

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN YENİ
BİR HİDROJEL SİSTEMİN ÜRETİMİ: CHİA TOHUMU
MÜSİLAJININ MİKRODALGA DESTEKLİ
METAKRİLASYONU**

**Hazırlayan
Saime Nur KARASU**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Nuri ERTAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2023
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN YENİ
BİR HİDROJEL SİSTEMİN ÜRETİMİ: CHİA TOHUMU
MÜSİLAJININ MİKRODALGA DESTEKLİ
METAKRİLASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Saime Nur KARASU**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Nuri ERTAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından FYL-2022-11802 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2023
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

İsim Soyisim: Saim Nur KARASU

İmza

“Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Yeni Bir Hidrojel Sistemin Üretimi: Chia Tohumu Müsilajının Mikrodalga Destekli Metakrilasyonu” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Saime Nur KARASU

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Nuri ERTAŞ

Biyomedikal Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Mahmut TOKMAKÇI

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi hususlarında destek ve yardımlarını esirgemeyen, deneyim ve bilgilerine başvurduğum değerli danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Nuri ERTAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ'a ve laboratuvar imkanlarından faydalanma fırsatını sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Sevil Dinçer İŞOĞLU'na;

FYL-2022-11802 kodlu proje ile tez çalışmamı destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, 2232 Uluslararası Lider Araştırmacılar Programı kapsamında 118C346 numaralı proje ve 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklerini sağlayan TÜBİTAK'a;

Desteklerini her daim arkamda hissettiğim kıymetli dostlarım Nimet TEMÜR'e, Merve KAYA'ya, Mostafa AWAD'e, Yüstra GÜLCÜ'ye, Canan ATMACA ÖZKUL'a, Elmas Seda KIRAÇLAR'a;

Son olarak elimden tuttuğu ilk andan itibaren bir kez bile bırakmayan, sevgi ve ilgisini üzerimden hiç eksik etmeyen, bugünlere gelebilmemdeki en büyük destekçim annem Fatma KARASU'ya, babam İbrahim KARASU'ya, gurur kaynaklarım kardeşlerim Beyza KARASU ve Dilara Naz KARASU'ya en derin duygularla teşekkür ederim.

Saime Nur KARASU

Ocak 2023, KAYSERİ

DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN YENİ BİR HİDROJEL SİSTEMİN ÜRETİMİ: CHİA TOHUMU MÜSİLAJININ MİKRODALGA DESTEKLİ METAKRİLASYONU

Saime Nur KARASU

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2023**

**Danışmanlar: Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Nuri ERTAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ**

ÖZET

Günümüzde doku mühendisliği çalışmalarında dokuların rejenerasyonunu sağlamak, için doğal ve sentetik biyomalzemeler kullanılmaktadır. 3 boyutlu (3B) biyobaskı sistemlerinde hücre, büyüme faktörü gibi biyoaktif bileşenler ile karıştırılması sonucu biyomürekkep olarak da kullanılabilen biyomalzemelerin doku rejenerasyonunu sağlaması için ekstrasellüler matriks (ECM) yapısını ve fonksiyonlarını taklit etmesi kritik öneme sahiptir. ECM yapısı ile benzerlik gösteren biyomalzemeler, hücre yapışma ve çoğalmasını destekler, ECM oluşumunu artırarak doku rejenerasyonunu sağlar. Aynı zamanda biyomalzemelerin yeterli mekanik dayanıma ve 3B biyobaskı sistemleri için basılabilir özelliğe sahip olması gereklidir. Ancak bu özelliklerin yeterli seviyede sağlanamamasından dolayı doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin sayısı sınırlıdır ve doku rejenerasyonunu sağlayacak yeni biyomalzemelerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı, 3B biyobaskı sistemlerde kullanılan biyomalzeme açığını gidermek üzere chia tohumu müsilajının mikrodalga destekli metakrilasyonu sağlanarak yeni bir hidrojel olan chiaMA sentezi gerçekleştirmektir. Chia tohumları su ile temas ettiği zaman müsilaj salınımı gerçekleştirir ve ECM yapısı ile birçok benzer özelliğe sahiptir. Çalışmada chia müsilajına ait karboksil grupları ve hidroksil grupları, EDC-NHS kimyası kullanılması ve hem konvansiyonel, hem de farklı kuvvetlerde mikrodalga enerjisi uygulanması sonucu 2-aminoetil metakrilat hidroklorürde (AEMA) bulunan amin gruplarına bağlanarak metakrilatlanması sağlanmıştır. Ardından foto-çapraz bağlanan chiaMA hidrojellerinin yapısal ve morfolojik karakterizasyonu sağlanmış, reoloji ve viskozite analizleri gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyobaskı, Biyomalzeme, Biyomürekkep, Chia Tohumu Müsilajı, Doku Mühendisliği

**DEVELOPMENT OF A NOVEL HYDROGEL SYSTEM FOR TISSUE
ENGINEERING APPLICATIONS: MICROWAVE ASSISTED
METHACRYLATION OF CHIA SEED MUCILAGE**

Saime Nur KARASU

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M. Sc. Thesis, January 2023

Supervisors: Asst. Prof. Yavuz Nuri ERTAŞ

Asst. Prof. Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ

ABSTRACT

In tissue engineering, synthetic and natural biomaterials have been used to repair and regenerate human tissues. In designing biomaterials, which can also be used as bioink by mixing with cells and bioactive compounds such as growth factors in 3D bioprinting systems, mimicking the structure and functions of the extracellular matrix (ECM) is critical for tissue regeneration. Biomaterials that have similar properties to the ECM can promote cell attachment and proliferation and, therefore, regenerate the tissue by increasing ECM growth. Also, biomaterials should have sufficient mechanical strength, so they can support newly developing tissues. In addition, they should be printable for 3D bioprinting systems. However, biomaterials in tissue engineering are limited due to a lack of necessary properties. Therefore, new biomaterials that will improve tissue regeneration are required. This study aims to synthesize chiaMA hydrogel to overcome some of the limitations of tissue engineering. Once chia seeds get in contact with water, they start to generate mucilage. Fiber-structured chia seed mucilage has similar properties to ECM with rich amino acid, fatty acid, and polysaccharide components. In brief, chia seed mucilage was microwave methacrylated using EDC-NHS chemistry by applying different microwave powers to the carboxyl and hydroxyl groups of chia seed mucilage and the amine groups of 2-aminoethyl methacrylate hydrochloride (AEMA). The chiaMA hydrogel was obtained by photocrosslinking, and then the chiaMA hydrogel was structurally and morphologically characterized. Moreover, rheological and viscosity analyses were performed.

