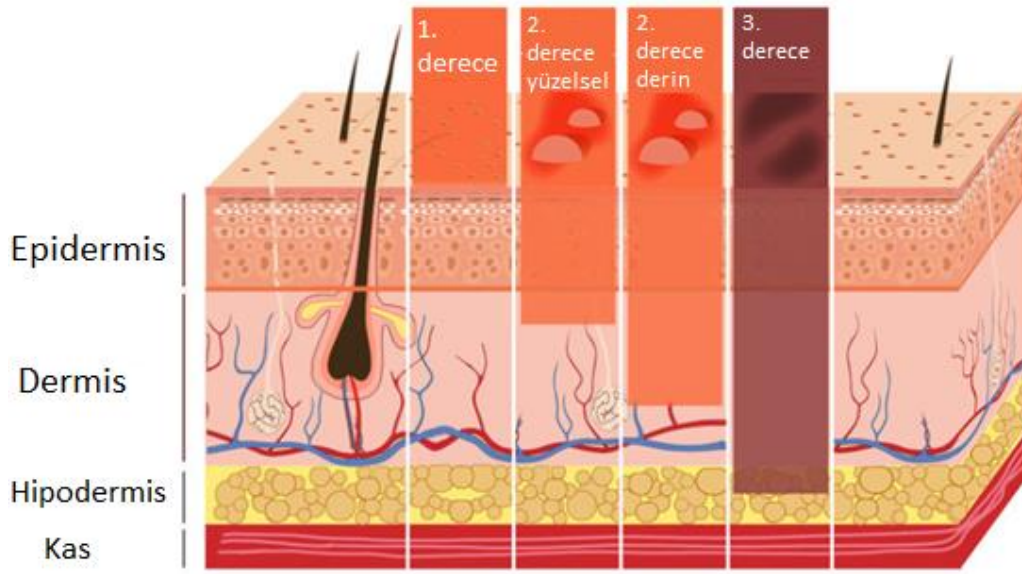
Derin cilt yanıkları için hyalüronik asit – metil selüloz matriksli, propolis ve amoksisilin katkı maddeli hidrojel sentezi yapıp, hidrojin 3B biyoyazıcı ile basımı hedeflenmiştir. Sentezlenen hem ana matriks hidrojel hem de katkı hidrojel literatürdeki formülasyonlardan farklı olup yeni bir içerik oluşturmaktadır.

2.1 Cilt Yanıklarının Sınıflandırılması

Deri, vücudun en büyük organıdır. Direkt olarak çevreyle temas halindedir. Yanık yaralanmaları da dahil olmak üzere çeşitli hasarlara karşı savunmasızdır. Vücut yüzey alanının %15'inin tahrip olması hayati tehlike oluşturmaya yeterlidir. Yanık durumu insan vücudunda meydana gelebilecek en travmatik yaralanmadır ve vücudun homeostazının tamamen bozulmasına neden olur, buna immün baskılama, masif hipermetabolizma ve ödem oluşumunu artıran vasküler aşırı geçirgenlik dahildir [7].

Yanık travmaları; ısı, donma, elektrik, kimyasallar, radyasyon veya sürtünmeden kaynaklanabilmektedir. Yanık yaralanmaları, etkilenen doku ve ortaya çıkan komplikasyonlar açısından oldukça değişkendir. Etkilenen doku ve yanma derinliğine bağlı olarak, bir yanığa maruz kalmış hasta; şok, enfeksiyon, elektrolit dengesizlikleri ve solunum yetmezliği gibi çok sayıda komplikasyonlara maruz kalabilir. Fiziksel komplikasyonların dışında uzun süreli hastanede yatış, yara izi ve deformite gibi durumlar hastaları psikolojik olarak da etkilemektedir [8].

1.derece yanıklarda epirdemis yüzeysel etkilenir. Kabarcık, kırmızı ve nemli bir görüntü vardır.2. derece yanıklarda epidermis bütünlüğü bozulur, dermis kısmen zarar görür. Kuru ve beyaz görüntü vardır. 3. derece yanıklarda ise derinin tüm katmanları (epidermis, dermis, subkutanöz doku) tamamen hasar görür. Siyah-kahverengi renktedir, tromboze kan damarları gözükmemektedir [8]. Şekil 2.1'de cilt yanıklarının sınıflandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Cilt yanıklarının sınıflandırılması [9].

2.2 Doku İskeleleri

İskele temelli doku mühendisliği yaklaşımları, cilt rejenerasyonu, hastalık veya travmanın neden olduğu yara iyileşmeleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. İdeal bir tam iyileşme süreci için, iskele yapılarının biyouyumluluk, biyobozunurluk ve antimikrobiyal özellikleri karşılaması ve hasarlı dokunun yenilenmesi için geometrik gereksinimleri uygun gözenek boyutunu ve gözenek bağlantısını sağlaması gerekir [6], [10]. Biyouyumluluk ve biyobozunurluk, iskele malzemelerinin sahip olması gereken önemli özelliklerdir ve iskelenin bozunduktan sonra toksik olmayan ürünlere dönüşmelerini sağlar [6]. Ayrıca, hücreler çoğaldıkça ve farklılaştıkça, iskele, hücreler tarafından uygulanan kuvvetlere dayanabilmelidir. Doku iskelesinin mekanik olarak düşük dayanımda olması iskelenin çökmesine sebep olur. Bu durum oksijen, besin ve atıkların zayıf difüzyonuna ve buna bağlı olarak da yetersiz doku oluşumuna sebep olur. Ayrıca iskelenin mekanik stabilitesi, günlük aktiviteye ve normal vücut hareketlerine dayanacak şekilde yapısal olarak sağlam olmalıdır [11]. Şekil 2.2’de doku iskelesi örneği gösterilmiştir.

Doku iskeleleri sentetik veya doğal polimerlerden üretilmiş malzemelerdir [12]. Doku iskelelerinin amacı hücre dışı matrisi (ECM) taklit etmektir. ECM, dokulara özgü üç boyutlu bir ultrastrüktürde düzenlenmiş yapısal ve fonksiyonel proteinler, glikoproteinler ve proteoglikanların bir karışımıdır. Bunlar yapısal destek ve gerilme kuvvetinin sağlanması, hücre yüzeyi reseptörleri için bağlanma bölgeleri ve anjiyogenez, vaskülojenez, hücre göçü, hücre çoğalması gibi çeşitli birçok fonksiyona hizmet eder [11].



Şekil 2.2 Doku iskelesi [13]

2.3 Biyopolimerler

Polimerler, doku mühendisliği için iskelelerin 3B baskısında kullanım potansiyeli olan önemli bir malzeme kategorisidir [6]. Doğal ve sentetik biyopolimerler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır.

Aljinat, kitosan, kolajen, fibronektin ve hyaluronik asit gibi doğal olarak elde edilen materyaller, daha doğal biyolojik fonksiyonlar sağladıkları için sentetik materyallere göre bir avantaja sahiptir. Normal olarak ECM'yi oluşturan veya içinde bulunan doğal olarak türetilmiş materyallerin kullanılması, orijinal ECM'nin daha iyi taklit edilmesiyle sonuçlanır ve bu nedenle hücre bağlanmasını geliştirir ve hücresel proliferasyonu sentetik polimerlerden daha verimli bir şekilde düzenler [6].

Doğal malzemeler hücresel süreçler için faydalı olsa da, iskele için poli(e-kaprolakton) ve poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) gibi sentetik polimerlerin kullanımı

daha yüksek mekanik dayanımlar, daha yüksek işlenebilirlik ve kontrol edilebilir bozulma oranları sağlamaktadır [6].

Bununla birlikte, bu sentetik polimer yapı iskeleleri, doğal olarak türetilmiş ECM polimerlerine kıyasla doku yenilenmesini teşvik etme açısından nispeten düşük biyolojik aktiviteye sahiptir [6].

Doku mühendisliği uygulamaları için biyopolimerlerde olması istenen özellikler;

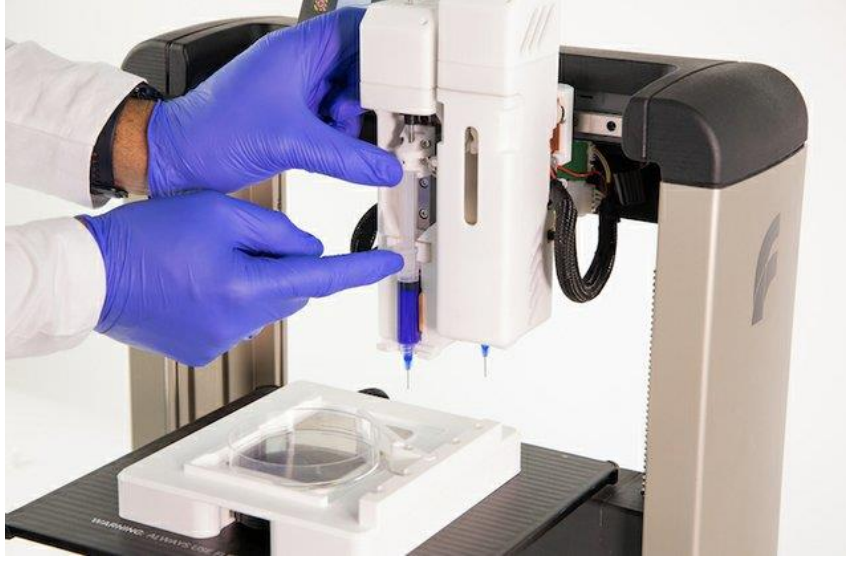
- Hücre yapışmasını sağlayan bir yüzey kimyası
- Hücre ve besin difüzyonu için yüksek miktarda gözenek içermeli.
- Hücrenin büyümesini ve biyomekanik işlevselliğini kolaylaştırmak için uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır.
- Yeni doku oluşum hızı ile birlikte eşleşen bozunma hızının kontrol edilmesi ve düzenlenmesi.
- Hücre çeşitliliğini uyarmak için proteinleri ve büyüme faktörlerini dağıtma yeterliliğine sahip olmalıdır [14].

2.4 3B Biyoyazıcıların Sınıflandırılması

3B baskı olarak da bilinen katmanlı üretim, bilgisayar destekli tasarım (CAD) modellerini kullanarak özelleştirilmiş geometrilere sahip karmaşık yapılar üretme yeteneği nedeniyle en umut verici iskele üretim yöntemlerinden biridir [10]. Şekil 2.3'te 3B yazıcı cihazı gösterilmektedir.

Başlangıçta, 3B baskı teknolojileri biyolojik olmayan ürünler için tasarlanmıştır. Metallerin, seramiklerin ve termoplastik polimerlerin biriktirilmesi gibi uygulamalar ve genellikle canlı hücreler ve biyolojik malzemelerle uyumlu olmayan organik çözücülerin, yüksek sıcaklıkların veya çapraz bağlama maddelerinin kullanımını içermekteydi [15].

Tıp alanında 3B baskı kavramı, organ eksikliğinden kaynaklanan komplikasyonlar göz önüne alındığında daha fazla ilgi görmektedir. Gönüllü bağışçı sayısında artış olmasına rağmen, organ sıkıntısı nakil ihtiyacını aşmaktadır [16].



Şekil 2.3 3B yazıcı

Doku mühendisliğinin ana hedeflerinden biri, hasarlı veya deforme olmuş dokuları ve organları yeniden yapılandırmak ve yenilemek için birbirine bağlı gözeneklere sahip 3B yapı iskeleleri üretmektir. Bu bağlamda, 3B baskı, önceden belirlenmiş ve karmaşık mimarileri hassas bir şekilde oluşturabilen doku iskelelerinin üretimi için umut verici bir tekniktir [17]. 3B biyobaskı alanındaki ana zorluklardan biri, yalnızca biyolojik materyallerle ve baskı işlemiyle uyumlu değil, aynı zamanda doku yapıları için istenen mekanik ve fonksiyonel özellikleri de sağlayabilen materyaller bulmak olmuştur [15].

Biyobaskı işlemi sırasında, doku yapılarını oluşturmak için genellikle istenen hücre tiplerini kapsülleyen hidrojel formunda bir biyomateryal çözeltisi veya birkaç biyomateryal karışımı kullanılır. Bu biyomürekkep, tasarlanan yapının son şeklini, yapısını ve mimarisini oluşturmak için biyobaskı sırasında veya hemen sonrasında çapraz bağlanabilir veya stabilize edilebilir. Biyomürekkepler, tek başına doğal veya sentetik biyomateryallerden veya hibrit malzemeler olarak ikisinin bir kombinasyonundan yapılabilir. İdeal bir biyomürekkep, biyobaskılı dokuların ve organların doğru işlevselliğini sağlamak için gerekli olan hedef dokuların uygun mekanik, reolojik ve biyolojik özelliklerine sahip olmalıdır. Tıbbi ve farmasötik uygulamalar için 3B baskı teknolojileri, temel olarak ekstrüzyon temelli baskı, mürekkep püskürtmeli baskı ve lazer destekli 3B baskıyı içermektedir [18]. Şekil 2.4'te 3B biyoyazıcıların çeşitleri gösterilmektedir.

2.4.1 Mürekkep püskürtmeli 3B biyoyazıcılar

Mürekkep püskürtmeli yazıcılar, nihai yapıyı destekleyebilen veya onun bir parçasını oluşturabilen bir alt tabaka üzerine sıvı damlalarını püskürtmek için termal veya akustik kuvvetler kullanır [15].

2.4.1.1 Termal mürekkep püskürtmeli yazıcılar

Püskürtme başlığından damlacıkları zorlayan basınç darbeleri üretmek için yazıcı kafasını elektrikle ısıtarak çalışır. Birkaç çalışma, 200 °C ila 300 °C arasında değişebilen bu lokalize ısıtmanın, DNA gibi biyolojik moleküllerin stabilitesi, memelilerin canlılığı veya baskı sonrası işlevi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir [15].

Termal mürekkep püskürtmeli yazıcıların avantajları arasında yüksek baskı hızı, düşük maliyet ve geniş kullanılabilirlik bulunur. Bununla birlikte, hücrelerin ve malzemelerin termal ve mekanik strese maruz kalma riski, düşük damlacık yönlülüğü, düzgün olmayan damlacık boyutu, nodülün sık sık tıkanması ve güvenilir olmayan hücre kapsüllemesi, bu yazıcıların 3B biyobaskıda kullanımı için önemli dezavantajlar oluşturmaktadır. Ayrıca, daha yüksek viskozitelerdeki solüsyonlar kullanıldığında damlaları çıkarmak için gereken aşırı kuvvet gerekmektedir. Bu sebeple püskürtmeli yazıcılarda malzeme viskozitesi üzerinde sınırlamalar vardır [15].

2.4.1.2 Piezoelektrik mürekkep yazıcı

Piezoelektrik kristal içerir. Sıvıyı düzenli aralıklarla damlacıklara bölmek için yazıcı kafasının içindeki akustik dalga piezoelektrik malzemeye voltaj uygulamak için hızlı bir değişime neden olur. Bu olay damlacıkları nozülünden çıkarmak için gereken basıncı üretir [15].

2.4.2 Ekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcılar

Ekstrüzyon temelli 3B baskı, özelleştirilmiş geometrilere sahip polimerik iskeleleri kolaylıkla ve düşük maliyetle üretebildiği için popüler ve yaygın olarak kullanılan bir tekniktir [10].

Hidrojellerin ekstrüzyon tabanlı 3B biyobaskı için hidrojel viskozitesi, malzeme dağılımını sınırlamak için yeterince yüksek olmalı ve ya malzeme, kararlı bir

hidrojel oluşturmak için hızlı bir sol-jel geçişine sahip olmalıdır. Hidrojelin mekanik özellikleri, hücre kültürü de dahil olmak üzere zamanla şeklini korumasına izin vermelidir [19].

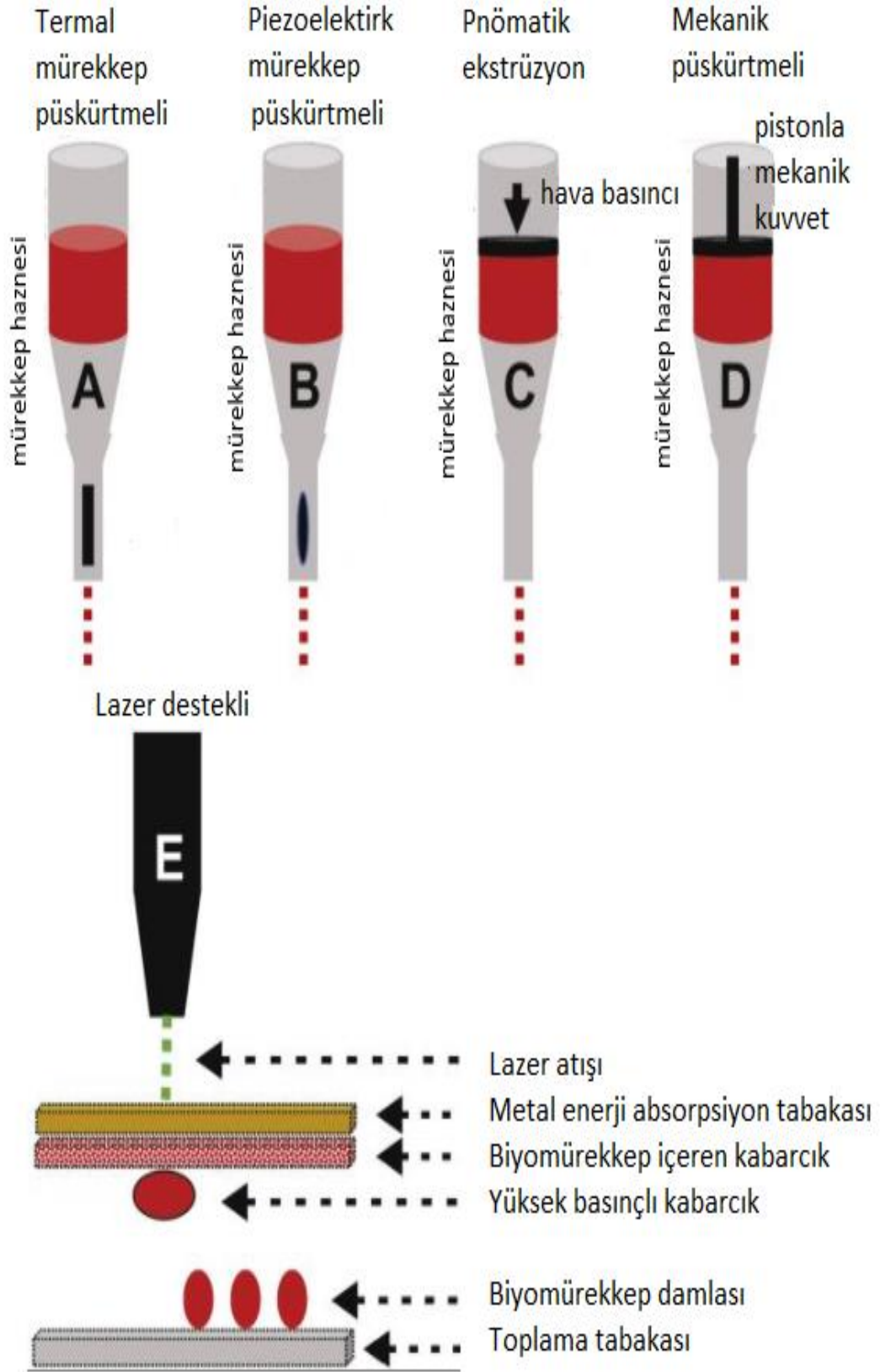
3B biyobaskı uygulamaları için biyolojik materyalleri ekstrüde etmenin en yaygın yöntemleri pnömatik veya mekanik (piston veya vida) dağıtım sistemleridir. Pnömatik sistemlerde sıkıştırılmış gaz hacminin gecikmesi nedeniyle malzeme akışında sorun olabilmektedir. Mekanik dağıtım sistemlerinde ise daha doğrudan kontrol sağlanmaktadır [15].

3 boyutlu basımı etkileyen parametreler[5], [20].

- Ortam sıcaklığı
- Ortam nemi
- Çözücü buharlaşma hızı
- Viskozite
- Yüzey gerilimi
- Öz kütle
- Basım hızı
- Tabla sıcaklığı
- Şırınga ucu

2.4.3 Lazer destekli 3B biyoyazıcılar

Biyomürekkep ve hücreler bir şeridin alt kısmında askıya alınır ve bir lazer darbesiyle buharlaştırıldıklarında alıcı bir alt tabakaya iletilir. Yüksek derecede hassasiyet ve çözünürlük, yüksek viskoziteli biyomürekkep kullanma ve yüksek hücre yoğunluğu yazdırma yeteneği vardır. Uzun bir prosestir. Maaliyeti yüksektir [21].



Şekil 2.4 3B biyoyazıcıların sınıflandırılması [21]

2.5 Hidrojel Özellikleri

Hidrojeller, ya kovalent bağlarla çapraz bağlanmış ya da fiziksel molekül içi ve moleküller arası çekimler yoluyla bir arada tutulan hidrofilik polimerlerden oluşan üç boyutlu ağlardır [22].

Hidrojeller, büyük miktarlarda su veya biyolojik sıvıları, birkaç bin %'ye kadar emebilir ve çözünmeden kolayca şişebilir. Hidrojellerin yüksek hidrofilikliği, özellikle polimerik zincirlerin omurgası boyunca dağılmış karboksil, amid, amino ve hidroksil grupları gibi hidrofilik kısımların varlığından kaynaklanmaktadır. Şişmiş durumda, hidrojeller yumuşak ve kauçuksu olup, büyük ölçüde canlı dokulara benzer [22]. Ayrıca hidrojin şişmesi oksijen, besinler ve metabolitler gibi küçük moleküllerin geçişini kolaylaştırır [23].

Hidrojeller, çapraz bağlama mekanizmalarına göre fiziksel ve kimyasal hidrojeller olarak sınıflandırılabilir. Fiziksel çapraz bağlantılar dolaşmış zincirler, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim ve kristalit oluşumunu içerir. Bu fiziksel çapraz bağlar kalıcı bağlantılar olmasa da hidrojin sulu bir ortamda çözülmesini engellemek için yeterlidir. Kimyasal çapraz bağlar ise kovalent bağların oluşturduğu kalıcı bağlantılardır. Kovalent olarak çapraz bağlı bir ağ oluşturma yaygın bir yolu, makromerleri polimerize etmektir. Hidrojel ağları hem kalıcı bağlantıları hem de zincir dolanmaları gibi yarı kalıcı bağlantıları da içerebilir. Çapraz bağlanmanın türü ve derecesi, şişme özellikleri, elastik modül ve moleküllerin taşınması gibi ağ özelliklerinin çoğunu etkiler. Hidrojeller ayrıca iyonik yüklerine (nötr, katyonik, anyonik ve amfolitik), yapılarına (amorf, yarı kristalli ve hidrojen bağı) ve hazırlama yöntemlerine (homopolimer, kopolimer, multipolimer ve iç içe geçen polimer) göre sınıflandırılabilir [24].

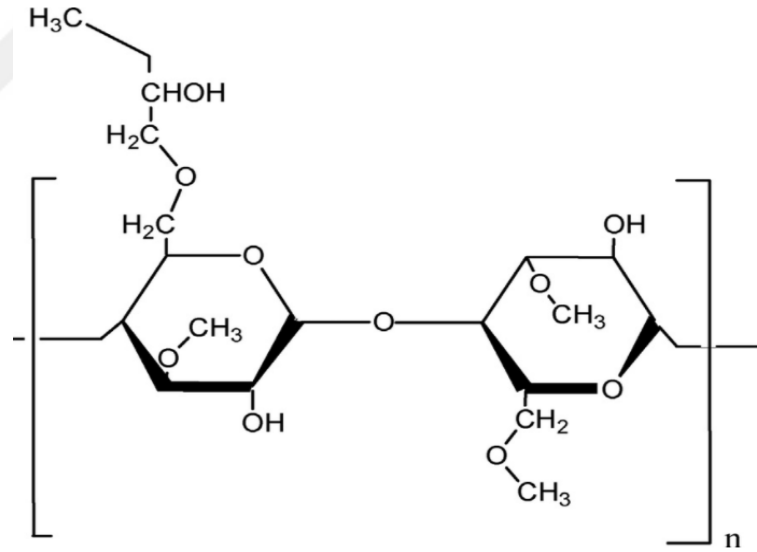
2.6 Metil Selüloz

Yaygın bir selüloz türevi olan metilselüloz (MS), çevre dostu olması, biyoyumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle biyomedikal, kozmetik, tekstil, mimari ve gıda alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [25]. MS sıcaklığa duyarlı bir polimerdir ve bu polimerler, temel olarak basit formülasyonları, uygulama kolaylıkları ve organik çözücülerin kullanımından

kaçınma olasılıkları nedeniyle ilaç dağıtım sistemleri olarak büyük potansiyele sahiptir [26].

MS sulu çözeltileri, ısıyla tersinir jelleşme özelliğine sahiptir ve sol-jel geçiş sıcaklığı 50 °C ile 70 °C arasındadır. MS zincirleri düşük sıcaklıkta kümeler halinde toplanmaktadır. Isıtıldığında ise kümeler ayrılır ve metil grupları sulu ortama maruz kalır. Sıcaklık daha da yükseldikçe MS'nin metili etrafındaki su molekülleri dağılır ve hidrofobik çapraz bağ ağı oluşur. Hidrofobik birleşme ve ayrışma, MS ve su molekülleri arasında oluşan hidrojen bağlarının değişiklikleriyle ilişkilidir [25].

Sulu çözücüler içinde çözünmüş MS, düşük sıcaklıklarda hidrofilik (su ve MS hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağları) yüksek sıcaklıklarda hidrofobik (hidrasyon kaybı nedeniyle hidrasyon kaybı metoksi gruplarının sergilenmesi ve aralarında daha yüksek etkileşim) özellik göstermektedir [27]. Metilselülozun molekül yapısı Şekil 2.5'te gösterilmektedir.

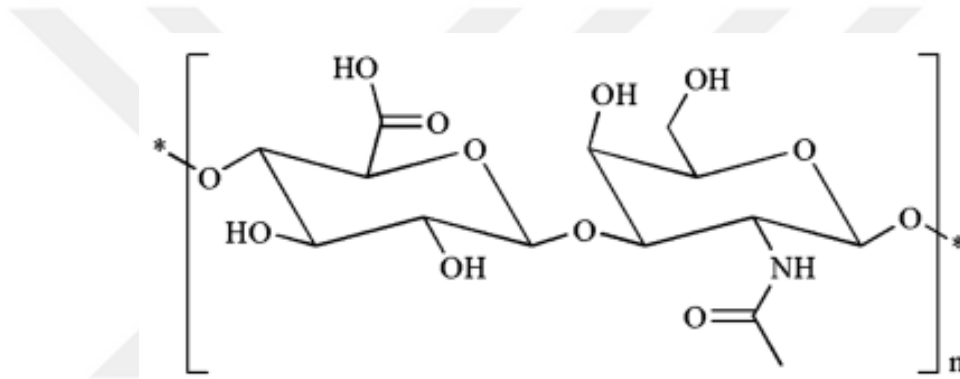


Şekil 2.5 Metil selüloz molekülü [28]

2.7 Hyalüronik Asit

Yüksek viskoelastisitesi, yüksek hidrofilikliği, nem tutma özelliği, polianyonik yapısı ve hücre dışı matrisin doğal bir bileşeni olarak hyalüronik asit (HA) veya diğer adıyla hyaluron, doku mühendisliği için mükemmel bir biyomateryal olarak kabul edilmektedir [29].

HA, immünojenik olmadığı ve biyouyumlu olduğu için yaygın bir kullanım bulmuştur. HA'nın inflamasyonu azalttığı, doku yapışmasını ve skar oluşumunu en aza indirerek yara iyileşmesini desteklediği bilinmektedir [30]. Şekil 2.6'da hyalüronik asit molekülü gösterilmektedir.



Şekil 2.6 Hyalüronik asit molekülü [31]

2.8 Akrilamid

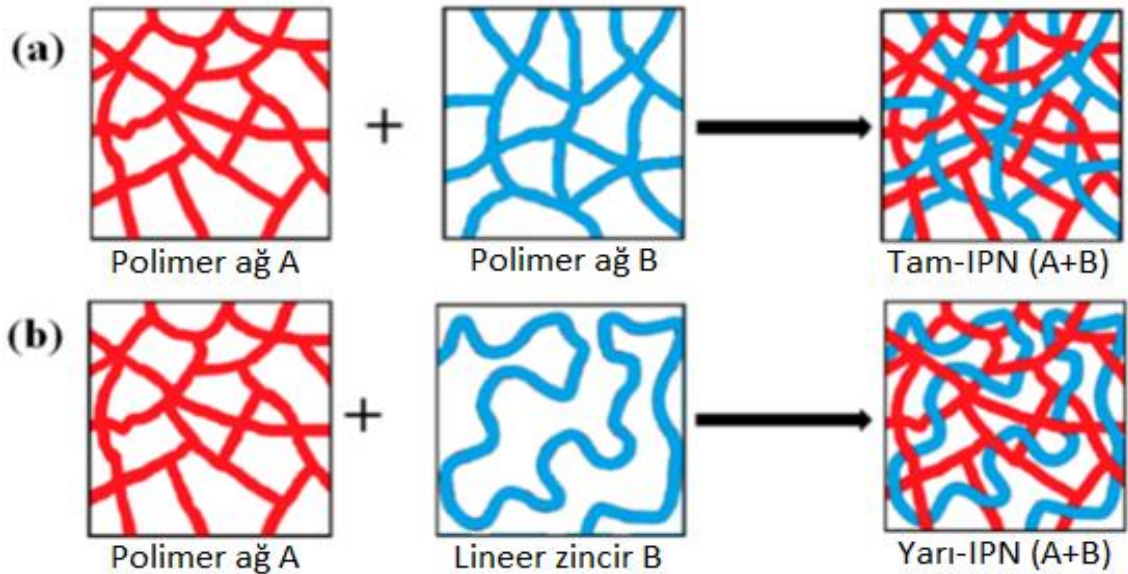
Akrilamid bazlı hidrojeller en yaygın olarak kullanılan hidrojellerdir ve küçük moleküler ağırlıklı bir monomer olarak iyi bilinirler. Akrilamid bazlı hidrojeller, fiziksel ve kimyasal uyarılara yanıt olarak önemli hacim geçişi sergiler. Bu hidrojel, akrilamidlerin alkil ve hidroksil alkil gibi gruplarla eklenmesiyle daha da geliştirilebilen yetersiz miktarda hidrolitik stabiliteye sahiptir. Poliakrilamid, akrilamid polimerinin çapraz bağlama etkisinden elde edilebilen sentetik bir polimerdir. Poliakrilamid hidrojeller geleneksel olarak polimerizasyon işleminde çapraz bağlama maddesinin dahil edildiği serbest radikal polimerizasyon yöntemi kullanılarak üretilir [32].

2.9 İç İçe Geçen Polimer Ağlar (IPN)

Bir iç içe geçen polimer ağı (IPN), iki veya daha fazla polimerik ağ arasında hiçbir kovalent bağ bulunmayan ve moleküler ölçekte en azından kısmen birbirine kenetlenmiş bir polimerik sistem sınıfıdır [33].

Mekanik mukavemeti ve şişme/şişme tepkisini arttırmak için, iç içe geçen polimer ağlar olarak çok bileşenli ağlar tasarlanmaktadır [34]. IPN'lerin ana avantajları, daha sert mekanik özellikler, daha geniş ölçüde kontrol edilebilir fiziksel özellikler ve nispeten yoğun hidrojel matrislerinin üretilebilmesidir. Geleneksel hidrojellere kıyasla daha verimli ilaç yüklemesi gerçekleşir. IPN gözenek boyutları ve yüzey kimyaları; ilaç salım kinetiğini, hidrojel-dokular arasındaki etkileşimleri ve jelin mekanik özelliklerini ayarlamak için de kontrol edilebilir [35].

Yarı ve tam olmak üzere 2 çeşit IPN mevcuttur. Bir yarı IPN'de, polimer ağlarından yalnızca biri çapraz bağlıdır, diğer polimer ise doğrusal durumunda kalır. Geçmeli ağ, bir çapraz bağlı polimer ve lineer bir polimerin kombinasyonu ile oluşturulur. Tam IPN yapısında ise, çapraz bağlı iki tane polimerden vardır. Bu polimer ağlar polimer ölçeğinde birbiriyle iç içe geçer [36], [33]. IPN mekanizmaları Şekil 2.7'de gösterilmiştir.

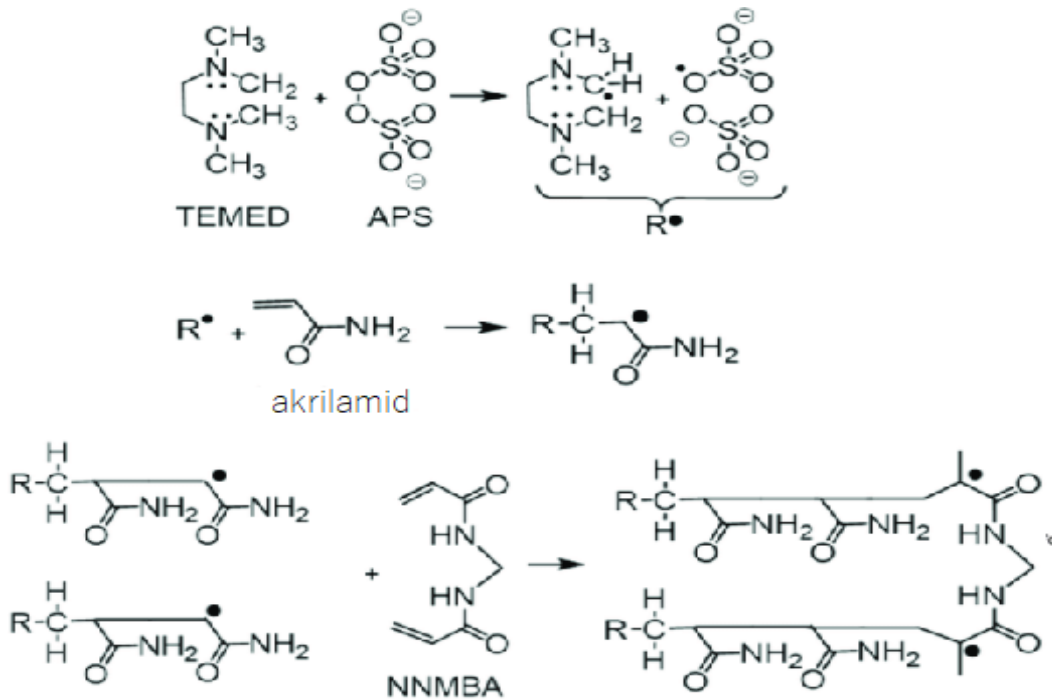


Şekil 2.7 İç içe geçen polimer ağlar sistemlerinin oluşumu (a) tam-IPN (b) yarı-IPN [33]

IPN'ler, ikinci polimerin monomerinin birinci polimerin ağ yapısında çözülmesi, ardından ikinci polimerin bir ağ oluşturmak için çapraz bağlanması (yani sıralı IPN) veya iki monomerin karıştırılması ve ardından bunları oluşturmak üzere çapraz bağlanmasıyla (eş zamanlı IPN) oluşturulabilir [33].

2.9.1 Akrilamid polimerleşme mekanizması

Poliakrilamid jeller, akrilamid ve bis-akrilamidin ("bis," N,N'-metilen-bisakrilamid (NNMBA)) kopolimerizasyonu ile oluşturulur. Reaksiyon, serbest radikal üreten bir sistem tarafından başlatılan vinil ilaveli polimerizasyondur. Polimerizasyon, amonyum persülfat (APS) ve tetrametilendiamin (TEMED) tarafından başlatılır. TEMED, persülfattan serbest radikallerin oluşum hızını hızlandırır ve Bu radikaller polimerizasyonu katalize eder. Persülfat serbest radikalleri, akrilamid monomerlerini serbest radikallere dönüştürür. Oluşan bu serbest radikaller aktive edilmemiş monomerlerle reaksiyona girerek polimerizasyon zincir reaksiyonunu başlatır. Uzayan polimer zincirleri, bis-akrilamid ile rastgele çapraz bağlanır. Polimerizasyon koşullarına ve monomer konsantrasyonlarına bağlı olarak karakteristik bir gözenekliliğe sahip jeller meydana gelir. [37]. Şekil 2.8'de iç içe geçen polimer ağlar oluşturmak için kullanılan akrilamidin polimerleşme reaksiyonları gösterilmektedir.



Şekil 2.8 Akrilamidin polimerleşme mekanizması [38]

2.9.2 Akrilamid polimerleşme mekanizmasını etkileyen parametreler

Birden fazla parametre polimerleşme mekanizmasını etkilemektedir. Bu parametreler aşağıda açıklanmıştır.

2.9.2.1 Sıcaklık

Sıcaklığın jel oluşum hızı üzerinde doğrudan bir etkisi vardır ve polimerizasyon reaksiyonu ekzotermiktir. Sonuç olarak, üretilen ısı reaksiyonu daha hızlı yönlendirir. Bu nedenle, polimerizasyon başladığında jelleşme genellikle çok hızlı gerçekleşir [37].