Keywords: Bioink, Biomaterial, Bioprinting, Chia Seed Mucilage, Tissue Engineering

İÇİNDEKİLER

DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN YENİ BİR HİDROJEL SİSTEMİN ÜRETİMİ: CHİA TOHUMU MÜSİLAJININ MİKRODALGA DESTEKLİ METAKRİLASYONU

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.4. Doku Mühendisliği	3
1.5. 3B Biyobaskı Teknolojisi	4
1.5.1. Ekstrüzyon Biyoyazıcılar	5
1.5.2. İnkjet Biyoyazıcılar	6
1.5.3. Lazer Destekli Biyoyazıcılar	7
1.6. Biyomürekkepler (Biyoinkler)	8
1.6.1. Hidrojeller	8
1.6.1.1. Hidrojellerin Özellikleri	10
1.6.1.1.1. Biyobenzetim	10
1.6.1.1.2. Biyoyumluluk	11
1.6.1.1.3. Biyobozunurluk	12
1.6.1.1.4. Mekanik Özellikler	12
1.6.1.1.5. Şişme Kapasitesi	13

1.6.1.1.6. 3B Biyoyazıcılarda Basılabilirlik	14
1.6.1.1.7. Çapraz Bağlanabilirlik	15
1.6.1.2. 3B Biyoyazıcılarda Kullanılan Hidrojeller	16
1.6.1.3. Foto-Çapraz Bağlanabilir Hidrojeller	19
1.6.1.3.1. Metakrilasyon	20
1.6.1.3.2. EDC-NHS Kimyası	22
1.6.1.3.2.1. Konvansiyonel Metakrilasyon	23
1.6.1.3.2.2. Mikrodalga Destekli Metakrilasyon	24
1.6.1.3.2.3. Metakrilatlanmış Hidrojeller	26
1.6.1.3.2.3.1. Metakrilatlanmış Jelatin	27
1.6.1.3.2.3.2. Metakrilatlanmış Aljinat	28
1.6.1.3.2.3.3. Metakrilatlanmış Hyaluronik Asit ...	31
1.6.1.3.2.3.4. Metakrilatlanmış Selüloz	32
1.6.1.3.2.3.5. Metakrilatlanmış Kitosan	32
1.6.1.3.2.3.6. Metakrilatlanmış Karajenan	34
1.7. ChiaTohumu Müsilajı	35

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Malzemeler	40
2.2. Yöntem	41
2.2.1. Chia Tohumu Müsilajının Üretilmesi	41
2.2.2. Chia Tohumu Müsilajının Metakrilatlanması	43
2.2.3. ChiaMA Hidrojelinin Elde Edilmesi	45
2.2.4. ChiaMA Hidrojelinin Karakterizasyonu	46
2.2.4.1. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) Analizi	46
2.2.4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi ...	47
2.2.4.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)	47
2.2.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	47
2.2.4.5. X-Işını Difraktometresi (XRD)	47
2.2.4.6. Reoloji Analizi	47
2.2.4.7. Viskozite Analizi	48

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. ChiaMA Hidrojelinin Çapraz Bağlanma Bulguları	49
3.2. ChiaMA Hidrojelinin Karakterizasyonu	52
3.2.1. NMR Analizi Bulguları.....	52
3.2.2. FTIR Analizi Bulguları.....	54
3.2.3. TGA Bulguları.....	55
3.2.4. SEM Analizi Bulguları.....	57
3.2.5. XRD Analizi Bulguları.....	61
3.2.6. Reoloji Analizi Bulguları.....	62
3.2.7. Viskozite Analizi Bulguları	67

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma	70
4.2.Sonuç ve Öneriler	72
KAYNAKÇA	75
ÖZGEÇMİŞ.....	82

KISALTMALAR

2B	: 2 Boyutlu
3B	: 3 Boyutlu
AEMA	: 2-aminoetil metakrilat hidroklorid
ALMA	: Metakrilatlanmış alljinat
CAD	: Bilgisayar destekli tasarım
CHI-MA	: Metakrilatlanmış kitosan
ChiaMA	: Metakrilatlanmış chia müsilajı
CMC	: Karboksimetil selüloz
DTG	: Diferansiyel termal termogravimetrik
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EDC	: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etil karbodiimid hidroklorür
FDA	: Gıda ve ilaç dairesi
Jel-MA	: Metakrilatlanmış jelatin
LAP	: Lityum fenil-2,4,6-trimetilbenzoil fosfinat
MeHA	: Metakrilatlanmış hyaluronik asit
MR	: Manyetik rezonans
NHS	: N-hidroksi süksinimit
PCL	: Polikaprolakton
PEG	: Polietilen glikol
PGA	: Poliglikolik asit
PLA	: Polilaktik asit
STL	: Stereolitografi
TGA	: Termogravimetrik analiz
κ-Car	: Kappa karajenan
κ-Car-MA	: Metakrilatlanmış kappa karajenan

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. 3B biyobaskı tekniklerinin özellik karşılaştırılması.....	7
Tablo 1.2. Metakrilatlanmış hidrojel.....	26
Tablo 1.3. Chia tohumlarının amino asit içeriği.....	37
Tablo 2.1. Konvansiyonel ve mikrodalga sentezli metakrilasyon tekniklerinin parametreleri.....	45
Tablo 3.1. 3 farklı konsantrasyonda LAP fotobaşlatıcı kullanılarak hazırlanan %2.5 chiaMA hidrojel.....	50
Tablo 3.2. 3 farklı konsantrasyonda LAP fotobaşlatıcı kullanılarak hazırlanan %5 chiaMA hidrojel.....	51
Tablo 3.3. Frekans bağımlı dinamik analize göre 200 rad/s frekansında %2.5 chiaMA hidrojel.....	66
Tablo 3.4. Frekans bağımlı dinamik analize göre 200 rad/s frekansında %5 chiaMA hidrojel.....	66
Tablo 3.5. %2.5 konsantrasyonda hazırlanan chia müsilajı ve chiaMA çözeltilerin 25 °C ve 37 °C'deki viskozite değerleri.....	69
Tablo 3.6. %5 konsantrasyonda hazırlanan chia müsilajı ve chiaMA çözeltilerin 25 °C ve 37 °C'deki viskozite değerleri.....	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. 3B biyoyazıcı teknolojileri.....	5
Şekil 1.2. Sentetik ve doğal polimer hidrojel örnekleri.....	9
Şekil 1.3. Polimerlerin metakrilatlanma işlemi.....	21
Şekil 1.4. EDC-NHS kimyası mekanizması.....	23
Şekil 1.5. Mikrodalga enerjisi ve konvansiyonel yolla ısıtılan sistemlerin sıcaklık profilleri.....	24
Şekil 1.6. Konvansiyonel ısıtma ve mikrodalga ısıtma ısı transfer yönü.....	25
Şekil 1.7. Jel-MA'nın mikrodalga destekli metakrilasyon yöntemi ile sentezlenmesi....	28
Şekil 1.8. Farklı metodlar ile ALMA sentezi.....	30
Şekil 1.9. CHI-MA'nın mikrodalga destekli metakrilasyon yöntemi ile sentezlenmesi...	34
Şekil 1.10. Chia tohumları.....	36
Şekil 1.11. Chia tohumlarından elde edilen yağ asitlerinin kimyasal yapıları.....	37
Şekil 1.12. Chia müsilajı.....	38
Şekil 1.13. Chia müsilajının kimyasal yapısı.....	39
Şekil 2.1. Chia tohum/müsilaj karışımı ve chia müsilajının tohumlardan vakum uygulanarak ayrılması.....	41
Şekil 2.2. Chia müsilajının santrifüj ile istenmeyen partiküllerden arındırılması.....	42
Şekil 2.3. Chia müsilajının partiküllerden arındırılmış hali ve kurutulması.....	42
Şekil 2.4. ChiaMA hidrojelinin elde ediliş adımları.....	46
Şekil 3.1. Chia müsilajı ve chiaMA grupları proton NMR analizi	53
Şekil 3.2. Chia müsilajı ve chiaMA gruplarına ait FTIR analizi.....	54