Sıcaklık jelin özelliklerini de etkilemektedir. Örneğin, 0-4°C'de polimerizasyon bulanık, gözenekli, elastik olmayan jeller ile sonuçlanır ve tekrarlanabilirliğin elde edilmesi zordur. Bu özellikler, düşük sıcaklıklarda monomerin artan hidrojen bağına bağlı olabilir. 25°C'de polimerize edilen jeller ise daha şeffaf, daha az gözenekli ve daha elastiktir. Fakat polimerizasyon sıcaklığı çok daha yüksekse kısa polimer zincirleri oluşur ve jeller esnek özellik göstermez. Bunun daha yüksek sıcaklıklarda polimer zincir sonlandırmasının artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 23-25°C polimerizasyon için en uygun sıcaklıktır. Ayrıca jel döküldüğünde monomer çözeltisinin ve jel kalıbının (örneğin cam plakalar veya tüpler) optimum sıcaklıkta olması önemlidir [37].

2.9.2.2 Oksijen

Poliakrilamid jellerin oluşumu, serbest radikal yoluyla ilerler. Bu nedenle reaksiyon, bir serbest radikal tuzağı görevi gören herhangi bir element veya bileşik tarafından engellenebilir. Oksijen de böyle bir inhibitördür. Havada bulunan, jel içerisinde çözünen veya plastik, kauçuk vb. yüzeylere adsorbe edilen oksijen akrilamid polimerizasyonunu engellemektedir [37].

2.10 Propolis

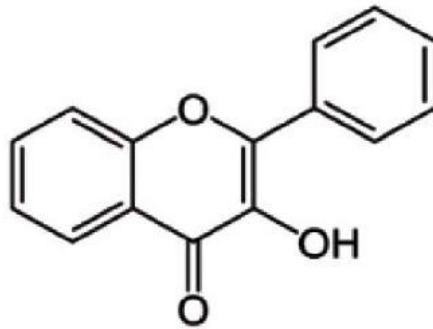
Propolis, bal arıları tarafından çeşitli bitkilerden toplanan doğal bir maddedir. Propoliste fenolik bileşikler, aromatik asitler, uçucu yağlar, balmumu ve amino asitler gibi 300'den fazla bileşik tanımlanmıştır [39].

Propolisin, anti-bakteriyel, anti-enflamatuar, anti-viral, anti-oksidan, anti-protozoal, anestezik, anti-tumoural, antikanser, anti-mantar, antiseptik, anti-

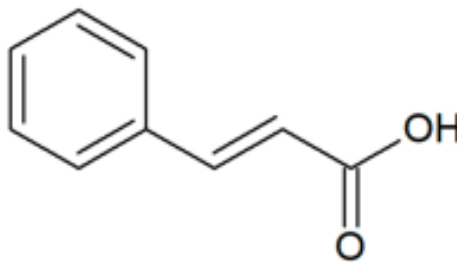
mutajenik ve anti-hepatotoksik özellikleri bulunmaktadır. Sitotoksik aktivite için de kullanılmaktadır. Propolisin biyolojik özellikleri; kimyasal bileşimine, bitki kaynaklarına, coğrafi bölgeye ve mevsimlere bağlıdır [39].

Propolis genellikle 60-70 °C arasında erirken, bazı türleri 100 °C'de erimektedir. Etanol, metanol, kloroform, eter ve aseton gibi çözücülerde çözünmektedir. Fakat en iyi sonucu etanol vermektedir [39].

Propolis, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakterilere karşı önemli bir etkiye sahiptir. Propolis, bakteri hücresinin bölünmesini durdurmak, hücre duvarını, bakteriyel sitoplazmayı yok etmek ve protein sentezini durdurmak için bakterisidal bir ajan görevi görmektedir [39]. Propolis bileşenleri doku onarımı ve yaralanmanın yenilenmesi üzerinde propolisin terapötik yeteneğine sahiptir. Ayrıca propolisin enflamatuar yaralanmadaki serbest radikallerin miktarını azalttığı, kollajen ve bileşenlerinin gelişimini arttırdığı belirlenmiştir [39]. Şekil 2.9 ve Şekil 2.10'da propoliste bulunan bazı moleküller gösterilmiştir.



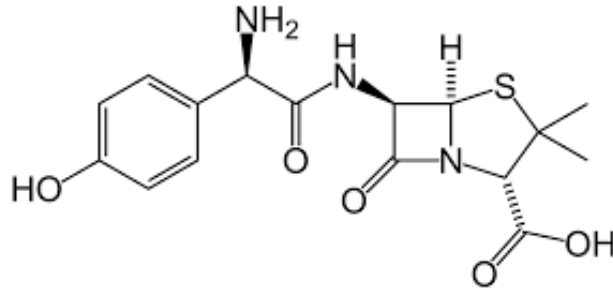
Şekil 2.9 Flavonol molekülü [40]



Şekil 2.10 Sinamik asit molekülü [41]

2.11 Amoksisilin

Amoksisilin en çok kullanılan antibiyotiklerden biridir. Penisilin grubudur. Genellikle hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriyel enfeksiyonlara karşı tedavi veya profilaktik olarak kullanılır. Ayrıca iyileşme sürecinde yara enfeksiyonuna karşı profilakside yeterli etkinlik gösterdiği görülmüştür [42]. Şekil 2.11’de amoksisilin molekülü verilmiştir.



Şekil 2.11 Amoksisilin molekülü[43]

2.12 Konuyla İlgili Yapılmış Çalışmalar

Tez çalışması kapsamında, hyalüronik asit-metil selüloz hibrit jellerine ait literatür çalışması yapıp aşağıda özetlenmiştir.

Law vd. (2018) yaptıkları çalışmada 8 farklı konsantrasyona sahip MS/HA hidrojel jelleri hazırlamışlardır. Hazırladıkları bu hidrojel jelleri mezenkimal kök hücreleri beraber 3B yazıcı ile basmışlardır. Basılabilirlik, şişme, stabilite, reolojik davranış, yapısal davranış ve mezenkimal kök hücrelerin canlılık testleri yapılmıştır. HAMS'ın hızlı jelleştiği, yazdırılabilir olduğu, istenen mekanik özellikler ve hücre canlılığı sergilediği ve daha fazla çalışma ile birçok 3B biyobaskı uygulaması için umut verici bir hidrojel olabileceği sonucuna varmışlardır. Basılabilirlik için %1 (ağırlıkça) HA ve %3 (ağırlıkça) MS karışımı en iyi doğruluğu göstermiştir, ancak daha yüksek viskoziteli MS/HA karışımları çok katmanlı 3B biyobaskıya daha uygun olduğu belirtilmiştir. MS/HA'de kapsüllenen mezenkimal kök hücreler, 3B basılabilmıştır ve MS/HA'de en az bir hafta canlı kalmıştır [5].

Mayol vd. (2014) yaptıkları çalışmada, yara iyileşmesi veya ilaç dağıtımı için kullanılabilecek HAMS hibrit jellerinde, HA moleküler ağırlığının karışımın termojelasyonu ve biyoyumluluğu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yapılan

Çalışmada düşük molekül ağırlıklı HA kullanılarak hazırlanan HAMS'ların 20  C'de viskoz bir çözelti ve 37  C'de zayıf bir jel için tipik bir reolojik davranış gösterdiği belirtilmiştir. Düşük moleküler ağırlıklı HA içeren karışımlar, insan sünnet derisi fetal fibroblastlarının canlılığını, çoğalmasını ve göçünü etkilememiştir. Aksine, yüksek moleküler ağırlıklı HA ile hücre inkübasyonu, kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılığında belirgin ve önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, MS ile karışımda aynı konsantrasyon aralığında yüksek molekül ağırlıklı HA'nın bulunması termojelasyon sürecini engellemiştir [26].

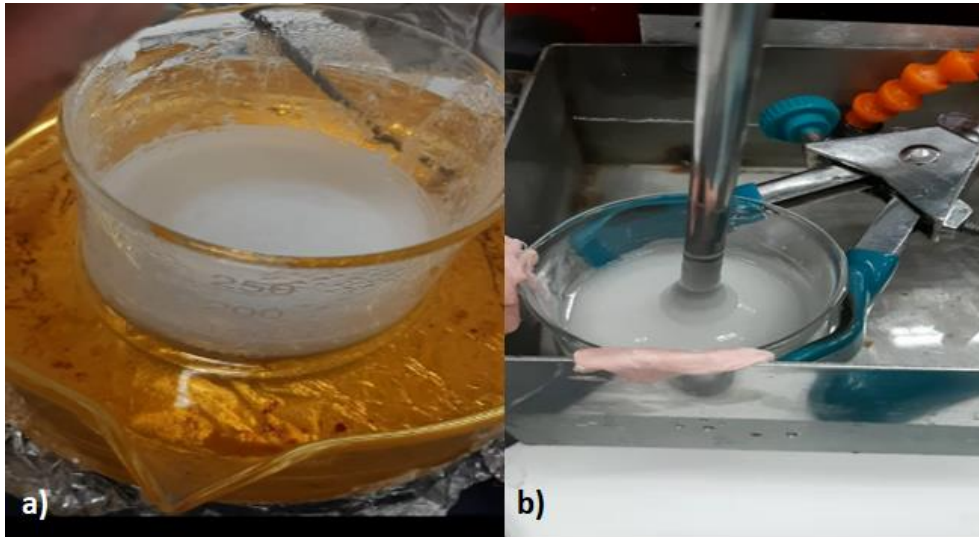
Aprodu vd. (2019) yaptıkları çalışmada inflamatuvar bağırsak hastalığı için bir model makromoleküler ilaç, yani floresan etiketli bovin serum albümini içeren, mukozal iyileştirme özelliklerine sahip MS ve HA bazlı bir hidrojel sistemi hazırlamışlardır. 37  C'de MSHA sisteminden bovin serum albümini salımı doğrusal olarak gözlemlenmiş ve yüklenen ilacın %50'sinin 2 saat içinde salıverildiği belirtilmiştir. Ayrıca sistem, yüksek konsantrasyonlarda bile bağırsak kolon epitel hücrelerine karşı kabul edilebilir toksisite göstermiştir [44].

3.1 Materyal

Metil selüloz (MS), amonyum persülfat (APS), akrilamid (AAM), tetrametilendiamin (TEMED), amoksisilin (AMX) (Sigma Aldridge firmasından temin edildi). N,N' metilenbisakrilamid (MBA) (Acros Organics firmasından temin edildi). Sodyum hyalüronat (SA) (Esperis firmasından temin edildi). Propolis (Ege bölgesinden toplandı).

3.2 Jel Numunelerin Üretilmesi

MS, 90 °C'de saf su içinde, bir yağ banyosunda 4 saat boyunca karıştırıldı ve ağırlıkça %8 metil selüloz çözeltisi elde edildi. Çözelti soğutulduktan sonra, ağırlıkça %2 olacak şekilde hyaluronik asit ve kullanılan saf su ile aynı miktarda pH 7.4 fosfat tampon çözeltisi (PBS) ilave edildi. Akrilamid, metilenbisakrilamid ve amonyum persülfat iç içe geçen bir polimer ağı oluşturmak için HA ve MS miktarıyla orantılı olarak hidrojel içine ilave edildi ve gece boyunca +4 °C'de karıştırıldı. Şekil 3.1'de hidrojel üretim aşamaları gösterilmektedir.

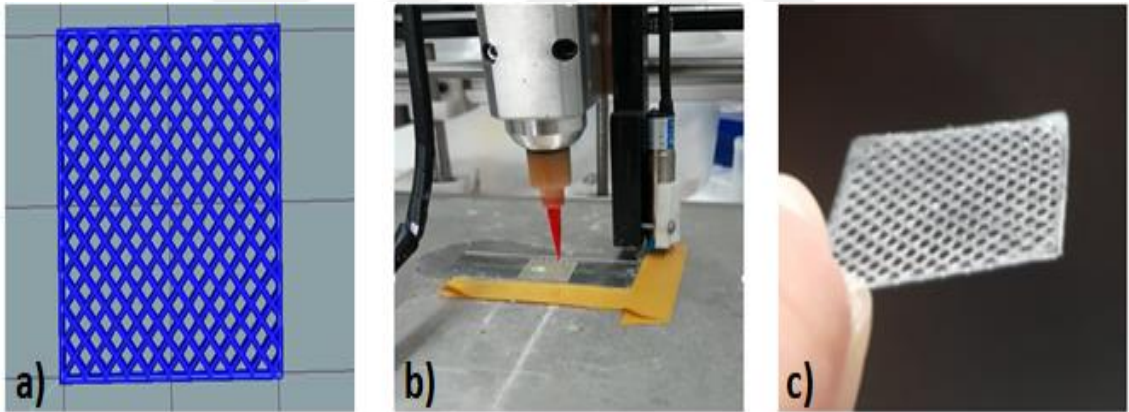


Şekil 3.1 Hidrojel üretim mekanizması (a) yağ banyosunda MC çözeltisi hazırlama
(b) hidrojin +4 °C buz banyosunda döndürülmesi

HAMS hidrojel matrisi, propolis (hacimce %10, %20, %30) ve amoksisilin (ağırlıkça %0.1, %0.3 ve %0.5) olacak şekilde katkılandırıldı. Eklenecek propolis ekstratı, 3 g propolisin 100 ml etanol içinde 2 saat boyunca 350 rpm'de çözündürülmesiyle hazırlandı. Daha sonra süzgeç kağıdı ile süzüldü. Süzgeç kağıdında kalan katı faz etüvde kurutularak içindeki etanol uzaklaştırıldı ve tartımı yapıldı. Kuruyan faz 1,5 g olarak ölçüldü. 100 ml etanolda 1,5 g aktif propolis maddesi elde edilmiş oldu.

3.3 3B Biyobasım

10 ml hidrojel içerisine 1 damla TEMED eklemesi yapıldıktan sonra 3B basıma geçildi. Basılacak model CAD programı üzerinden 2x2 cm² olacak şekilde oluşturuldu. 3B biyobasım çalışmaları ekstrüzyon temelli bir yazıcıda gerçekleştirildi. Yazıcı tabla sıcaklığı 37 °C'ye ayarlandı. Her katman 1mm olacak şekilde 10 katman basım yapıldı. Doku iskelesi 3B biyobasım aşamaları Şekil 3.2'de gösterildi



Şekil 3.2 Doku iskelesinin 3B basım aşamaları (a) bilgisayarda çizilen CAD modeli (b) ekstrüzyon prensipli yazıcı ile 3B basım (c) basılmış doku iskelesi örneği

3.4 Doku İskelelerinin Basılabilirlik Karakterizasyonu

Her bir doku iskelesi numunesinin farklı bölgelerinden 50 farklı gözenek boyutu ölçüldü. Bilgisayarda çizilen doku iskelesi modeli ile 3B biyoyazıcı ile basılan doku iskelelerinin gözenek boyutları karşılaştırıldı ve sapma oranı hesaplandı.

3.5 Doku İskelelerinin Morfolojik Özellikleri

Numunelerin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edildi. Analiz öncesinden numuneler altın ile kaplanarak iletken hale getirildi.

3.6 Doku İskelelerini Kimyasal Yapı Karakterizasyonu

Doku iskelelerinin kimyasal bağ yapısı FTIR ile belirlendi. Ölçümler 400-4000 cm⁻¹ dalga boyları arasında yapıldı.

3.7 Doku İskelelerini Termal Karakterizasyonu

Doku iskelelerinin termal davranışını gözlemlemek için DTA/TG analizi yapıldı. DTA ile bir inert referans madde ve numune arasındaki sıcaklık farkı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ve TGA ile de ağırlık değişimi sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçüldü. Analiz 10 °C/dk ısıtma hızıyla 25 – 600 °C arasında azot atmosferinde gerçekleştirildi.

3.8 Doku İskelelerinin Şişme Davranışları

Doku iskelesi örnekleri 5 ml PBS (pH 7.4) çözeltisini içerisinde konuldu. 37 °C'de etüvde bekletildi. Belli zaman aralıklarında şişmiş doku iskelesi tartımı yapıldı. Şişme oranı formül (3.1) ile belirlendi.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_s} \quad (3.1)$$

Ws = Doku iskelesinin şişmiş ağırlığı

Wd = Doku iskelesinin kuru ağırlığı

3.9 Doku İskelelerinin Biyobozunurluğu

Doku iskelesi örnekleri 5 ml PBS (pH 7.4) çözeltisini içerisinde konulmuştur. 37 °C'deki etüvde bekletilmiştir. Belli zaman aralıklarında PBS içerisinde çıkarılan doku iskeleleri, içerisindeki PBS tamamen uzaklaşana kadar etüvde kurutulmuştur. Kuruyan doku iskelelerinin tartımı yapılmıştır. Biyobozunma oranı (3.2)'deki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Bozunma oranı (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \quad (3.2)$$

W1= İlk iskele ağırlığı

W2 = Bozunmuş iskele ağırlığı

3.10 Doku İskelelerinin Bakteriyel Hassasiyet Deneyleri

Doku iskelelerinin antibakteriyel aktivitesini belirlemek için disk difüzyon testi yapıldı [45]. *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 25923) süspansiyonları, 18 saatlik besleyici broth kültürlerinden toplandı ve ardından 0,5 McFarland standart bulanıklığa (1.5×10^8 CFU/mL) ayarlandı ve istenen bakteri yoğunluğuna seyreltildi (1:10). Mueller-Hinton agar plakaları 0.1 ml bakteri süspansiyonu (1.5×10^6 CFU/mL) ile aşılandı. Doku yapı iskeleleri 2 saat UV ile sterilize edildi ve ardından bakteri kaplı petri kaplarına yerleştirildi. Plakalar 24 saat 37°C'de inkübe edildi, ardından disklerin etrafındaki inhibisyon bölgesi bir dijital mikrometre ile ölçüldü [46].

3.11 Doku İskelelerinin Hücre Kültürü Deneyleri

Hücre canlılığı testi için fibroplast hücreleri (L929) ve keratinosit hücreleri (HaCaT) olmak üzere 2 farklı hücre türü üzerinde çalışıldı. İnsan fibroblast hücreleri %10 FCS ve %1 penisilin-streptomisin ile desteklenmiş DMEM'de, %5 CO₂ ile 37 °C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde tutuldu. Hücre canlılığı 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) tahlili ile değerlendirildi. 10⁴ fibroblast hücresi/kuyu, 96 oyuklu plakalara ekildi ve hücrelerin yüzeye yapışmasını sağlamak için 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu arada, Propolis ve amoksilin katkılı doku iskeleleri 5 ml'lik bir kültür ortamında 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra kültür ortamına 20µl eklendi ve 24 ve 48 saat inkübe edildi. Kontrol grubu, ilaçsız bir besiyeri ile tedavi edildi. İşlemden sonra her kuyucuğa 10 µl MTS solüsyonu eklendi ve 2 saat 37 °C'de inkübe edildi. Absorbans, bir mikropilaka okuyucu ile 490 nm'de ölçüldü. Herhangi bir ilaç tedavisi olmaksızın kontrol büyümesinin %100 canlı olduğu kabul edildi ve bağıl canlılık (3.3)'deki gibi hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Tedavi edilen hücrelerin OD değeri}}{\text{Kontrol hücrelerinin OD değeri}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.12 Propolis ve AMX'in Salınım Testleri

Doku iskeleleri 37°C'de PBS pH 7.4 ortamında bekletildi. Salım testleri için doku iskelelerinin bekletildiği sıvıların belli zaman aralıklarında UV spektrofotometre analizi yapıldı. Kalibrasyon eğrileri oluşturmak için propolis ve AMX çözeltileri hazırlandı. UV ölçümleri AMX için 240 nm'de propolis içinse 210 nm'de gerçekleştirildi.

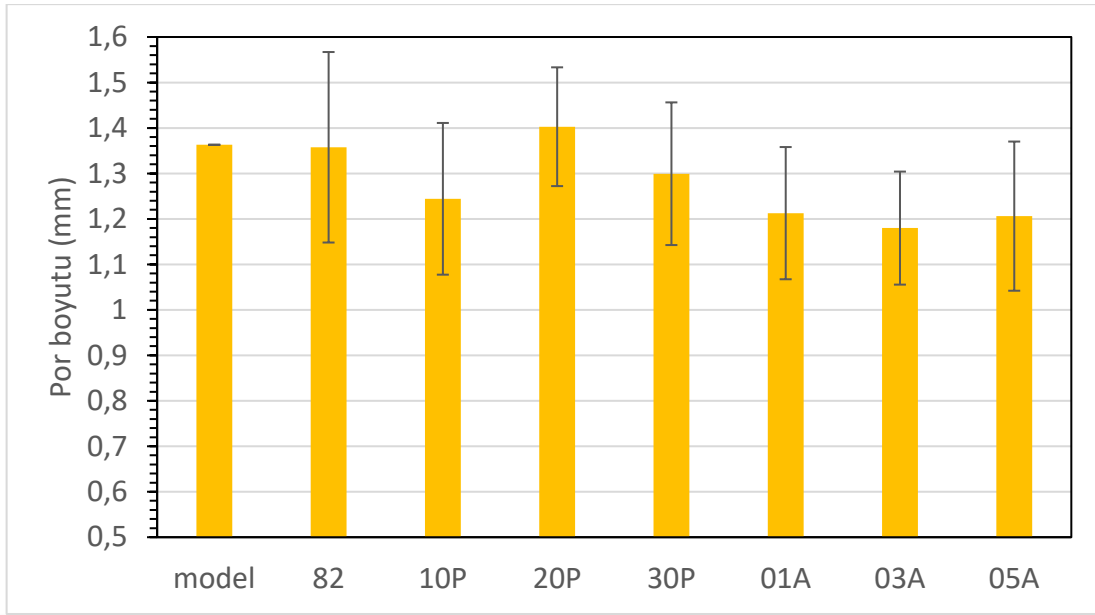


Doku iskeleleri için kısaltma adlar kullanılmıştır. 82 (ana matriks), 10P (%10 propolis içeren iskele), 20P (%20 propolis içeren iskele), 30P (%30 propolis içeren iskele), 01A (%0.1 AMX içeren iskele), 03A (%0.3 AMX içeren iskele), 05A (%0.5 AMX içeren iskele).

4.1 Jellerin Basılabilirliği

Her bir doku iskelesi numunesine ait ortalama por boyutu ve model olarak çizilen doku iskelesine ait por boyutu şekil 4.1’de gösterildi. Doku iskelelerine ait % hata ve standart sapma oranları ise tablo 4.1’de gösterildi.

Bilgisayar ortamında çizilen doku iskelesi modelinin por boyutu 1,363 mm olarak ölçüldü. 1,358 mm por boyutu ve %0,4 basım hata oranı ile 82 doku iskelesi en yakın sonucu verdi. 1,403 mm por boyutu ve %2,83 basım hata oranı ile 20P doku iskelesi propolis katkılı iskeleler arasında en iyi basım sonucunu verdi. 1,213 mm por boyutu ve %11,03 basım hata oranı ile 01A doku iskelesi AMX katkılı doku iskeleleri arasında en iyi sonucu gösterdi. 03A doku iskelesi ise tüm numuneler arasında 1,18 mm por boyutu ve %13,44 basım hata oranı ile en verimsiz sonucu verdi. Katkı maddesi eklenmesi basım verimini düşürdü. Propolis katkısı AMX katkısına göre daha iyi basım performansı gösterdi. Bu durum propolisin içerdiğinde bulunan çift bağlı moleküllerin serbest radikal oluşturarak jel polimerleşme mekanizmasına katılması, dolayısıyla da daha viskoz ve mekanik olarak daha kuvvetli bir hidrojel elde edilip bu özellik sayesinde hidrojin basım sırasında dağılmasının engellendiği olarak yorumlandı [47],[48]. Şekil 2.10’da propolis içerisinde bulunan çift bağlı molekül örnek gösterildi.



Şekil 4.1 Doku iskelelerinin por boyutlarının karşılaştırılması

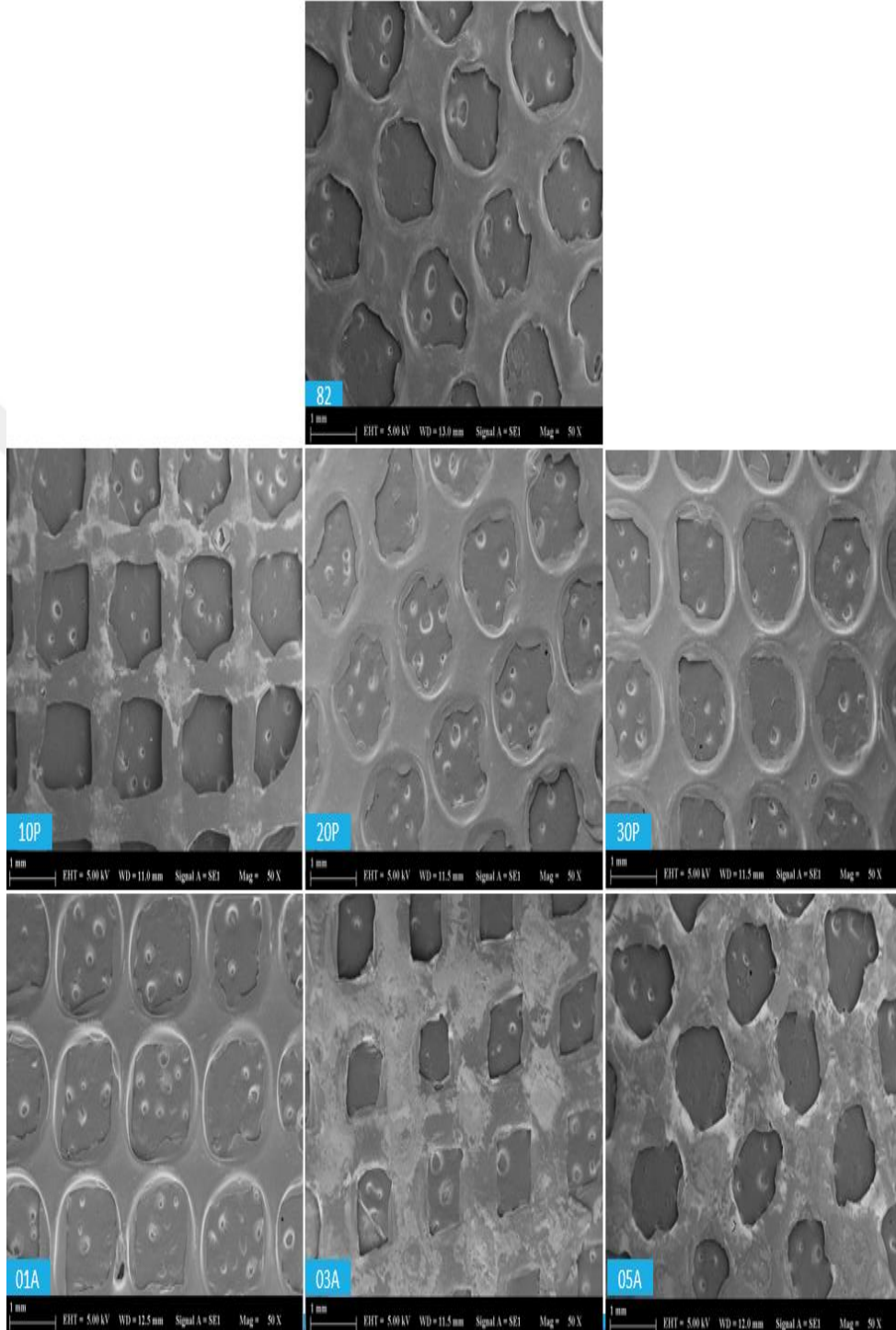
Tablo 4.1 Basılabilirlik hata oranları ve standart sapmalar

Numune	Basım hatası	Standart sapma
82	% 0,4	0,209453
10P	% 8,72	0,166796
20P	% 2,83	0,130581
30P	% 4,67	0,156857
01A	% 11,03	0,145367
03A	% 13,44	0,124262
05A	% 11,51	0,164033

4.2 Morfolojik Özelliklerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi

Şekil 4.2’de doku iskelesi örneklerinin 50X yakınlaştırılmış SEM görüntüleri verildi. Propolis katkısının gözenek boyutunu ana matriksin gözenek boyutuna yakın etki gösterdiği belirtildi. 10P ve 30P gözenek şekli olarak iyi sonuç gösterdi.

AMX miktarının arttırılması basım sırasında doku iskelesi gözeneklerinin dağılmasına neden oldu. Özellikle 03A numunesinde gözenek boyutunun oldukça daraldığı gözlemlendi.

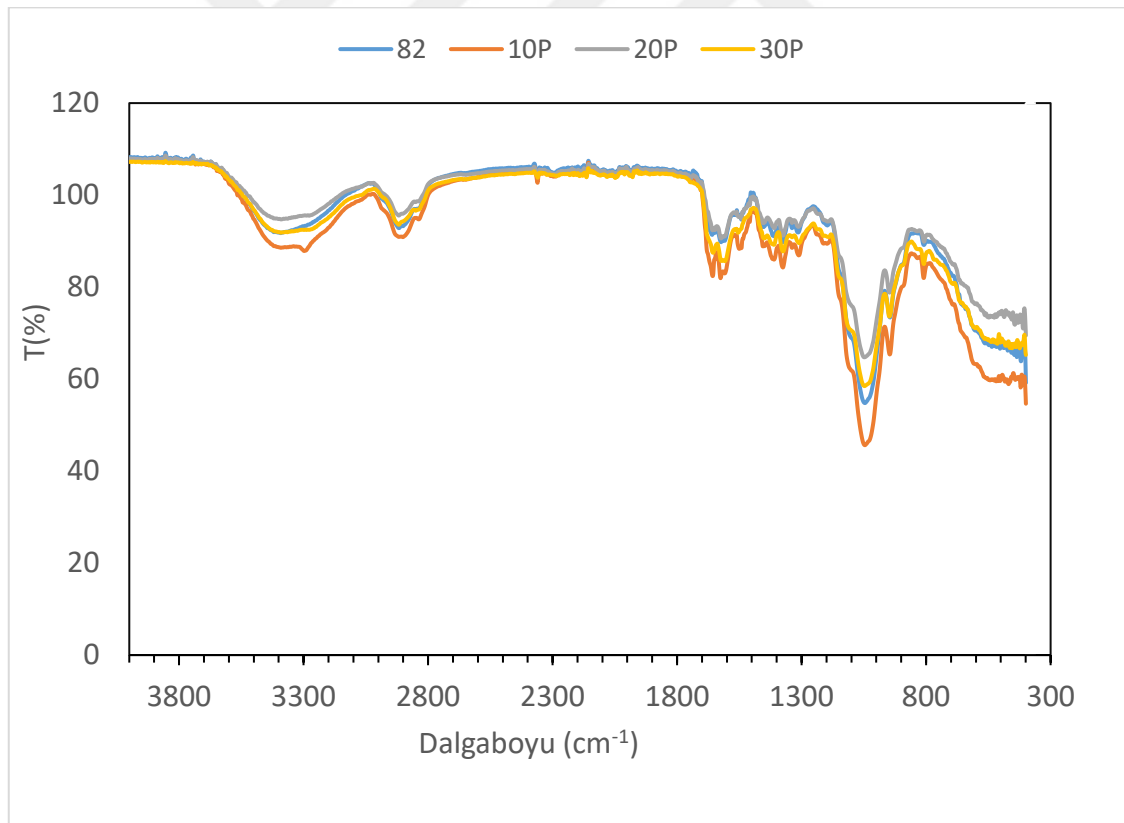


Şekil 4.2 Doku iskelesi numunelerinin SEM görüntüleri

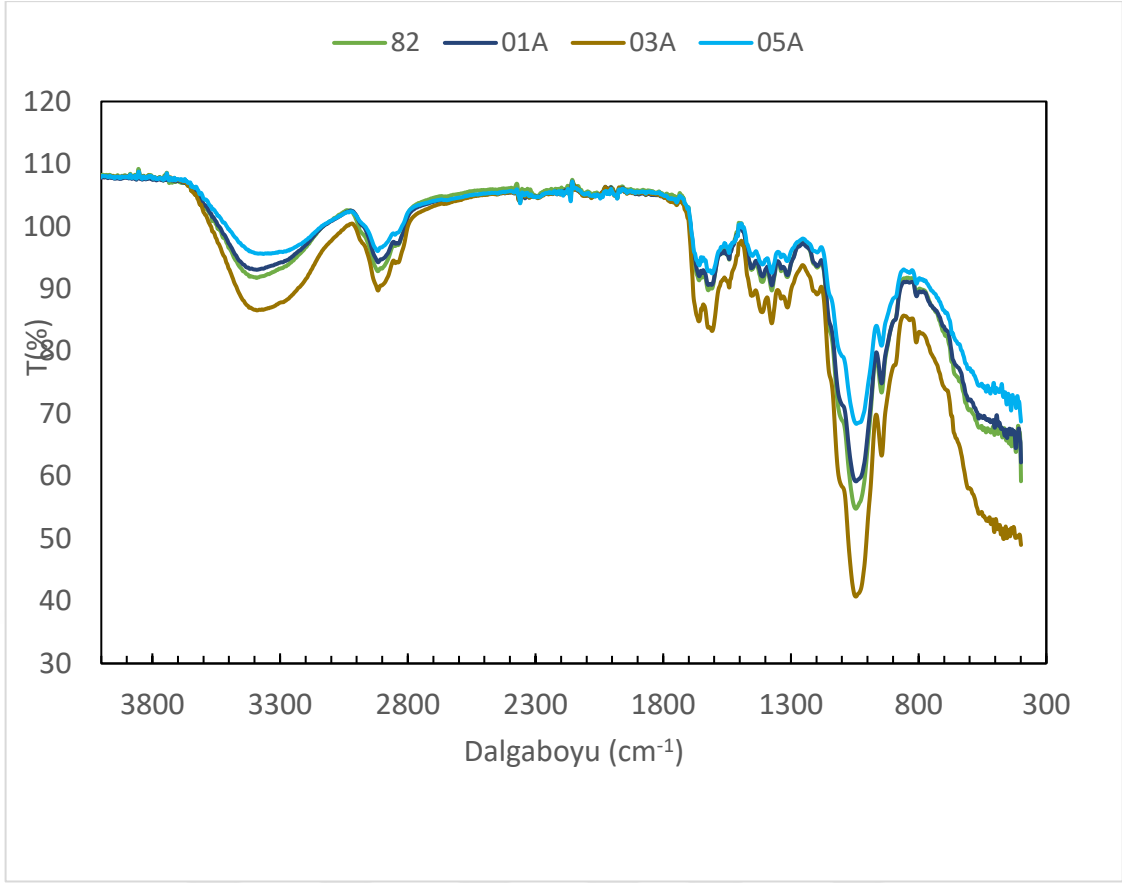
4.3 Doku İskelelerinin FTIR Sonuçları

Doku iskeleleri büyük oranda HA, MS ve poliakrilamidden olmuştur. Bu polimerlerin pikleri yüksek oranda gözlemlendi. Ayrıca bazı malzemelerin pikleri üst üste çıkılabileceğinden dolayı piklerin birbirlerini gizlemesi gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir. Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'te doku iskelelerinin FTIR spektrumları gösterildi.

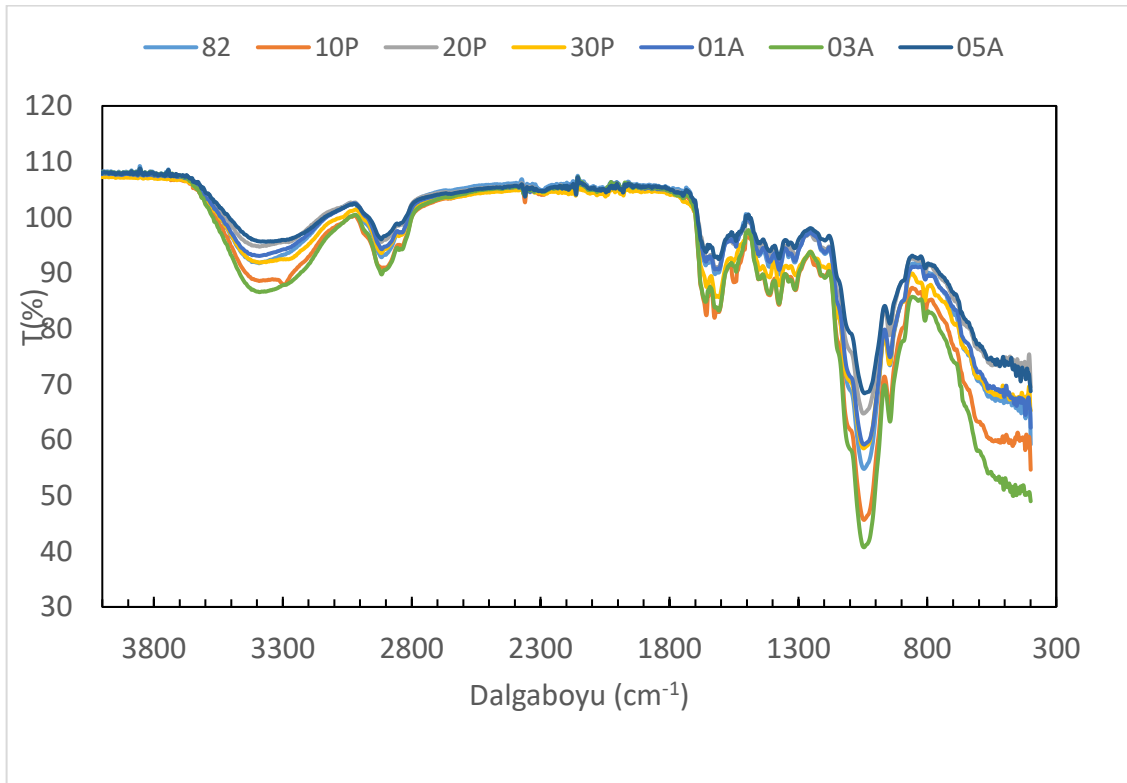
HA'dan kaynaklı olarak, 3200 ila 3600 cm^{-1} arasında belirgin bir amid N-H gerilmesi görüldü; 1595 – 1710 cm^{-1} 'de C=O gerilmesine ve N-H bükülmesinden dolayı ek bir amid zirvesi gözlemlendi. Ayrıca 1350- 1480 cm^{-1} arasında bir C-H₂ bükülmesi ve proteoglikan şeker halkasının 985-1100 cm^{-1} arasında C-O gerilmesi belirlendi [49]. MS'deki CH₃'den dolayı atanan 2900 cm^{-1} civarındaki C-H gerilme bantları gözlemlendi [50]. Poliakrilamid'in amid bantları 1660 ve 1600 cm^{-1} arasında belirtildi [51].