Şekil 3.3. Chia müsilajı ve chiaMA gruplarının termal davranış grafikleri.....	56
Şekil 3.4. Chia müsilajı ve konvansiyonel chiaMA hidrojellerine ait kesit ve yüzey SEM görüntüleri.....	58
Şekil 3.5. Mikrodalga destekli metakrilasyon ile sentezlenmiş 100 W, 250 W, 500 W chiaMA hidrojellerine ait kesit ve yüzey SEM görüntüleri.....	59
Şekil 3.6. Mikrodalga destekli metakrilasyon ile sentezlenmiş 100 W, 250 W, 500 W chiaMA hidrojellerine ait kesit ve yüzey SEM görüntüleri.....	60
Şekil 3.7. Chia müsilajı ve chiaMA gruplarına ait XRD grafiği.....	62
Şekil 3.8. %2.5 chiaMA kullanılarak hazırlanan hidrojellerin reolojik analiz sonuçları..	64
Şekil 3.9. %5 chiaMA kullanılarak hazırlanan hidrojellerin reolojik analiz sonuçları....	65
Şekil 3.10. Chia müsilajı ve chiaMA hidrojellerinin çapraz bağlanma öncesi viskozite değerleri.....	68

GİRİŞ

Çeşitli yaralanmalar, kazalar, hastalıklar ve genetik anormallikler sonucu hastalar doku kaybı, organ yetmezliği gibi durumlar ile karşı karşıya kalabilmektedir. Gerekli organa veya dokuya ulaşılamaması sonucu bu problemler ciddi boyutlara ulaşmakta, kimi zaman ölümle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle doku rejenerasyonu ve organ nakli için çeşitli tedavi yolları aranmaktadır. Doku mühendisliği uygulamaları ile doku onarımı ve rejenerasyonu hedeflenmektedir. Doku mühendisliği uygulamalarından biri olan 3B biyobaskı teknolojisi sayesinde uzun vadeli, sürdürülebilir çözümler üretilerek yapay doku ve organ basılması, gerçek doku ve organlara olan ihtiyacın ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır [1].

3B biyobaskı teknolojisinde, ekstrüzyon, injket ve lazer destekli başta olmak üzere çeşitli 3B biyoyazıcılar kullanılmaktadır. 3B biyobaskı işlemi, biyomürekkeplerin bilgisayar destekli tasarım programlarında hazırlanan 3B modellere göre basılması ile sağlanır. Doğal veya sentetik polimerlerin hücre, büyüme faktörü gibi biyoaktif bileşikler ile karıştırılması sonucu biyomürekkepler elde edilir. Biyomürekkeplerde kullanılan doğal ve sentetik polimerler çeşitli özellikler sergileyerek doku ve organ rejenerasyonunda aktif rol oynamaktadır.

Doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla yer verilen 3B polimerik bir ağ yapısına sahip olan hidrojeller, 3B biyobaskı sistemlerinde biyoaktif malzemelerle birlikte biyomürekkep olarak da kullanılmaktadır. Hidrojellerin 3B baskılanabilmesi ve vücut içerisine implante edilebilmesi için biyobenzetim, biyoyumluluk, biyobozunurluk, basılabilirlik, çapraz bağlanabilirlik, sıvıyı içine hapsederek şişme ve güçlü mekanik yapı gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir. Böylelikle 3B biyobaskı teknolojisi ile hidrojel kullanılarak basılan yapılar hem hücre tutunması, çoğalması, farklılaşması ile doku rejenerasyonunu sağlayacak, hem de dokuya mekanik dayanım sağlayacaktır. Ancak günümüzde kullanılmakta olan hidrojellerin mekanik olarak zayıf özelliklere sahip

olması, ECM yapısı ile benzer özellikler taşınamaması gibi durumlar nedeni ile hücrelerle birlikte kullanımı sınırlıdır.

Tez çalışmasının amacı, doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere chia tohumu müsilağının metakrilasyonu ile yeni bir hidrojel sistemin geliştirilmesidir. Chia tohumu, amino asitler, yağ asitleri, çeşitli vitaminler ve mineralleri barındıran oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Chia tohumları su ile teması geçtiğinde etrafına jelimsi bir yapı olan müsilağ salgılaması gerçekleştirir. Müsilağ aslında polisakkaritlerden oluşan lifli bir yapıdır. Doku mühendisliği uygulamalarında çeşitli kaynaklardan elde edilen doğal polisakkaritler yüksek biyouyumlulukları ve biyobozunma kinetiği ile ayrıca düşük maliyetli olmaları sebebiyle tercih edilen malzemelerdir. Bu tez çalışması ise konvansiyonel ve mikrodalga enerjisi kullanılarak metakrilatlanmış chia müsilağı sentezi ile ECM yapısını taklit edebilen, doku rejenerasyonunu destekleyen, foto-çapraz bağlanabilen bir hidrojel sistemin elde edilmesini içermektedir. Ayrıca tez çalışmasının konusu metakrilatlanmış chia müsilağının eldesi ile çeşitli karakterizasyon teknikleri kullanılarak yapısal ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesini, reolojik ve viskozite özelliklerinin araştırılmasını içermektedir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.4 Doku Mühendisliği

Hastalıklar, yaralanmalar, travmalar, ilerleyen yaş ve genetik kusurlar insan vücudundaki doku ve organlarda hasarlara ve dejenerasyona neden olabilmektedir [2]. Zarar görmüş olan dokuların rejenerasyon sağlanarak eski sağlığına kavuşması gerekmektedir, insan vücudu küçük yaralanmalarda dokuları yeniden şekillendirme ve yenilenmesini mükemmel şekilde sağlayabilmektedir. Ancak doğuştan gelen veya sonradan kaynaklanan ciddi doku hasarlarında sınırlı kapasiteye sahip vücudun kendini iyileştirme mekanizması yetersiz kalmaktadır [3]. Bu nedenle doku mühendisliği, hasarlı doku ve organları yenilemek, desteklemek, rejenerasyonunu sağlamak veya vücudun kendini iyileştirme kapasitesini aktive ederek yeni biyofonksiyonel dokuların geliştirilmesini amaçlamaktadır [4, 5].