Şekil 4.3 Ana matriks ve propolis katkılı doku iskelelerinin FTIR spektrumları



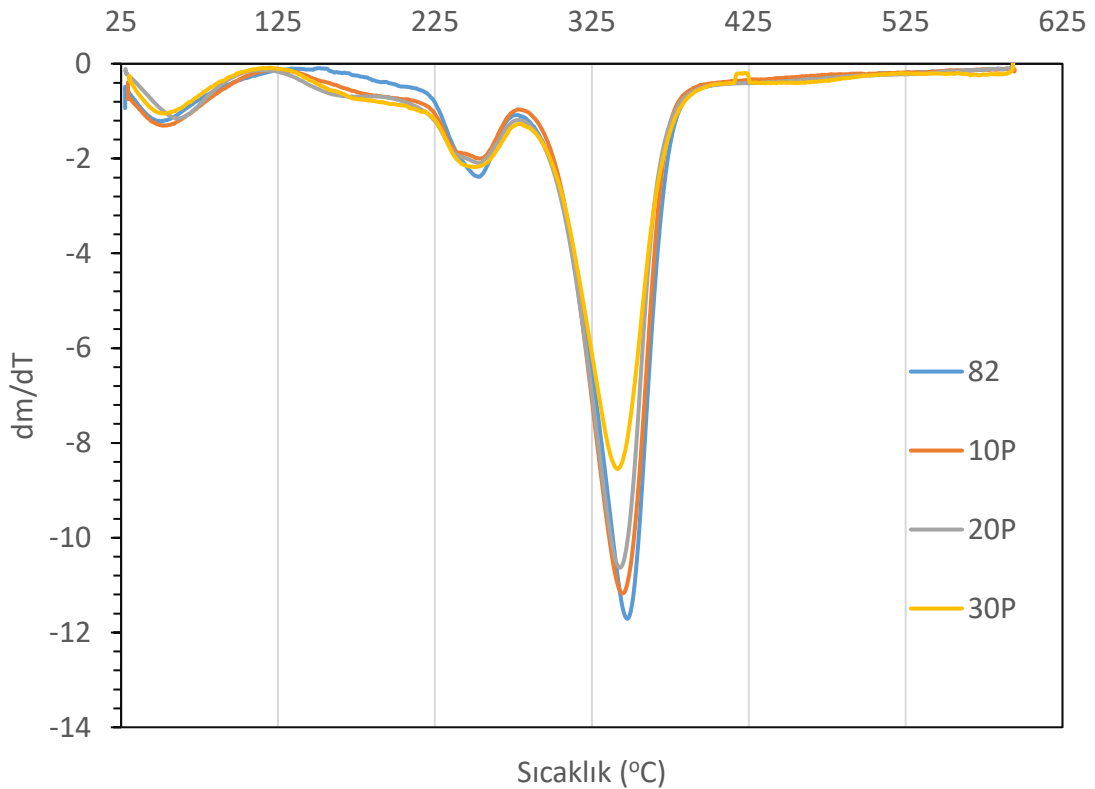
Şekil 4.4 Ana makriks ve AMX katkılı doku iskelelerinin FTIR spektrumları



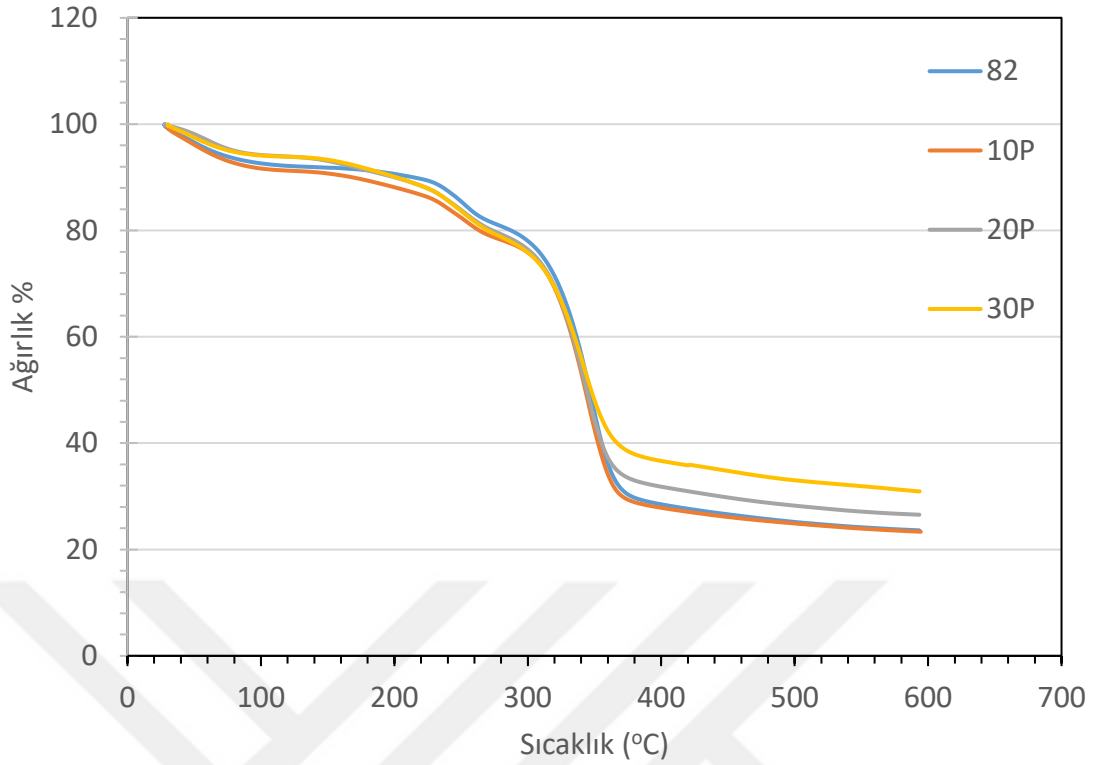
Şekil 4.5 Doku iskelelerinin FTIR spektrumları

4.4 Doku İskelelerinin Termal Analiz Sonuçları

Termal analiz için TG/DTA yöntemi kullanıldı. Şekil 4.6 propolis katkılı doku iskeleleri için DTA analizi eğrilerini gösterildi. 50 °C'de oluşan ilk pik doku iskeleleri içerisinde kalan nemin uzaklaştığı sıcaklık olarak ölçüldü [52]. 225-325°C arasında oluşan 2 boyunlu pik HAMS sisteminin yani hem HA'nın hem de MS'nin bozunduğu sıcaklık olarak belirlendi [53]. Yaklaşık 340°C'de oluşan pik ise poliakrilamindin bozunduğunu görüldü [54]. Pik uzunluklarına bakıldığında en kısa pikin 30P doku iskelesine sahip olduğu görüldü. Bu durum 30P'nin yavaş bozunduğunu dolayısıyla daha dayanıklı olduğunu gösterdi. Şekil 4.7'deki propolis katkılı doku iskelelerinin TG analizine bakıldığında ise en az ağırlık kaybının 30P doku iskelesinde olduğu onu sırasıyla 20P ve 10P doku iskelelerinin takip ettiği görüldü. Sonuç olarak ana matrikse propolis eklenmesi ve miktarının artırılması termal dayanımı arttırdığı belirlendi. Bu durum propolisin çapraz bağlanmaya katılmasına atfedildi [47],[48].

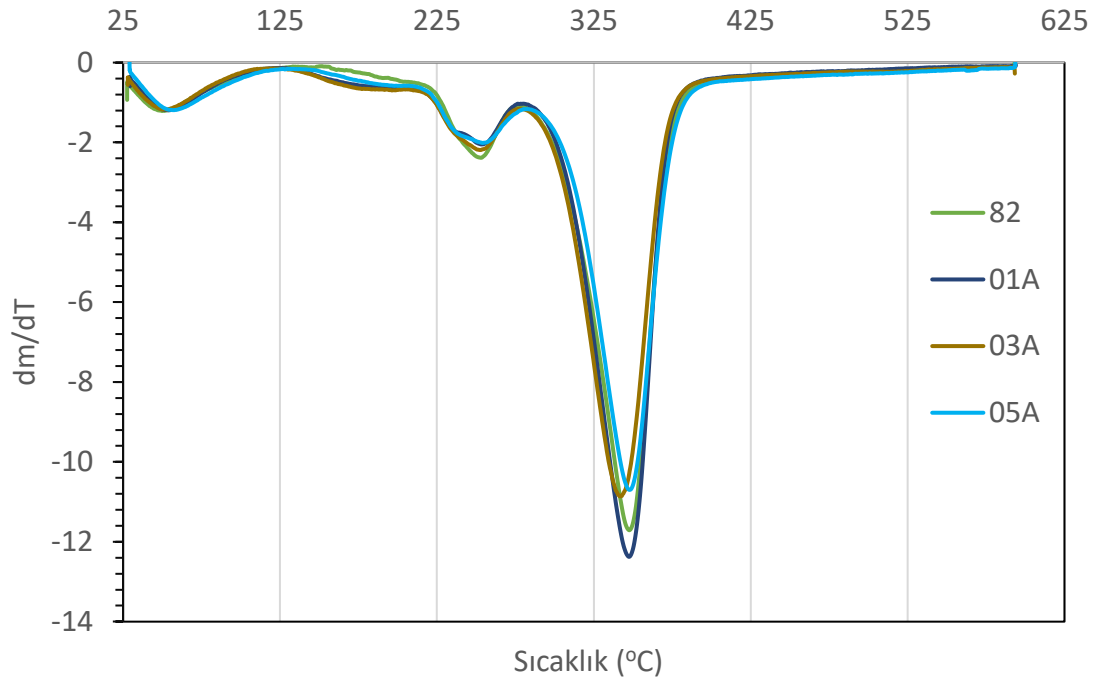


Şekil 4.6 Propolis katkılı doku iskeleleri için DTA analizi

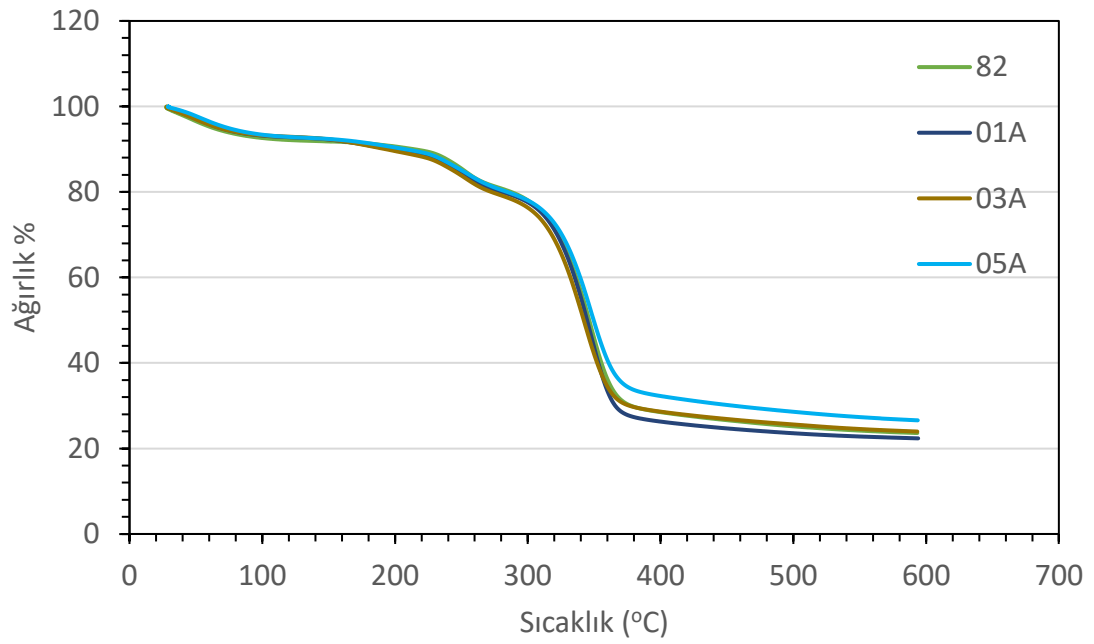


Şekil 4.7 Propolis katkılı doku iskeleleri için TG analizi

Şekil 4. 8 ve 4.9 AMX katkılı doku iskeleleri için sırasıyla DTA ve TG analizi eğrilerini gösterildi. Aynı şekilde 52 °C'deki ilk pik doku iskelesi içerisinde kalan veya adsorplanan nemin uzaklaştığı sıcaklığı, 225-325 °C arasındaki 2 boyunlu pik HAMS sisteminin bozunduğu, yaklaşık 345 °C'deki pik ise poliakrilamidin bozunma sıcaklığını gösterdi. Şekil 4.8'deki DTA eğrisindeki pik uzunluklarına ve şekil 4.9'daki doku iskelelerinin ağırlık kaybı miktarına bakıldığında AMX içeren doku iskelelerinde arasında en uzun pikin yanni en hızlı bozunmanın ve en fazla ağırlık kaybının 01A doku iskelesi tarafından gerçekleştiği gözlemlendi. Dolayısıyla termal olarak en zayıf özelliğe sahip olanın 01A doku iskelesi olduğu belirlendi. En kısa pik yani en yavaş bozunmanın ve en az ağırlık kaybının 05A doku iskelesinde olduğu belirlendi bu durum 05A doku iskelesinin termal olarak daha dayanıklı olduğunu gösterdi.

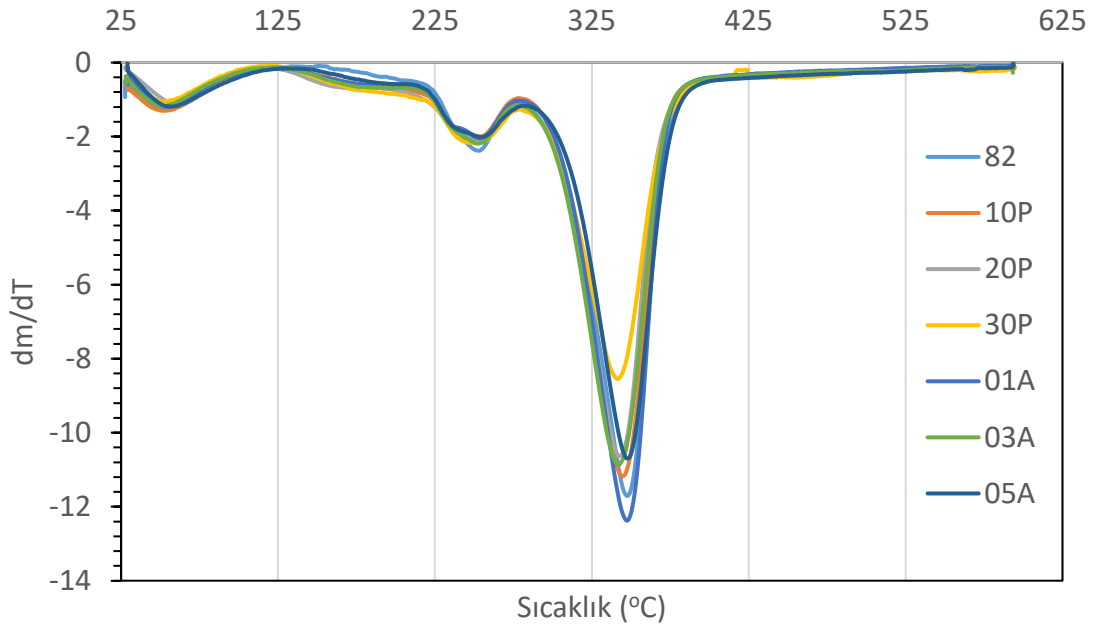


Şekil 4.8 AMX katkılı doku iskeleleri için DTA analizi

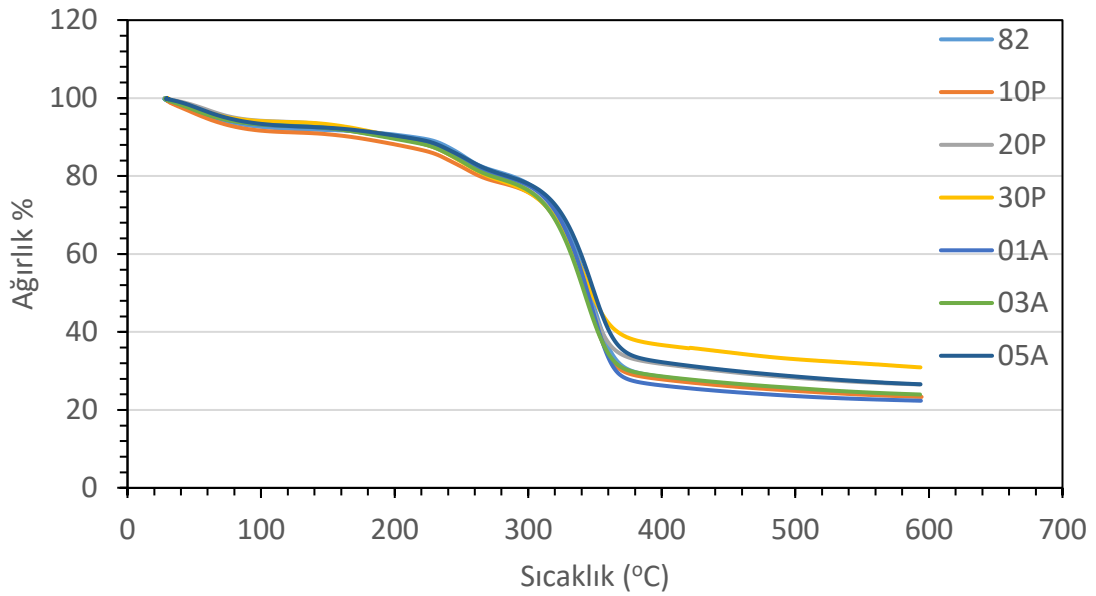


Şekil 4.9 Amoksisilin katkılı doku iskeleleri için TG analizi

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de tüm doku iskeleleri karşılaştırıldı ve en dayanıklı doku iskelesinin 30P en zayıf olanın ise 01A olduğu görüldü.



Şekil 4.10 Doku iskelelerinin DTA grafiği



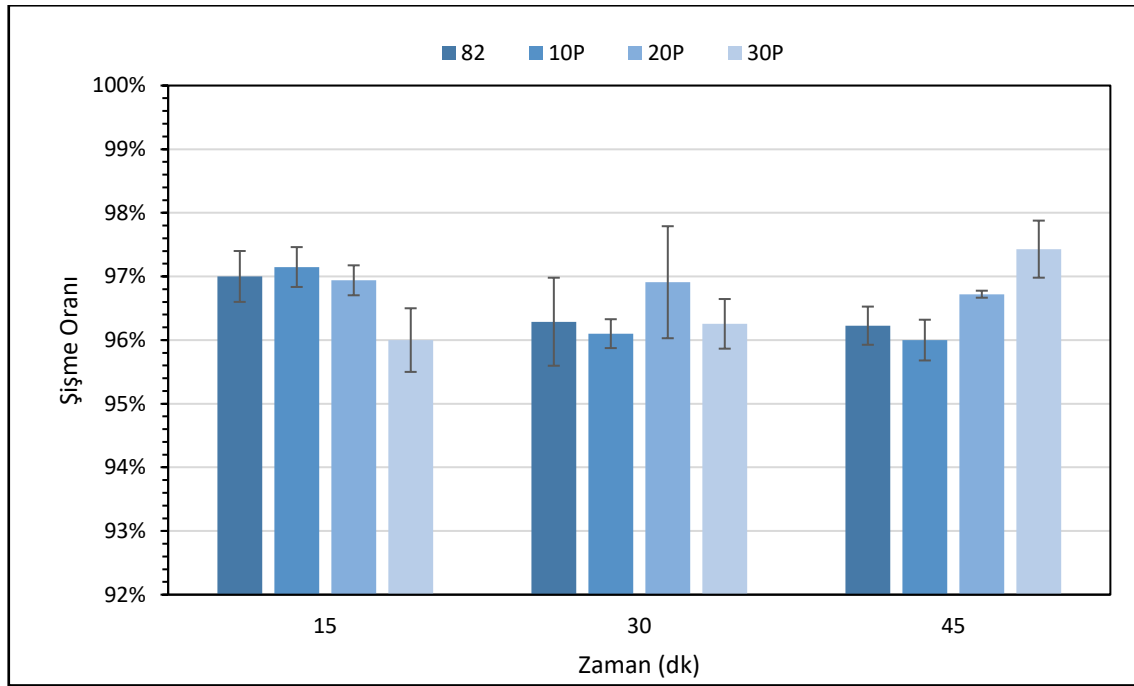
Şekil 4.11 Doku iskelelerinin TG grafiği

4.5 Doku İskelelerinin Şişme Testi Sonuçları

Şişme yeteneği, vücut sıvısının emilimi ve hücre besin ve metabolitlerinin transferi için önemlidir. Şişme gözenek boyutunu ve toplam gözenekliliği artırır. Daha yüksek derecede şişme gösteren numuneler daha büyük bir yüzey alanı/hacim oranına sahip olur. Böylece hücrelerin iskelesi yüzeyine daha iyi tutunarak

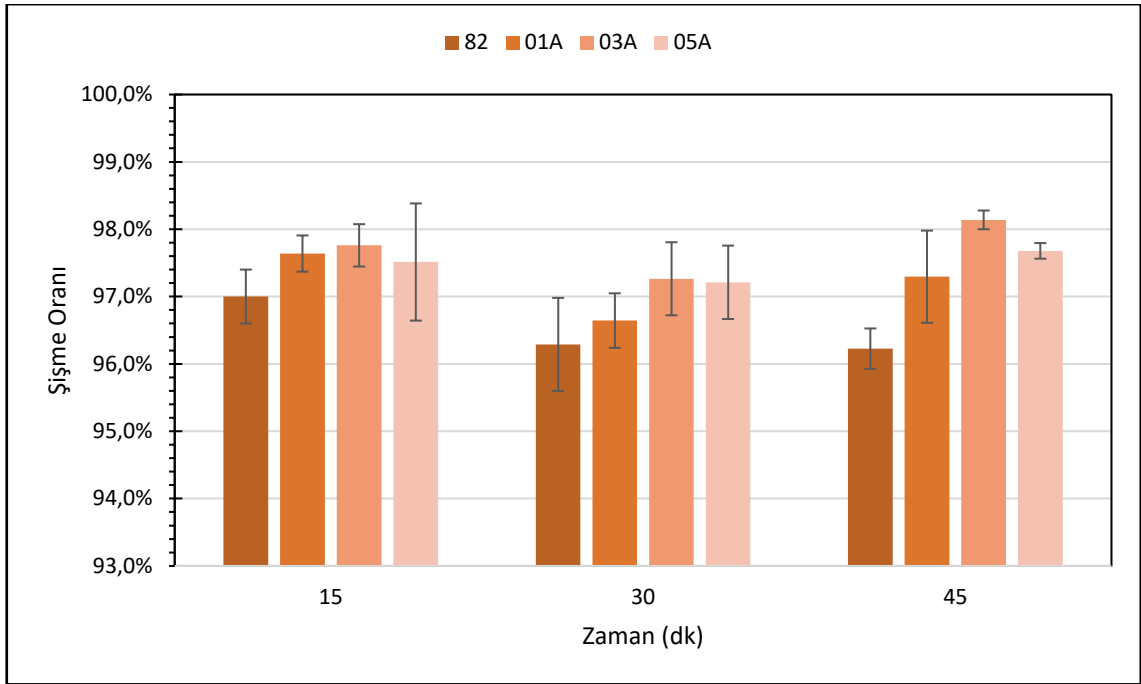
hücrelerin daha iyi büyümesini sağlar. Fakat yüksek şişme kabiliyeti iskelelerin mekanik özelliklerini ters yönde etkileyebilir [55].

Şekil 4.12’de ana matriks ve propolis katkılı iskelelerin % şişme oranları gösterildi. 20P doku iskelelerinin ilk 15 dk’da %96,8 oranında maksimum şişme kapasitesine ulaştığı görüldü. Bu süre 10P ve 30P doku iskeleleri için 45 dk olarak belirlendi. Doku iskelelerinin şişme oranları arasında büyük bir farklılık bulunmasa da %97 ile en iyi sonucu 30P doku iskelesi verdi [47],[48].

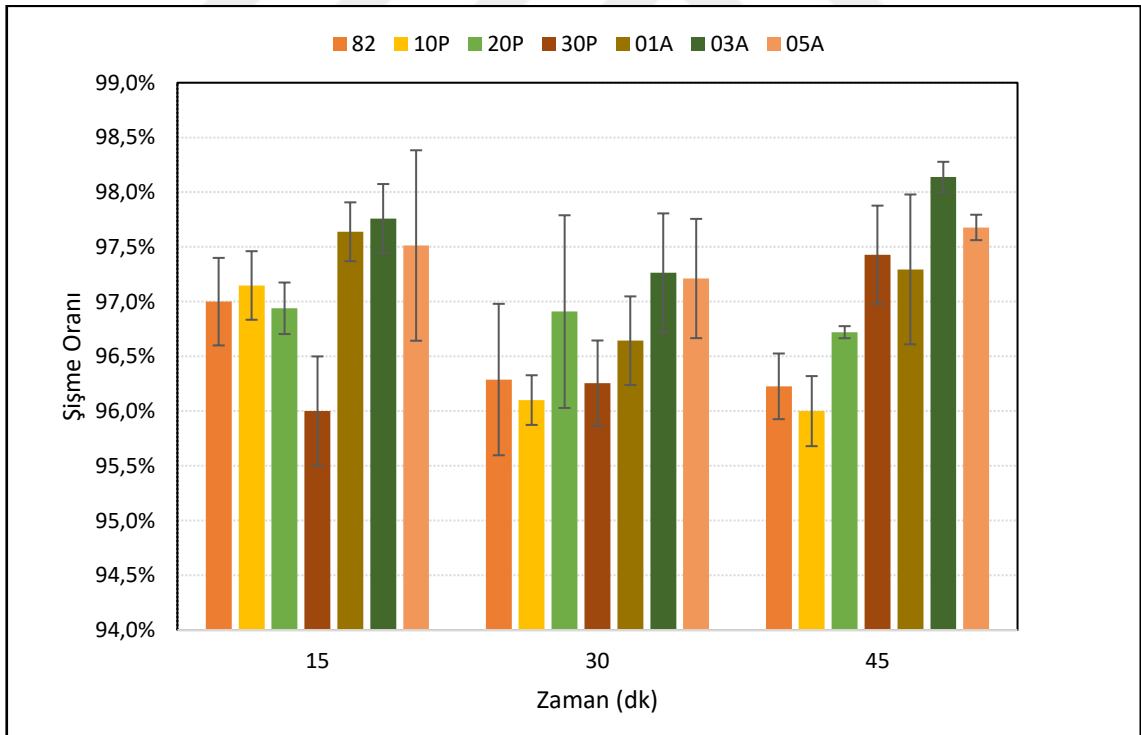


Şekil 4.12 Ana matriks ve propolis katkılı iskelelerin şişme oranlarının karşılaştırılması

Şekil 4.13’te ana matriks ve AMX katkılı doku iskelelerinin % şişme oranları gösterildi. Doku iskeleleri 45. dk’da maksimum şişme kapasitesine ulaştı. En iyi şişme performansını %98,14 ile 03A doku iskelesi gösterdi. Şekil 4.14’te ana matriks, AMX ve propolis katkılı doku iskelelerin % şişme oranları karşılaştırmalı olarak gösterildi. Doku iskelelerin %96-98 arasında şişme oranına sahip olduğu gözlemlendi. AMX molekülünün içeriğindeki bol miktardaki -OH grupları hidrojelere hidrofilik özellik kattığından dolayı AMX katkılı doku iskeleleri daha yüksek şişme performansı gösterdi [22].



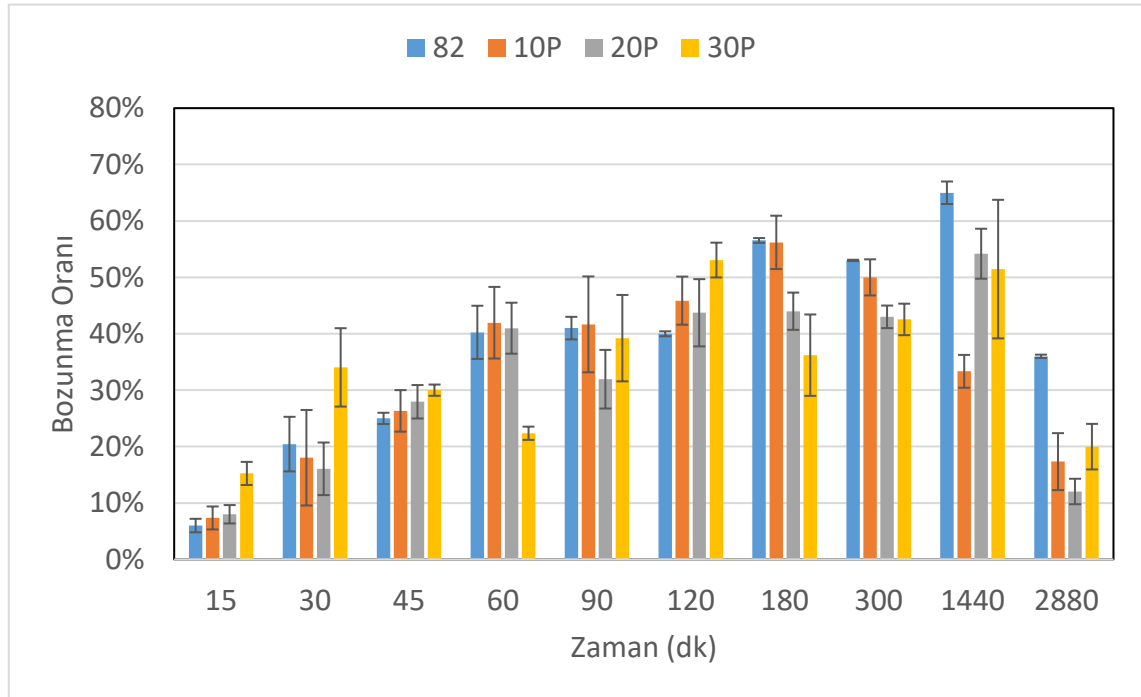
Şekil 4.13 Ana matriks katkılı iskelelerin şişme oranlarının karşılaştırılması



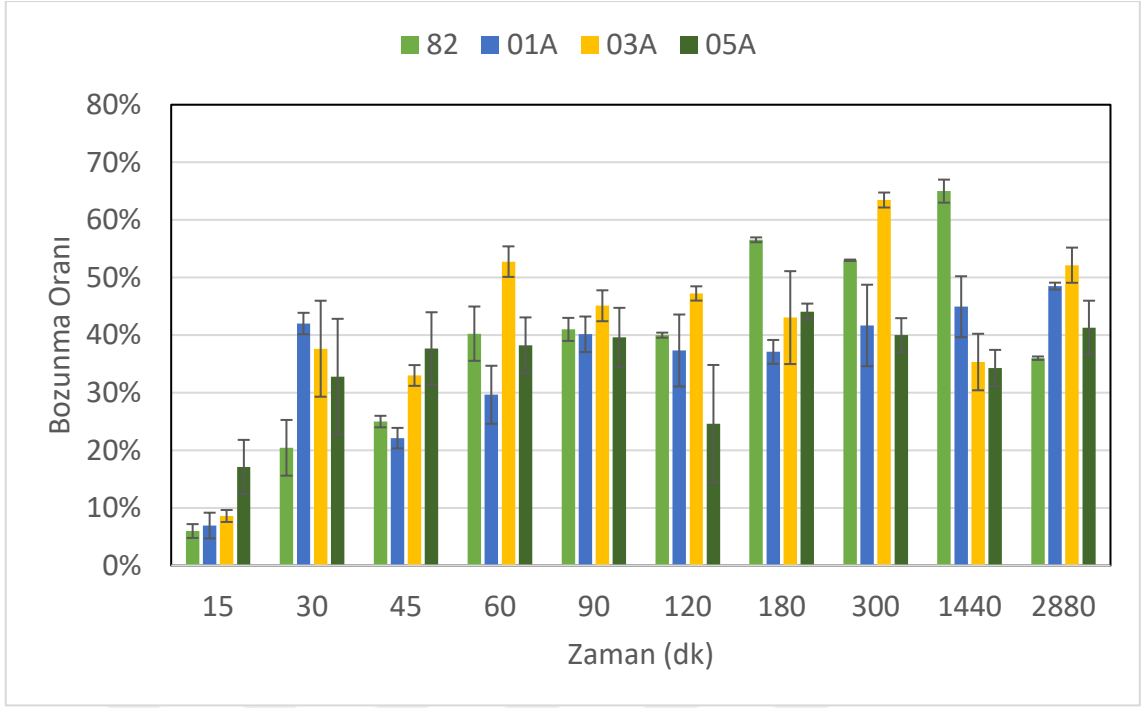
Şekil 4.14 Doku iskelelerinin şişme oranlarının karşılaştırılması

4.6 Doku İskelelerinin Biyobozunum Testi Sonuçları

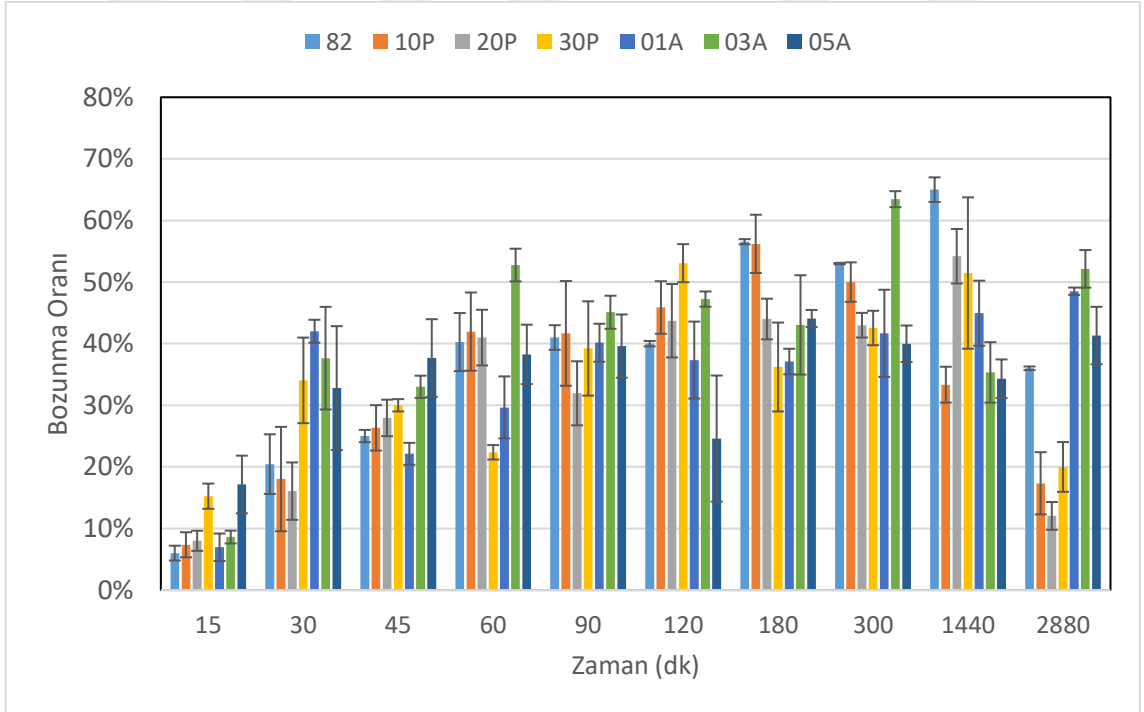
Doku iskelelerinin biyobozunma sonuçları Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verildi. 82, 10P, 20P, 30P, 01A, 03A ve 05A doku iskeleleri 2. Günün (2880 dk) sonunda sırasıyla %36, %17, %12, %20, %49, %52, %41 bozunma oranı gösterdi. Propolis içeriğinde çift bağ içeren moleküller bulunmaktadır[47]. Çift bağa sahip bu moleküllerin serbest radikal oluşturarak jel polimerleşmesine katıldığı düşünüldü [48]. Buna bağlı olarak da propolis katkılı doku iskelelerinin AMX katkılı doku iskelelerine göre daha yüksek dayanım ve daha yavaş biyobozunum gerçekleştirdiği sonucuna varıldı. AMX katkısı ana matriksin biyobozunurluğunu arttırdı. Bu durum AMX içindeki -OH gruplarının hidrofilikliği artırması ve buna bağlı olarak sıvı çekme kapasitesinin artarak iskelenin mekanik olarak zayıflanmasına sebep olması şeklinde yorumlandı [55]. Ayrıca 2. günün sonunda propolis katkılı doku iskelelerinin diğer günlere göre bozunma oranının düştüğü gözlemlendi. Bu durumun propolis maddesinin reçinemsi yapısından dolayı, bozulan iskele parçacıklarının kalan iskele üzerinde toplanmasından kaynaklandığı düşünüldü. PBS içinde bozulan iskele parçalarının tekrar iskele üzerinde birikmesi olarak yorumlandı.