Doku rejenerasyonu için tipik olarak otogreft, allogreft ve ksenogreft teknikleri kullanılmaktadır. Bir bireyden alınan dokunun aynı bireyde farklı bir yere nakledilmesi tekniği olan otogreft altın standart olarak görülsede avantajlarının yanında çeşitli dezavantajlara da sahiptir. Otogreftler mekanik kuvvete sahip olmasının yanı sıra hücre çoğalması ve yeni doku büyümesini destekler. Hasta tarafından reddedilme ve hastalık bulaşma durumu yoktur [6]. Ancak bu teknik pahalı, alınabilecek greft miktarı sınırlı ve hastalar için acı verici olabilmektedir. Ayrıca greft alınması için operasyon gerekmesinin yanı sıra greft alınan bölgede hematoma ve enfeksiyon (donor site morbidity) riski bulunmaktadır [2, 6]. Farklı bireyler arasında doku nakletme tekniği olan allogreftler, otogreftler gibi mekanik dayanıma sahiptir, hücre çoğalması ve doku büyümesini destekler. Allogreftler farklı bireylerden temin edildikleri için kaynakları sınırlı değildir ancak bu durum hastalıkların taşınmasına, bakteriyel enfeksiyonlara ve greft nakledilen

bireyde immünojenik reaksiyonlara sebebiyet verebilir [2, 6]. Sterilize edilmeleri halinde ise mekanik özelliklerinde değişiklikler meydana gelebilmektedir [6]. Bir türden başka bir türe doku aktarılmasını içeren ksenogreft tekniğinde hayvanlardan alınan greftler insanlara aktarılabilmektedir [7]. Ancak bu teknikte allogreftlerde olduğu gibi hastalık transferi, donörde immünojenik reaksiyonlar meydana gelerek greftin hasta tarafından reddedilme riskleri vardır [8]. İdeal greftler hasta tarafından iyi bir şekilde tolere edilebilmeli, immünojenik reaksiyonlara sebebiyet vermemeli, kaynak bakımından kolay ulaşılabilir olmalı ve gerçek bir dokunun fonksiyonlarını sağlayabilmelidir [9]. Doku mühendisliği, yararlarının yanı sıra birçok risk faktörünü barındıran bu tipik tedavi tekniklerine alternatif olarak klinik tıp, materyal bilimi, genetik, mühendislik ve yaşam bilimleri alanlarının ilkelerini uygulayan, disiplinler arası bir alan olarak ortaya çıkmıştır [10, 11].

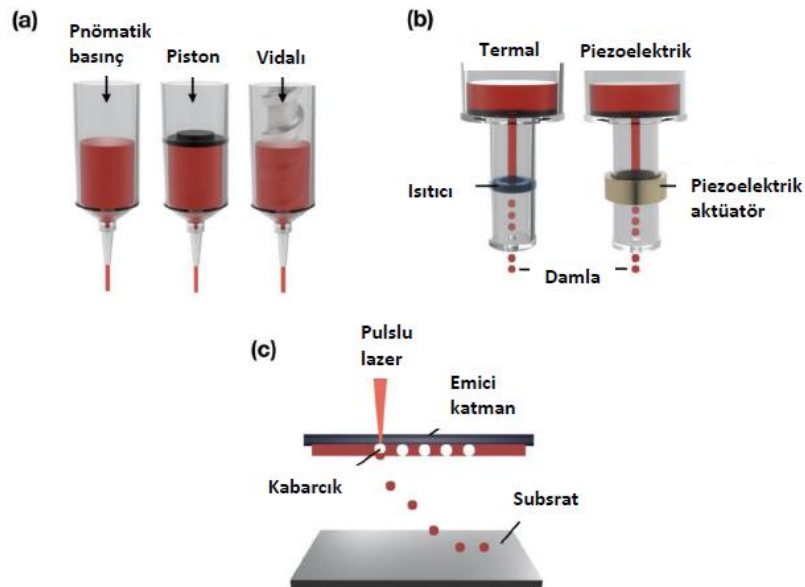
1.5. 3B Biyobaskı Teknolojisi

Aşağıdan yukarıya yaklaşımı kullanılarak doku ve organ rejenerasyonuna yönelik uygulamaların yapıldığı 3B biyobaskı teknolojisi, katmanlı üretim tekniklerinden bir tanesidir. 3B biyobaskı, karmaşık dokuların fonksiyonlarını restore edebilecek malzemeler kullanılarak bir yapı elde edilmesi ve dokunun hücrel mimarisinin taklit edilmesini amaçlamaktadır [12]. İstenilen bu yapılar, hücre ve biyomolekül içerebilen biyomürekkeplerin bilgisayar destekli tasarlanmış modeller üzerinden katman katman basılması ile 3B mimaride elde edilebilmektedir [1].

İdeal 3B bir biyobaskı işlemi gerçekleştirebilmek için çeşitli adımların takip edilmesi gerekmektedir. 3B biyobaskı süreci X-ray, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans (MR), tek fotonlu gama ışınları veya biyoluminesans görüntüleme gibi çeşitli veri toplama yöntemleri kullanılarak hedeflenen doku veya organın biyomodellenmesi ile başlar. Elde edilen tıbbi görüntülerden bilgisayar destekli tasarım (CAD) yazılımları kullanılması ile 3B modeller oluşturulur. Ardından CAD dosyası 3B biyoyazıcı tarafından okunabilmesi için stereolitografi (.STL) formatına dönüştürülür. 3B model, 3B biyoyazıcıya ait yazılım aracılığı ile kullanıcı tarafından belirlenmiş kalınlıklarda 2B katmanlara dönüştürülür [12, 13]. Tasarlanan anatomik modelin 3B biyobaskısını yapmak üzere hücre, büyüme faktörü ve biyobaskı malzemesi içeren biyomürekkep seçimi yapılır. Basılacak dokunun yapısına bağlı olarak bir veya daha fazla baskı başlığı kullanılabilir. Baskı başlıklarının kalibrasyonun yapılmasının ardından uygun hız,

sıcaklık, basınç, needle/nozül boyutu gibi çeşitli sistem parametrelerinin ayarlanması ile 3B biyobaskı gerçekleştirilir [1]. 3B biyobaskı ile elde edilen yapıların çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilerek yapının stabilizasyonu artırılır. Uygun şartların sağlanmasının ardından 3B yapılar in vitro veya in vivo çalışmalarda kullanılabilir [1].

Biyomalzemeler ile birlikte canlı hücreler kullanılarak yapı, boyut ve şekil bakımından doku ve organların doğal mimarisinin taklit edilebildiği 3B yapı iskelelerinin elde edilebilmesi için hassas ve iyi kontrol edilebilen sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Çeşitli teknolojik yaklaşımlar arasında en çok tercih edilenler ekstrüzyon, inkjet, lazer destekli ve stereolitografi biyoyazıcılarıdır [1]. Şekil 1.1.'de de görülen bu 3B biyoyazıcıların çalışma prensipleri, avantaj ve dezavantajları başlıklar halinde aşağıda açıklanmıştır.



Şekil 1.1. 3B biyoyazıcı teknolojileri. a) ekstrüzyon biyoyazıcı, b) inkjet biyoyazıcı, c) lazer destekli biyoyazıcı [14].

1.5.1. Ekstrüzyon Biyoyazıcılar

Ekstrüzyon biyoyazıcılar, pnömatik basınç veya fiziksel kuvvet (piston veya vidalı) kullanılması ile biyomalzemenin mikro boyutlara kadar küçülebilen nozül aracılığı ile basılması prensibine dayanmaktadır (Şekil 1.2.a) [14]. X, y ve z eksenlerinde hareket eden baskı başlıklarına içerisine hidrojel biyomalzeme ile dolu olan şırınga yerleştirilir. Ardında tasarlanan modele göre başlık eksenler boyunca hareket ederken, şırınga içerisinde bulunan biyomalzemenin filament şeklinde devamlı olarak basımı sağlanır. İlk

katmanın basımı sağlandıktan sonra baskı başlığı bir katman yüksekliği kadar yukarı kalkar veya baskı yapılan yüzey aşağı iner ve yeni katmanın basımı sağlanır [15]. Böylelikle tüm model tamamlanıncaya kadar katman katman baskı gerçekleştirilir.

Ekstrüzyon biyoyazıcıların en büyük avantajı düşük hız ve basınçlı ekstrüzyon sayesinde diğer biyoyazıcı sistemlerinde karşılaşılabilen zorlu koşulları (biyomalzeme içerisinde yer alan hücreler üzerinde şok, ısı etkisi vb.) içermemesidir [1, 14]. Bu yaklaşımın dezavantajları ise diğer tekniklere göre nispeten düşük çözünürlüğe sahip olmasıdır. Baskı çözünürlüğü şırınga ucuna takılı olan nozül boyutuna bağlı olarak 100 µm ile milimetre aralığındadır [14]. Ayrıca nozül tıkanması ve artan basınca bağlı olarak hücre apoptozu gibi problemler oluşabilmektedir [1].

1.5.2. İnkjet Biyoyazıcılar

İnkjet biyoyazıcılar, ticari inkjet yazıcıların modifikasyonu sonucu geliştirilen bir teknolojidir [16]. Termal veya piezoelektrik gibi mekanik pulsarı kullanarak şırınga içerisinde bulunan biyomalzemenin küçük damlalar halinde basılması prensibine dayanır (Şekil 1.2.b) [14].

Piezoelektrik inkjet sisteminde, aktüatörler kullanılarak oluşturulan akustik dalgalar sayesinde biyomalzemedan damlacık oluşturulması sağlanır. Aktüatör üzerine voltaj uygulanması durumunda biyomalzeme hızlıca şekil dönüşümüne uğrar ve bu durum damlacığın şırıngadan çıkması için yeterli basıncı üretir. Aynı zamanda bazı inkjet biyoyazıcılarda ultrases dalgaları da kullanılabilir. Bu yöntemin ana avantajı mikro boyutta yapılar elde edebilmek için genlik, zaman ve puls gibi parametrelerin çeşitli varyasyonları kullanılarak oluşturulan damlacıkların hızını ve boyutunu kontrol edilebilir [14, 17]. Biyomalzeme üzerine basınç ve sıcaklık gibi uygulamalar yapılmadığı için biyomalzeme içerisinde yer alan hücrelerin canlılığı korunabilir. Ayrıca nozülden kaynaklanan ve hücre canlılığını olumsuz etkileyen kayma gerilmesi, nozül kullanımına gerek olmadan baskı yapılması ile inkjet biyoyazıcılarda oluşmamaktadır. Termal inkjet biyoyazıcılarda, damlacık oluşturabilmek için elektriksel ısı kullanılmaktadır. Baskı boyunca hücreler geçici bir sıcaklık değişimine maruz kaldığı için bu teknik hücre, proteinler ve çeşitli biyolojik ürünler için kullanılabilir [16, 17]. Ana avantajı düşük ücretli ve baskı hızının yüksek olmasıdır, ayrıca 20-100 µm aralığında çözünürlüğe

ulaşılabilmektedir. Ancak tıkanma, çeşitli damlacık boyutları ve zayıf hücre enkapsülasyonu gibi dezavantajlara sahiptir.

1.5.3. Lazer Destekli Biyoyazıcılar

Lazer destekli biyoyazıcılar, biyomalzemenin transferini sağlamak için pulslu bir lazer ışını, lazeri odaklamak ve hizalamak için odaklama sistemi, altın veya platinden yapılmış emici bir katman (ribon) ve biyomalzeme katmanı için subsrattan meydana gelmektedir (Şekil 1.2.c) [17]. Baskı esnasında lazer, emici katman olan ribonun üzerine odaklanır. Böylelikle ribonun altında yer alan biyomalzemeden yüksek basınçlı hava kabarcıkları meydana gelerek subsrat üzerine transferi sağlanır [17]. Nozül kullanımına gerek olmayan bu sistemde tıkanma problemleri söz konusu değildir, aynı zamanda hücre canlılığı etkilenmeden hassas şekil ve desenler elde edilebilir [14]. Çözünürlüğü 10 µm boyutlarına kadar ulaşabilmektedir ancak en pahalı ve kompleks sistem olarak görülmektedir [16].

Yukarıda bahsedilen 3B biyobaskı tekniklerinin çeşitli özellikleri Tablo 1.1.'de verilmiştir.

Tablo 1.1. 3B biyobaskı tekniklerinin özellik karşılaştırılması [18].

3B Biyobaskı Teknikleri	Ekstrüzyon	İnkjet	Lazer Destekli
Çözünürlük	Orta	Yüksek	Yüksek
Baskı hızı	Yavaş	Hızlı	Orta
Maliyeti	Orta	Düşük	Yüksek
Hücre canlılığı	%40-90	>%85	>%95
Hücre yoğunluğu	Yüksek, hücre sferoidleri	Düşük (<10 ⁶ hücre/ml)	Orta (>10 ⁸ hücre/ml)
Viskozite	30-6 x 10 ⁷ mPa/s	3.5-12 mPa/s	1-300 mPa.s

1.6. Biyomürekkepler (Biyoinkler)

3B biyobaskı teknolojisinde, doku ve organların karmaşık tasarımını üretebilmek için “biyomürekkep” olarak bilinen çeşitli biyolojik malzemeler kullanılır [19]. 3B yapının basılması için kullanılan biyomürekkepler, hücre ve/veya biyoaktif moleküllerin biyomalzemeler ile birlikte kullanılması ile elde edilmektedir. Biyomürekkeplerde farklı formlardaki hücreler, sferoidlerde agregre olmuş hücreler, hücrelerel rodlar, organoidlerde organize edilmiş hücreler, mikrotasıyıcılar üzerine ekilmiş hücreler ve koloidal mikroortamda enkapsüle edilmiş hücreler kullanılabilmektedir. Ayrıca zorunlu olmamakla birlikte hücre gelişimini desteklemek için biyomürekkepler büyüme faktörleri, DNA, miRNA, sitokinler, eksozomlar gibi biyoaktif molekülleri içerebilir [20].