Şekil 4.15 Ana matriks ve propolis katkılı iskelelerin bozunma oranlarının karşılaştırılması



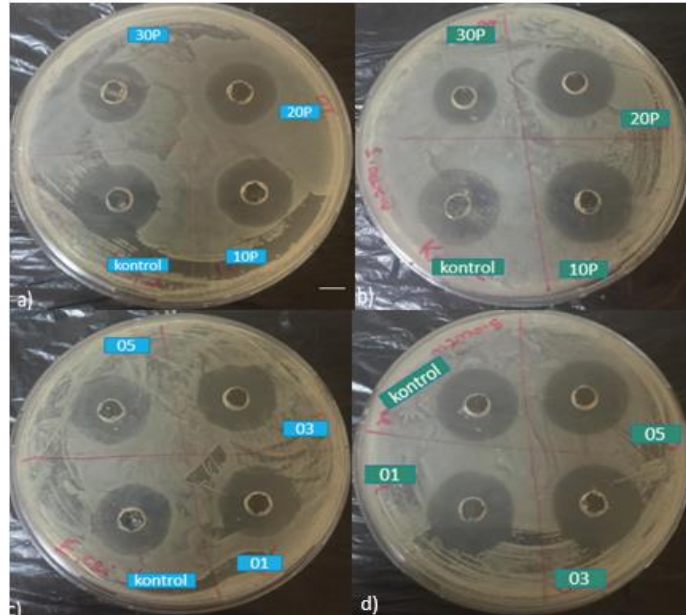
Şekil 4.16 Ana matriks ve amoksisilin katkılı iskelelerin bozunma oranlarının karşılaştırılması



Şekil 4.17 Doku iskelelerinin bozunma oranlarının karşılaştırılması

4.7 Doku İskelelerinin Bakteriyel Hassasiyet Testi Sonuçları

Bakteriyel hassasiyet için *S.aureus* ve *E.coli* olmak üzere 2 farklı bakteri suşu kullanıldı. Numunelerin inhibisyon çapı ölçüldü. İnhibisyon çapı ne kadar büyükse o kadar antibakteriyel özellik göstermektedir. Propolis ve AMX katkılı iskelelerin antibakteriyel özelliğe sahip olduğu görüldü. Ayrıca kontrol grubunun yani herhangi bir katkı maddesi içermeyen (82) doku iskelelerinin de inhibisyon çapı oluşturduğu gözlemlendi. Bu durum HA'nın antimikrobiyal özelliğinden kaynaklandığı belirtildi [56]. Ölçümler sonucunda propolis katkı miktarının arttırılmasının inhibisyon çapını küçülttüğü görüldü. Bu durum propolisin prebiyotik etkisine atfedildi[57]. Belirli konsantrasyona propolis sahip doku iskelelerinin prebiyotik özelliğinden dolayı bakteri gelişimini uyardığı düşünüldü. Yapılan ölçümlerde her iki bakteri suşunda da AMX katkılı iskelelerin propolis katkılı iskelelere oranla daha antibakteriyel olduğu gözlemlendi. Doku iskelelerinin katkılandırılmasında kullanılan her 3 AMX oranı (%0,1 , %0,3 , %0,5) her bir bakteri suşu için aynı inhibisyon çapını (*E.coli* için 22,5 mm *S.aureus* için 25 mm) dolayısıyla da aynı antibakteriyel etkiyi gösterdi. Tüm doku iskelelerinin *S.aureus* üzerinde daha etkili olduğu görüldü. Antibakteriyellik testine ait inhibisyon çapı görüntüleri Şekil 4.18'de, inhibisyon çapı ölçümleri de Tablo 4.2'de verildi.



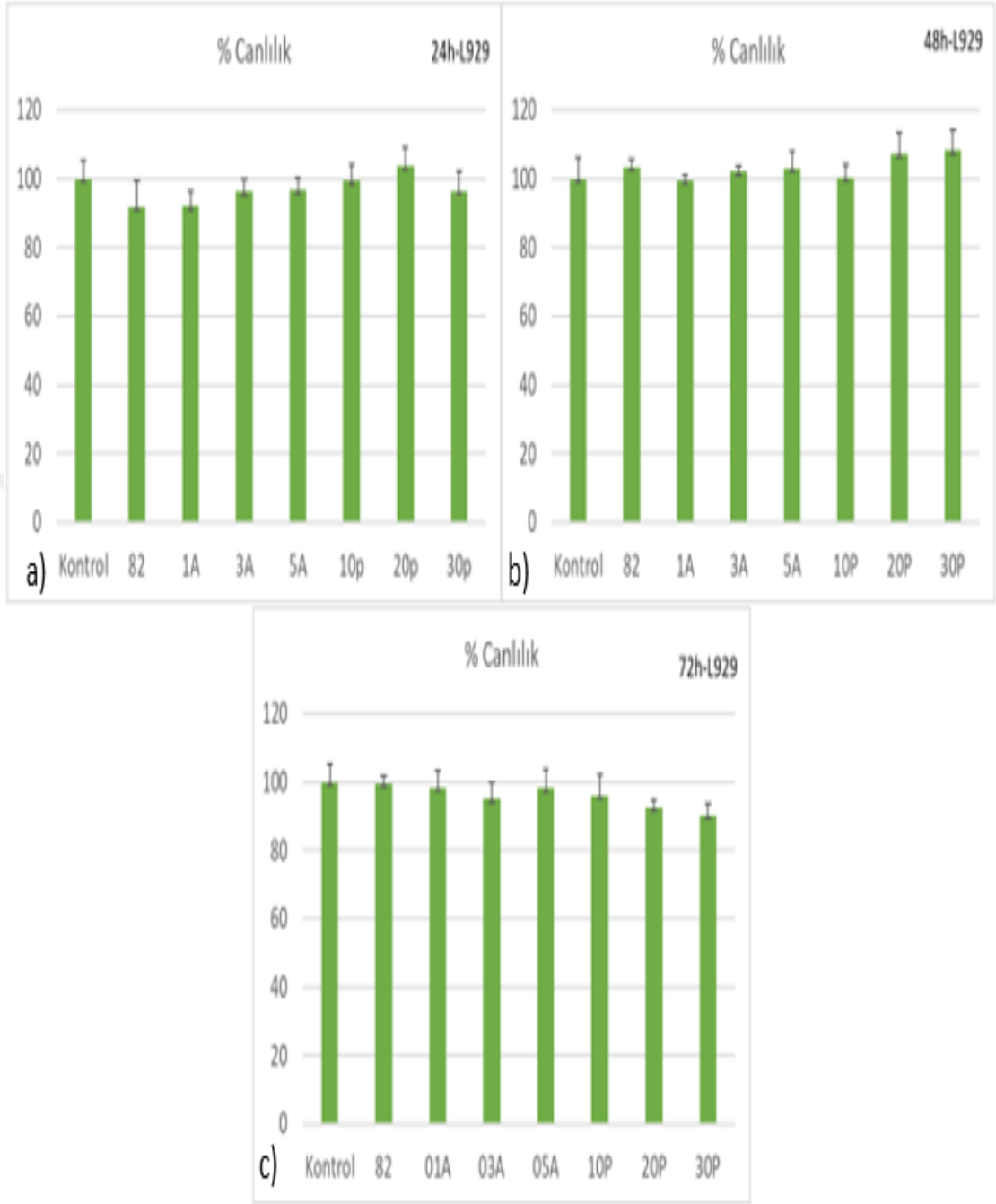
Şekil 4.18 Doku iskelelerinin antibakteriyel duyarlılık testleri a) *E. Coli* için propolis katkılı iskeleler b) *S.aureus* için propolis katkılı iskeleler c) *E. Coli* için amoksisilin katkılı iskeleler d) *S.aureus* için amoksisilin katkılı iskeleler

Tablo 4.2 Antibakteriyellik testi inhibisyon çapları

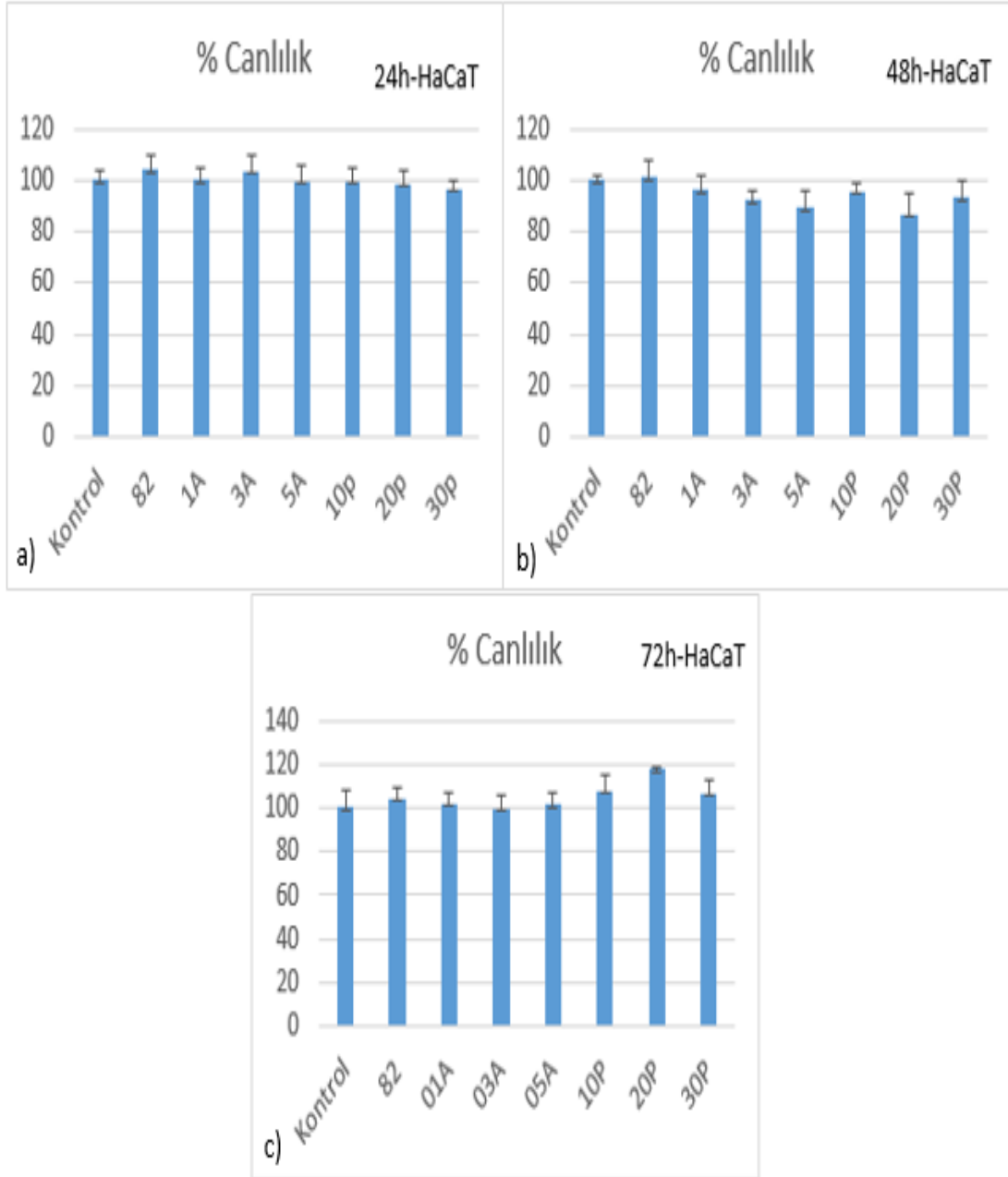
<i>E. coli</i> için inhibisyon apı			
Propolis katkılı doku iskeleleri		AMX katkılı doku iskeleleri	
Numune adı	çap (mm)	Numune adı	çap (mm)
Kontrol	22,5	Kontrol	22,5
10P	21,25	01A	22,5
20P	20	03A	22,5
30P	20	05A	22,5
<i>S. aureus</i> için inhibisyon apı			
Propolis katkılı doku iskeleleri		AMX katkılı doku iskeleleri	
Numune adı	çap (mm)	Numune adı	çap (mm)
Kontrol	22,5	Kontrol	22,5
10P	25	01A	25
20P	22,5	03A	25
30P	17,5	05A	25

4.8 Hücre Canlılığı Biyoyuymululuk Testi Sonuçları

L929 hücre hattı için canlılık sonuçları ekil 4.19’da, HaCaT hücre hattı içinse ekil 4.20’de verildi. Yapılan sitotoksisite testleri sonucunda doku iskelelerinin hücreler üzerinde toksik özellik göstermediği görüldü. L929 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda ilk 24 saat içerisinde ana matriks ve AMX katkılı doku iskeleleri hücre canlılığını kontrol grubuna göre yaklaşık %5-10 oranda azaltı. Fakat 48 ve 72 saatlik çalışmalarda bu doku iskelelerinin hücre canlılığını arttırdığı görüldü. 20P ve 30P doku iskeleleri 48 saatte hücre canlılığını yaklaşık %110 oranlarda gösterdi. 72. Saate gelindiğinde ise 20P ve 30P doku iskelelerinin hücre canlılığını %90 oranlara düşürdüğü gözlemlendi. 3 farklı zaman aralığındaki testlerde en stabil sonucu 10P ve 05A doku iskeleleri gösterdi. HaCaT hücreleri üzerinde yapılan çalışmada ise 24 saatte tüm doku iskeleleri yaklaşık olarak %100’e yakın hücre canlılığı gösterdi. 48 saatteki testlerde ise doku iskelelerindeki hücre canlılığı 24 saate göre düşüş gösterse de 72 saatte hücre canlılık oranları arttı. 72 saatteki en iyi sonuçları 10P ve 30P için yaklaşık %10 ve 20P için %20 oranında hücre arttımını ile propolis katkılı doku iskeleleri gösterdi.



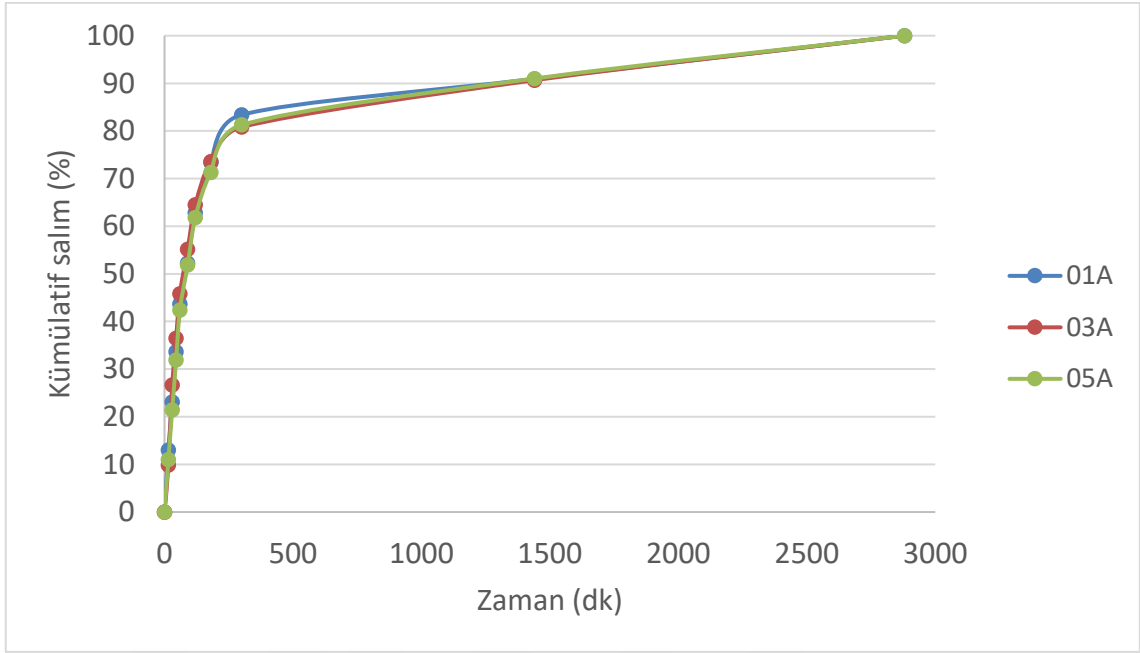
Şekil 4.19 Doku iskelelerinin L929 hücre hatları üzerindeki canlılık oranları a) 24 saatlik test b) 48 saatlik test c) 72 saatlik test



Şekil 4.20 Doku iskelelerinin HaCaT hücre hatları üzerindeki canlılık oranları a) 24 saatlik test b) 48 saatlik test c) 72 saatlik test

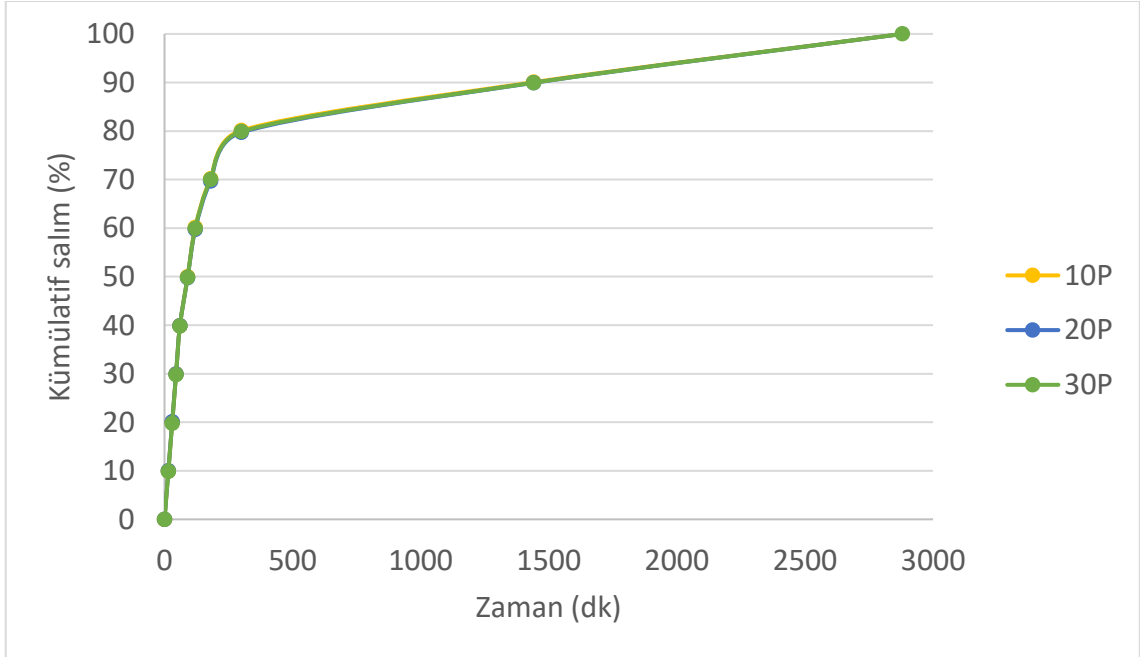
4.9 Propolis ve AMX'in Salınım Sonuçları

Kalibrasyon eğrilerinin regrasyon katsayısı (R^2) AMX için 0,9671, propolis için 1 olarak hesaplandı. Elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemine göre kümülatif salınım oranları hesaplandı. Şekil 4.21'de AMX içeren doku iskelelerinde 01A numunesinin daha hızlı salınım gerçekleştirdiği görüldü.