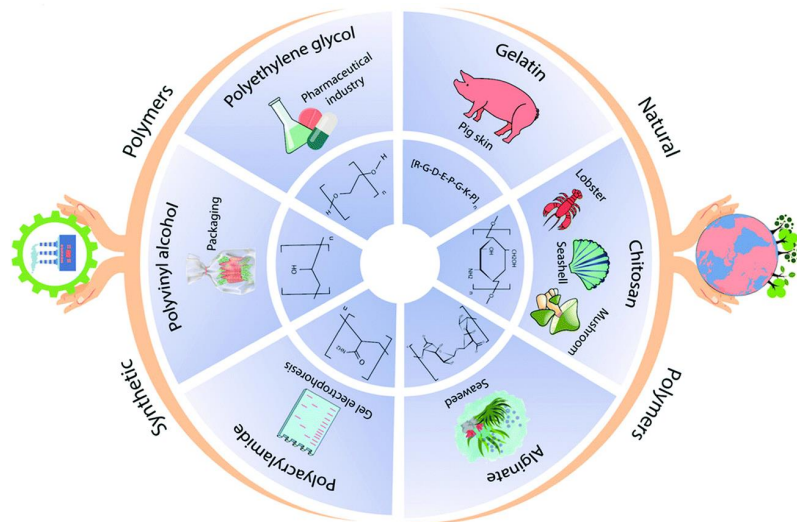
Katmanlı üretim tekniklerinde ilk olarak basımlar biyolojik olmayan uygulamalar için yapılmıştır. Bu çalışmalarda seramikler, metaller ve termoplastik polimerler en yaygın olarak kullanılan malzemelerdir ancak malzemeler için ihtiyaç duyulan yüksek sıcaklık, organik çözücü kullanımını gibi zorlu koşullar biyolojik malzemeler ve hücreler için elverişli değildir. Bu nedenle canlılığı sağlayacak biyolojik malzemeler ve hücreler için uygun şartları sağlayabilecek biyomürekkeplerin geliştirilmesi gerekmektedir. Organ ve doku üretiminde karşılan en büyük problem, gerçek doku ve organlara benzer kimyasal, mekanik ve morfolojik özelliklerin elde edilmesidir. Bu nedenle biyomürekkeplerin bu problemleri gidermesi gerekmektedir [21]. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan hidrojel, aynı zamanda yukarıda verilen gereklilikleri karşılayabilme potansiyeline sahip biyomürekkepler olarak da kullanılabilmektedir.

1.6.1. Hidrojeller

Hidrojeller, hücre yüklü çapraz bağlanmış matrisler oluşturabilmek için sulu çözelti içerisinde hücre ve biyoaktif moleküller ile karıştırılabilen fiziksel veya kimyasal olarak bağlı polimerler içeren 3B sistemlerdir [1, 22, 23]. Hidrojeller kendilerine özgü çapraz bağlı polimer yapıları ile yüksek miktarda su tutma ve sahip olduğu ağ yapısını bağlı tutma kapasitesine sahiptir. Bu durum polimer yapısında bulunan sülfat ($-SO_3H$), hidroksil ($-OH$), amin ($-NH_2$), karboksil ($-COOH$), amid ($-CONH_2$) gibi polar hidrofilik grupları sayesinde elde edilir [24, 25]. Hidrojellerin su emme eğilimi, yapısında bulunan hidrofilik gruplar ile birlikte çapraz bağlanmanın gücüne de bağlıdır [25]. Böylelikle kuru ağırlıklarının 10 ile 1000 katına kadar su ve biyolojik sıvıyı emebilirler [22]. Ek olarak

yüksek su içeriğine sahip olması hidrojellemi oldukça gözenekli ve geçirgen hale getirir. Böylelikle oksijen ve besinlerin yapı iskelesi boyunca hızlı bir şekilde dağılımı sağlanır. Birçok hidrojel hücrelere gerekli olan ilk desteği sağladıktan sonra, hücrelerin çoğalıp çevre dokuyu şekillendirmeye başladıkça bozunur [26].

Polimer yapıda olan hidrojellemi, doğal, sentetik veya doğal ve sentetik polimerlerin birleşimi ile elde edilir. Bu polimerler homopolimer hidrojellemi, kopolimer hidrojellemi, blok kopolimer hidrojellemi, termopolimerler vb. formunda elde edilebilirler [25]. Doğal polimer hidrojellemi omurgasını oluşturan polimerler hayvan, bitki veya mikroorganizmalardan fermentasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak üretilmiş polisakkarit, polipeptid, proteinler olabilir [23, 27]. Doğal polimer hidrojellemi (Şekil 1.2.) örnek olarak kolajen, jelatin, fibrin, elastin, keratin, agaroz, aljinat, hyaluronik asit, kitosan, kondrotin sülfat, karajenan, pektin vb. verilebilir [15]. Sentetik polimer hidrojellemi ise ilk olarak 1950’lerde kontakt lens malzemesi olarak hidroksietil metakrilat kullanılarak geliştirilmeye başlanmıştır [26]. Kolay işlenebilir olmalarından dolayı 3B biyobaskı için tercih edilebilmektedir [17]. Sentetik polimer hidrojellemi (Şekil 1.2.) örnek olarak polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), polietilen glikol (PEG), poliglikolik asit (PGA) verilebilir [14]. Sentetik polimerler toksik olabilmektedir ancak doğal polimerler daha çevre dostu olmakla birlikte kaynakları sınırlıdır [19]. Hidrojel biyomürekkeplerin 3B biyobaskı kapasitesi kalp, kıkırdak, kemik, kas, böbrek, deri, kan damarları, adipoz, bağırsak, trakea, karaciğer ve çeşitli hasar görmüş diğer biyolojik dokuların rejenerasyonunda gösterilmiştir [1].



Şekil 1.2. Sentetik ve doğal polimer hidrojel örnekleri [28].

1.6.1.1. Hidrojellerin Özellikleri

1.6.1.1.1. Biyobenzetim

3B biyobaskı ile elde edilmiş yapıların, doğal dokunun hücre yoğunluğunu, düzenini ve anatomik geometrisini taklit etmesi amaçlanır. Bu nedenle rejeneratif tıp uygulamaları için umut verici çözüm olarak görülmektedir [26]. Biyobenzetim, iç/dış etkenler olan sinyal molekülleri, çözünebilen ve çözünemeyen faktörler, sıcaklık, basınç vb. kullanılarak hücresel etkileşimler sağlanması ile hücrelerin fonksiyonel bileşenlerinin yeniden üretilmesi temeline dayanmaktadır [22]. Hidrojeller, hidrofil yapıları, hücre ve biyoaktif molekülleri enkapsüle edebilme özellikleri ile hücre taşınımı için elverişli bir ortama sahip olup, doku rejenerasyonu için doğal ECM'nin birçok özelliğini taklit edebilmektedir [16].

İnsan vücudunda epitel, kas, sinir ve bağ doku olmak üzere 4 temel doku tipi bulunmaktadır. Her bir doku türü, hücresel bileşenler ve hücre dışı ortam ile dokunun birincil fonksiyon durumuna göre bir dengeye sahiptir. Epitel hücreleri, salgılama ve emilim yapmak üzerine özelleşmiş iken kas hücreleri kasılma yoluyla kuvvet üretmektedir. Sinir, periferik ve merkezi sinir sistemine giden ve gelen elektrik sinyallerinin iletimini sağlar. Bağ dokular ise mekanik ve şekilsel destek sağlamakla görevlidir. Bütün bu doku tiplerinin farklı işlevlere sahip olması nedeniyle, her bir dokunun histolojik yapısında farklı düzenlemeler mevcuttur. Epitel, kas ve sinir dokuları göreceli olarak yüksek hücre/ECM oranına sahip olmakla birlikte dokuların asıl işlevi göreceli olarak az olan ECM aracılığı ile sağlanır. Tendon, ligament, kıkırdak, kemik gibi bağ dokuları ise göreceli olarak düşük hücre/ECM oranına, böylelikle yüksek ECM miktarına sahiptir. Bu dokularda bulunan, ECM üretimi konusunda özelleşmiş hücreler, bol miktarda protein sentezleyerek vücudun mekanik bütünlüğü ve yapısının korunmasını sağlarlar [27].

Dokuların doğal yapısı ve fonksiyonları, dokunun sahip olduğu ECM düzeniyle belirleniyor olup bu düzen malzemelerin biyobenzetimi açısından önem arz etmektedir. Hidrojeller doğal ECM yapısını taklit ederek hücreleri yönlendirebilir [16]. ECM, yüzlerce protein ve karbonhidrattan oluşan, devamlı kendini yenileyen, şekillendiren, hücre yönlendirici, büyüme, göç ve farklılaşma faktörleri bulunduran oldukça dinamik bir yapıdır. Tüm bu faktörler, hücrelerin bağlanması, şekli, çoğalma ve farklılaşma

kapasitesi, uygun fenotipe farklılaşma yetenekleri üzerinde büyük bir etki sağlayacak olan mikroçevre oluşumuna katkı sağlar [16]. Hücreler, hücre zarında bulunan integrin olarak bilinen ECM bağlayıcı proteinler aracılığı çevresi ile iletişim kurabilmektedir. İntegrinler, hareketlilik, canlılık, çoğalma ve farklılaşma gibi önemli hücresel olaylarda anahtar rol oynamaktadır. ECM, hücre iskeletlerinin ECM mikroçevresine bağlanmasını sağlayacak bir hücre bağlanma ligand ortamı içerir. Bu bağlayıcı liganlar, ECM yapısında bulunan kolajen, laminin, fibronektin gibi ECM proteinleri üzerinde bulunur [29]. Farklı ECM bileşenleri, belirli integrinler ile spesifik etkileşime girebildikleri için, dokularda bulunan çeşitli ECM yapılarının çeşitli hücre tipleri üzerinde farklı etkileri bulunabilmektedir [16].

Organik kaynaklarından dolayı doğal olarak elde edilen hidrojeller, içeriğinde bulunan tüm bu faktörler aracılığı ile hücresel yanıtı sağlayarak biyobenzer özellik göstermektedir. Sentetik polimer hidrojeller ise doğal yapılarında aranan faktörleri içermese de hücre adezyon molekülleri, enzim spesifik sekanslar gibi bileşenler ile modifiye edilerek biyobenzer özellikleri kuvvetlendirilmeye çalışılır [27].

1.6.1.1.2. Biyouyumluluk

Herhangi bir malzemenin biyouyumluluğunu değerlendirmenin amacı, malzemenin vücut üzerindeki toksik etkisini belirleyebilmektir. Bu nedenle biyomalzemeler, konakta herhangi bir hasar veya istenmeyen yan etkilere neden olabilecek biyolojik tepkileri belirleyebilmek için değerlendirmelidir [16]. Hidrojeller, dokular ve hücreler ile temasta bulunduğu için iyi bir biyouyumluluğa sahip olmalıdır.

Biyouyumluluk, biyogüvenlik ve biyoışlevsellik olarak ikiye ayrılabilir. Biyogüvenlik yalnızca sistemik reaksiyon değil aynı zamanda yerel olan sitotoksikite, anjiyogenez, mutageniz eksikliği bulunan konak reaksiyonudur. Biyoışlevsellik ise malzemenin tasarlandığı üzere işlevini yerine getirebilmesi, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi ile kendini gösterir. Biyoışlevsellik, özellikle doku mühendisliğinde önem arz etmektedir çünkü dokular, iyileşme ve hücre yenilenme süreçleri boyunca ve aynı zamanda yapı iskelelerinin bozunması esnasında devamlı olarak etkileşim halindedir [30].

1.6.1.1.3. Biyobozunurluk

Hidrojellerin tasarımında önemli bir faktör olan biyobozunurluk, hidrojin zaman içerisinde yeni oluşacak fonksiyonel doku ile yer değişimini amaçlamaktadır [26]. Tüm hidrojellerin, hücrelerin büyümesi destekleyici bir ortam görevi gördüğü için bozunmaya uğraması gerekmektedir. Hücrelerin büyümesi için alana ihtiyaç duyduğundan, doku rejenerasyonunun sağlanması esnasında hidrojellerin bozunması, hücrelerin çoğalması ile senkronize bir şekilde gerçekleşmelidir. Hidrojellerin erken aşamada bozunması, hücre ölümüne ve rejenerasyon esnasında destekleyici ortam sağlanamaması sonucu doku rejenerasyonunun gerçekleşmemesine neden olur. Hidrojellerin geç aşamada bozunması ise, immünojenik reaksiyonlara, aynı zamanda büyüyen hücrelerin ortam içerisinde boğulmalarına neden olur [8]. Hücreler çoğalıp, farklılaşıp, kendi ECM'lerini üretmeye başladıklarında, hidrojel bozunma sonucu vücuttan kolaylıkla atılabilen yan ürünlere dönüşmelidir [31].

Biyobozunurluk, hidrojellerin polimer zincirlerinde yüksek oranda bulunan ester, karbonat, peptid grupları gibi hidrolize edilebilir gruplar ile ilişkilidir. Hidrojellerin biyobozunma oranının ayarlanabilmesi için başlıca üç yol bulunmaktadır. Birincisi, biyobozunma oranında baskın bir faktörü olan polimerlerin kimyasal yapı ve bileşimlerini kontrol etmektir. İkincisi, polimerlerin konsantrasyonunu değiştirmek gibi fiziksel faktörlerin ayarlanmasıdır. Üçüncüsü ise, hidrojin çapraz bağlanma metodunu seçmektir. Çapraz bağlanma, farklı polimer zincirlerinin etkileşimleri üzerinde önemli ölçüde etkisi bulunduğu için biyobozunma oranında çok büyük değişikliklere neden olabilmektedir [32].

1.6.1.1.4. Mekanik Özellikler

Biyomürekkepler 3B basılmış yapının stabilitesini korumak ve yapı içerisindeki spesifik kuvvetlerin dengesini sağlayabilmek için uygun bir mekanik kuvvete sahip olmalıdır. Farklı doku ve organların sahip olduğu elastik modül gereksinimlerine göre bu gereksinimleri karşılayacak mekanik ve yapısal özelliklere sahip hidrojel seçimi yapılmalı, böylelikle 3B basılmış yapının işlevini sürdürmek çok önemlidir. Dokuların mekanik özellikleri çok çeşitli olabilmektedir. Yağ, deri, kas gibi dokular oldukça yumuşak iken, kıkırdak ve kemik gibi dokular daha sert yapıya sahiptir. Bu mekanik özellikler dokuların fonksiyonlarını sağlayabilmesi için gereklidir ve hidrojel tasarımı

için göz önünde bulundurulmalıdır [27]. Genellikle hidrojel­ler yumuşak özellik sergilemektedir ancak gerekli mekanik kuvveti karşılayabilmek için doğal hidrojel­ler ile sentetik hidrojel­lerin birarada kullanılması da mümkündür. Bunlara ek olarak, basımı yapılacak olan modelin yapısal özellikleri (içi dolu/boş model basımı vb.) mekanik kuvveti etkilemektedir. Bu nedenle, doğal dokunun mekanik özelliklerini karşılayabilmek için hem dokuya uygun hidrojel, hem de deneysel gerekliliklere göre 3B yapının tasarımı optimize edilmelidir [33].