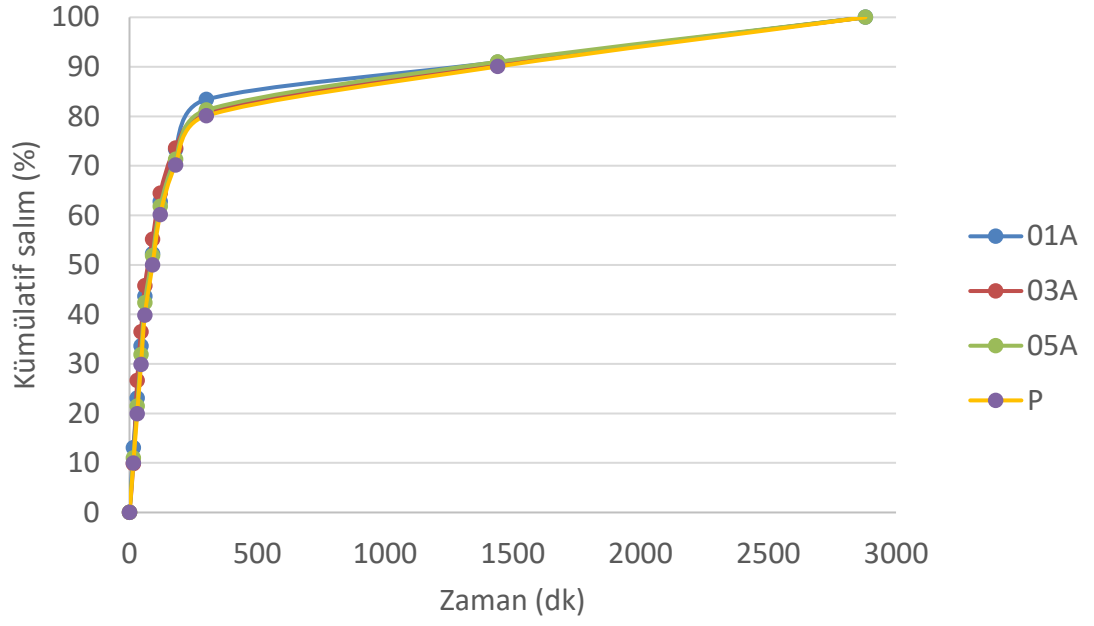


Şekil 4.21 AMX içeren doku iskelelerinin kümülatif salım oranlarının karşılaştırılması

Şekil4.22’de propolis içeren doku iskelelerine bakıldığında ise her 3 oranında aynı salım hızı sergilediği gözlemlendi.



Şekil 4.22 Propolis içeren doku iskelelerinin kümülatif salım oranlarının karşılaştırılması



Şekil 4.23 AMX ve propolisin kümülatif salınım oranının karşılaştırılması

Şekil 4.23'te tüm doku iskeleleri karşılaştırıldı ve AMX'in propolise göre daha hızlı salındığı belirlendi.

Bu tez çalışmasında cilt yanıklarında kullanılmak üzere doku iskelesi üretimi ve karakterizasyonları gerçekleştirildi. IPN sistemi ile geliştirilmiş hyalüronik asit-metil selüloz hidrojel­leri propolis ve AMX ile katkılandırıldı. Bu hidrojel­ler 3B biyoyazıcı sistemiyle basılarak doku iskeleleri elde edildi. Doku iskeleleri üzerinde çeşitli karakterizasyonlar (termal, kimyasal, morfolojik, antibakteriyellik, hücre canlılığı) yapıldı. Aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

- Katkı maddesi eklenmesi ana matriksin basım verimini düşürdü. Sırasıyla % 2,83 ve % 11,03 basım hata oranları ile 20P ve 01A kendi katkı türleri açısından en iyi sonucu verdi.
- Termal testlerde propolis oranının artması termal dayanımı arttırdı. 30P tüm numuneler içinde en iyi termal dayanıma sahipken, AMX katkılı iskeleler arasında en iyi sonucu 05A gösterdi.
- Şişme davranışları testlerinde AMX katkılı iskeleler propolis katkılı iskelelere göre daha iyi sonuç verdi. Tüm numuneler içinde yaklaşık %98,14 şişme oranı ile en iyi sonucu 03A gösterirken, propolisli iskeleler arasında ise %97 ile 30P en iyi şişme oranını gösterdi.
- Biyobozunurluk açısından 2 günün sonunda %17 ile 20P doku iskelesi en iyi dayanımı verirken, 03A doku iskelesi %52 oranı ile en hızlı bozulan doku iskelesi oldu.
- Antibakteriyellik testlerinde AMX katkılı iskelelerin propolis katkılı iskelelere göre daha yüksek inhibisyon çapı oluşturduğu gözlemlendi. İskelelerdeki AMX oranının arttırılmasının bakteri şuslarındaki inhibisyon çapını etkilemediği belirlendi. 10P numunesi propolisli doku iskeleleri arasında en antibakteriyel sonucu verdi.
- Hücre kültürü çalışmalarında 72 saatlik deneyde yaklaşık %120 hücre canlılığı oranı ile en iyi sonucu 20P numunesi verdi.
- AMX'in propolise göre daha hızlı salınım gerçekleştirdiği belirlendi.

IPN sistemi ile geliştirilip basılan HAMS hidrojel­leri doku iskelesi üretimi için umut vaad eden sonuçlar gösterdi. Her bir katkı türüne ayrı ayrı bakıldığında ise 20P ve 05A doku iskelelerinin daha iyi sonuç verdiği, ilerideki çalışmalarda bu kombinasyonlarla devam edilebileceğine karar verildi.



- [1] S. P. Tarassoli *et al.*, "Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field," *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.*, vol. 71, no. 5, pp. 615–623, 2018, doi: 10.1016/j.bjps.2017.12.006.
- [2] R. L. and J. P. Vacanti, "Tissue Engineering," *Science (80-.)*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993.
- [3] M. G. Jeschke, M. E. van Baar, M. A. Choudhry, K. K. Chung, N. S. Gibran, and S. Logsetty, "Burn injury," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 6, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41572-020-0145-5.
- [4] C. M. Hwang *et al.*, "Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering," *Biofabrication*, vol. 2, no. 3, 2010, doi: 10.1088/1758-5082/2/3/035003.
- [5] N. Law *et al.*, "Characterisation of hyaluronic acid methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 77, pp. 389–399, 2018, doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.09.031.
- [6] A. V. Do, B. Khorsand, S. M. Geary, and A. K. Salem, "3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 4, no. 12, pp. 1742–1762, 2015, doi: 10.1002/adhm.201500168.
- [7] M. Blais, R. Parenteau-Bareil, S. Cadau, and F. Berthod, "Concise Review: Tissue-Engineered Skin and Nerve Regeneration in Burn Treatment," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 2, no. 7, pp. 545–551, 2013, doi: 10.5966/sctm.2012-0181.
- [8] L. H. Evers, D. Bhavsar, and P. Mailänder, "The biology of burn injury," *Exp. Dermatol.*, vol. 19, no. 9, pp. 777–783, 2010, doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x.
- [9] P. Abdel-Sayed *et al.*, "Cell therapies for skin regeneration: An overview of 40 years of experience in burn units," *Swiss Med. Wkly.*, vol. 149, no. 19–20, pp. 1–7, 2019, doi: 10.4414/smw.2019.20079.
- [10] A. Manuscript, "3D printing of silver-doped polycaprolactone-poly propylene succinate composite scaffolds for skin tissue engineering," 2020.
- [11] E. Tanaka, "The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction," *Online*, vol. 13, no. 02, pp. 243–249, 2002, doi: 10.1016/S1084.
- [12] G. Chen, T. Ushida, and T. Tateishi, "Scaffold design for tissue engineering," *Macromol. Biosci.*, vol. 2, no. 2, pp. 67–77, 2002, doi: 10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F.
- [13] F.-S. Fattahi, "Nanoscience and nanotechnology in fabrication of scaffolds for tissue regeneration," *Int. Nano Lett.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–23, 2021, doi: 10.1007/s40089-020-00318-6.
- [14] T. Biswal, "Biopolymers for tissue engineering applications: A review," *Mater.*

- Today Proc.*, vol. 41, no. xxxx, pp. 397–402, 2019, doi: 10.1016/j.matpr.2020.09.628.
- [15] S. V. Murphy and A. Atala, “3D bioprinting of tissues and organs,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 773–785, 2014, doi: 10.1038/nbt.2958.
- [16] J. Joseph, K. Deshmukh, T. Tung, K. Chidambaram, and S. K. Khadheer Pasha, “3D Printing Technology of Polymer Composites and Hydrogels for Artificial Skin Tissue Implementations,” *Lect. Notes Bioeng.*, pp. 205–233, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-04741-2_7.
- [17] M. Shirzad, A. Zolfagharian, A. Matbouei, and M. Bodaghi, “Design, evaluation, and optimization of 3D printed truss scaffolds for bone tissue engineering,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 120, no. March, p. 104594, 2021, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104594.
- [18] P. S. Gungor-ozkerim *et al.*, “Bioinks for 3D bioprinting: an overview,” vol. 6, no. 5, pp. 915–946, 2019, doi: 10.1039/c7bm00765e.Bioinks.
- [19] L. L. Wang, C. B. Highley, Y. C. Yeh, J. H. Galarraga, S. Uman, and J. A. Burdick, “Three-dimensional extrusion bioprinting of single- and double-network hydrogels containing dynamic covalent crosslinks,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 106, no. 4, pp. 865–875, 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36323.
- [20] M. Aydoğdu, “3 Boyutlu Biyo Baskı Yöntemi İle Hidrojel Katkılı Doku İskeleti Üretimi,” Marmara University, 2018.
- [21] E. S. Bishop *et al.*, “3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends,” *Genes Dis.*, vol. 4, no. 4, pp. 185–195, 2017, doi: 10.1016/j.gendis.2017.10.002.
- [22] I. M. El-Sherbiny and M. H. Yacoub, “Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges,” *Glob. Cardiol. Sci. Pract.*, vol. 2013, no. 3, p. 38, 2013, doi: 10.5339/gcsp.2013.38.
- [23] D. Saraydin, S. Ünver-Saraydin, E. Karadağ, E. Koptagel, and O. Güven, “In vivo biocompatibility of radiation crosslinked acrylamide copolymers,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 217, no. 2, pp. 281–292, 2004, doi: 10.1016/j.nimb.2003.09.035.
- [24] J. Zhu, “Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds,” *Expert Rev.Med.Devices*, vol. 8, no. 5, pp. 607–626, 2011.
- [25] Y. Yang *et al.*, “Aggregation behaviors of thermo-responsive methylcellulose in water: A molecular dynamics simulation study,” *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 97, p. 107554, 2020, doi: 10.1016/j.jmgm.2020.107554.
- [26] L. Mayol, D. De Stefano, F. De Falco, R. Carnuccio, M. C. Maiuri, and G. De Rosa, “Effect of hyaluronic acid on the thermogelation and biocompatibility of its blends with methyl cellulose,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 112, pp. 480–485, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.020.
- [27] N. Contessi, L. Altomare, A. Filipponi, and S. Farè, “Thermo-responsive properties of methylcellulose hydrogels for cell sheet engineering,” *Mater. Lett.*, vol. 207, pp. 157–160, 2017, doi: 10.1016/j.matlet.2017.07.023.
- [28] B. Hassan, S. A. S. Chatha, A. I. Hussain, K. M. Zia, and N. Akhtar, “Recent

- advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, pp. 1095–1107, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097.
- [29] A. Tchobanian, H. Van Oosterwyck, and P. Fardim, "Polysaccharides for tissue engineering: Current landscape and future prospects," *Carbohydr. Polym.*, vol. 205, pp. 601–625, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.10.039.
- [30] D. Gupta, C. H. Tator, and M. S. Shoichet, "Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord," *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2370–2379, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.015.
- [31] Y. Wang, L.-Q. Cai, B. Nugraha, Y. Gao, and H. L. Leo, "Current Hydrogel Solutions for Repairing and Regeneration of Complex Tissues," *Curr. Med. Chem.*, vol. 21, no. 22, pp. 2480–2496, 2014, doi: 10.2174/0929867321666131212151855.
- [32] G. Sennakesavan, M. Mostakhdemin, L. K. Dkhar, A. Seyfoddin, and S. J. Fatihhi, "Acrylic acid/acrylamide based hydrogels and its properties - A review," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 180, p. 109308, 2020, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109308.
- [33] U. Farooq, J. Teuwen, and C. Dransfeld, "Toughening of epoxy systems with interpenetrating polymer network (IPN): A review," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 9, 2020, doi: 10.3390/POLYM12091908.
- [34] E. S. Dragan, "Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review," *Chem. Eng. J.*, vol. 243, pp. 572–590, 2014, doi: 10.1016/j.cej.2014.01.065.
- [35] T. R. Hoare and D. S. Kohane, "Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges," *Polymer (Guildf)*, vol. 49, no. 8, pp. 1993–2007, 2008, doi: 10.1016/j.polymer.2008.01.027.
- [36] T. M. Aminabhavi and S. P. Dharupaneedi, *Production of chitosan-based hydrogels for biomedical applications*, vol. 1. Elsevier, 2017.
- [37] P. Menter, "Acrylamide Polymerization—A Practical Approach," *Bio-Rad Tech Note*, p. 1156, 2000, [Online]. Available: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Acrylamide+Polymerization+?+A+Practical+Approach#0>.
- [38] D. Saraydin and H. N. Öztö, "Preparation of acrylamide-based hydrogels for invertase immobilization and comparison of the characteristics of immobilized invertases," *Res. Sci. art 21st century Turkey*, no. December, pp. 780–787, 2017.
- [39] S. I. Anjum *et al.*, "Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 26, no. 7, pp. 1695–1703, 2019, doi: 10.1016/j.sjbs.2018.08.013.
- [40] L. Šturm and N. P. Ulrih, "Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: A Review," *eFood*, vol. 1, no. 1, p. 24, 2019, doi: 10.2991/efood.k.191029.001.
- [41] I. Przybyłek and T. M. Karpiński, "Antibacterial properties of propolis,"

- Molecules*, vol. 24, no. 11, pp. 11–13, 2019, doi: 10.3390/molecules24112047.
- [42] N. M. E. Elsayyad, A. Salama, and S. H. Noshi, "Concurrent tissue engineering and infection prophylaxis utilising stable dual action amoxicillin loaded scaffolds," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 58, no. February, p. 101788, 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.101788.
- [43] L. H. Shen, H. N. Wang, P. J. Chen, C. X. Yu, Y. D. Liang, and C. X. Zhang, "The analytical determination and electrochemiluminescence behavior of amoxicillin," *J. Food Drug Anal.*, vol. 24, no. 1, pp. 199–205, 2016, doi: 10.1016/j.jfda.2015.09.002.
- [44] A. Aprodu, J. Mantaj, B. Raimi-Abraham, and D. Vllasaliu, "Evaluation of a methylcellulose and hyaluronic acid hydrogel as a vehicle for rectal delivery of biologics," *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 3, 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11030127.
- [45] CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard*. 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012, 2012.
- [46] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibensouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review," *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, 2016, doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [47] S. Huang, C. P. Zhang, K. Wang, G. Q. Li, and F. L. Hu, "Recent advances in the chemical composition of propolis," *Molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 19610–19632, 2014, doi: 10.3390/molecules191219610.
- [48] A. Shrivastava, *An Introduction to Polymer Engineering*. 2018.
- [49] R. L. Fischer, M. G. McCoy, and S. A. Grant, "Electrospinning collagen and hyaluronic acid nanofiber meshes," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 7, pp. 1645–1654, 2012, doi: 10.1007/s10856-012-4641-3.
- [50] R. L. Oliveira *et al.*, "Synthesis and characterization of methylcellulose produced from bacterial cellulose under heterogeneous condition," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 26, no. 9, pp. 1861–1870, 2015, doi: 10.5935/0103-5053.20150163.
- [51] P. Kumar, Y. E. Choonara, L. C. du Toit, G. Modi, D. Naidoo, and V. Pillay, "Novel high-viscosity polyacrylamidated chitosan for neural tissue engineering: Fabrication of anisotropic neurodurable scaffold via molecular disposition of persulfate-mediated polymer slicing and complexation," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 11, pp. 13966–13984, 2012, doi: 10.3390/ijms131113966.
- [52] A. Valanezhad *et al.*, "Preparation of a PLGA-coated porous bioactive glass scaffold with improved mechanical properties for bone tissue engineering approaches," *Regen. Eng. Transl. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 175–183, 2021, doi: 10.1007/s40883-021-00196-0.
- [53] K. M. Lopez *et al.*, "Hyaluronic Acid-Cellulose Composites as Patches for Minimizing Bacterial Infections," *ACS Omega*, vol. 5, no. 8, pp. 4125–4132, 2020, doi: 10.1021/acsomega.9b03852.
- [54] M. H. Yang, "Two-stages thermal degradation of polyacrylamide," *Polym. Test.*, vol. 17, no. 3, pp. 191–198, 1998, doi: 10.1016/S0142-9418(97)00036-6.

- [55] F. F. Azhar, A. Olad, and R. Salehi, "Fabrication and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite- polyaniline composite with potential application in tissue engineering scaffolds," *Des. Monomers Polym.*, vol. 17, no. 7, pp. 654–667, 2014, doi: 10.1080/15685551.2014.907621.
- [56] I. Radaeva, G. Kostina, S. Ilina, and R. Kostyleva, "[Antimicrobial activity of hyaluronic acid].," *Zhurnal Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol.*, vol. 1, pp. 74–75, 2001.
- [57] M. Miryan, P. Alavinejad, M. Abbaspour, D. Soleimani, and A. Ostadrahimi, "Does propolis affect the quality of life and complications in subjects with irritable bowel syndrome (diagnosed with Rome IV criteria)? A study protocol of the randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial," *Trials*, vol. 21, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1186/s13063-020-04615-5.



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. P. Tokat, H. M. Günaydın, Y. Yilmazer, O. Gündüz, H. Sadıkoğlu ve H. Yilmazer, “Development of tissue scaffolds through 3D bioprinting for burn wound healing,” 5th International Congress on 3D Printing (Additive Manufacturing) Technologies and Digital Industry, Antalya, Türkiye, 2021.