Ek olarak hidrojel­lerin bozunma hızı mekanik stabiliteyi de etkileyebilmektedir. Hidrojel yapısının bozunması, yapıyı daha zayıf hale getirebilmektedir. Hızlı bir şekilde bozulan hidrojel 3B olarak basılmış yapının çökmesine ve bulunduğu alanda gerekli mekanik dayanımı gösterememesine neden olabilmektedir. Ayrıca hidrojel bileşimine, hücre tipine ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak mekanik özellikler etkilenebilmektedir [27].

1.6.1.1.5. Şişme Kapasitesi

Doku mühendisliği için kullanılan hidrojel­lerin fiziksel özelliklerini tanımlayan en önemli parametrelerden biri vücut sıvılarını emebilme yeteneği olan şişme özellikleridir. Hidrojel­ler, besinler ve metabolik ürünlere nüfuz edip onların taşınımlarını sağlayabilmelidir. Hidrojel­lerin şişme özellikleri, pH, sıcaklık, çapraz bağlanma mekanizması gibi çeşitli paramet­lerden etkilenmektedir. Şişme özellikleri, çapraz bağlanma yoğunluğu ile ters orantılı ve büyük ölçüde hidrojin kimyasal yapısına bağlıdır [15].

Hidrojel­lerde bulunan su, polimerik zincire bağlı su, serbest su ve yarı bağlı olarak sınıflandırılabilir. Kuru hidrojel, su ile temas ettiği zaman ilk olarak su molekülleri hidrojel içerisine nüfuz eder ve hidrofilik grupları hidratlar. Gruplar hidratlandığında polimer ağ yapısı şişer ve hidrofobik grupları açığa çıkarır. Hidrojin hidrofilik ve hidrofobik grupları su molekülleri ile etkileşime girdikten sonra, polimerik ağ zinciri ozmotik kuvvetin etkisiyle su emmeye devam eder. Hidrojel özellikleri, polimer zincirlerine bağlı olan -OH, -CONH, -COOH, -CONH₂, -SO₃H gibi hidrofilik grupların bağlı olduğu polimer türlerine göre değişmektedir. Örneğin, alkol, amidler ve karboksilik asitlerin varlığı, hidrojin sertliğini ve suyu emme kapasitesini artırır [34]. Daha çok hidrofilik gruplara sahip olan hidrojel­ler, hidrofobik grupların yoğun olarak bulunduğu

hidrojellere göre daha hızlı şişer [15]. Ek olarak fonksiyonel grupların varlığı, hidrojel oluşturulması sırasında tercih edilen çapraz bağlanma türünü de etkiler.

1.6.1.1.6. 3B Biyoyazıcılarda Basılabilirlik

Ekstrüzyon 3B biyoyazıcılar, biyomürekkepleri damlacık şeklinde basmak yerine düz filamentler haline getirerek baskı yapılmasını ve filamentlerin üst üste basılması ile 3B yapıların elde edilmesini sağlar. 3B biyobaskı, malzemenin ne sıvı ne de katı durumuna bağlıdır. Biyomürekkeplerin ekstrüzyonu kayma kuvvetine bağlı olarak elde edilir ve biyomürekkebin reolojisi ve viskozitesi, basılabilirlik için önemli faktörlerdir. Ekstrüzyon 3B biyobaskı sağlanırken biyomürekkep hem akışkan özelliğe sahip olmalı hem de baskı sonrasında şeklini koruyabilmelidir. Yani 3B biyobaskı esnasında, hücre varlığında biyomürekkep minimum bir iç dirençle akmalı, 3B biyobaskı tamamlandıktan sonra ise akışkan durumun kesilip, deformasyona karşı bir iç kuvvet oluşmalı ve elastik şeklin korunması gerekmektedir. Bu özelliklerin karşılanabilen biyomürekkepler viskoelastik olarak adlandırılır [35]. Akışkan viskoelastisitesi, elastik modülü ve viskozite modülü olmak üzere iki parametreden oluşmaktadır [33]. Depo modülü (G') olarak da adlandırılan elastik modülü biyomürekkebin enerjiyi elastik olarak depolayabilme özelliğini ifade etmekte, bu nedenle biyomürekkebin şeklini koruyabilmesi ile ilişkilidir. Kayıp modülü (G'') olarak da ifade edilen viskozite modülü ise biyomürekkebin kaybettiği enerjinin ölçüsüdür ve biyomürekkebin akışkan özelliği ile ilişkilidir [35, 36]. Ekstrüzyon biyobaskıda, baskı koşulları altında biyomürekkebin elastik özellikleri, akışkan özelliklerinden daha zayıf olmamalıdır. Yani 3B yapıların oluşturulması için viskozite modülünün, elastik modüle eşit veya daha yüksek olması gerekmektedir. Viskoelastik özellikler, reolojik analizler ile gerçekleştirilir. G' ve G'' değerleri tipi olarak salınımın frekans ve genlik fonksiyonları olarak ölçülür [35].

Viskozite, biyomürekkebin akmaya karşı gösterdiği dirençtir ve hem baskı doğruluğu hem de hücre kapsüllemenin verimliliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Viskoziteyi belirleyen temel parametreler polimerin moleküler ağırlığı ve konsantrasyonudur. Yüksek viskoziteler daha yüksek biyobaskı doğruluğu sağlarken aynı zamanda biyomürekkep içinde bulunan hücreler üzerinde daha fazla kayma gerilimi oluşturur. Viskozite, kayma geriliminin kayma hızına oranını verir [35]. Kayma incelenmesi, 3B biyobaskı esnasında devamlı bir akışın sağlanabilmesi için ekstrüzyon biyobaskının temel prensibidir. Polimer içerikli biyomürekkepler kayma ile birlikte inceler ve polimer bağlar

arasında gerilim meydana gelir. Böylelikle gerilime bağlı olarak akışkanlık artar. Sonuç olarak biyomürekkebin viskozitesi, kayma gerilmesinin artması ile azalır ve basma işlemi sırasında akışkanlığı artırır [33].

1.6.1.1.7. Çapraz Bağlanabilirlik

Çapraz bağlanmadan önce hidrojeller tipik olarak sıvı polimer çözeltileridir ve katman katman 3B bir yapının basılması bu formda iken mümkün değildir. Ancak hidrojel ağları, çapraz bağlar adı verilen fiziksel veya kovalent etkileşimler ile katı hale getirilip bir arada tutulabilir. Bu çapraz bağlı ağların mekanik özellikleri, polimerin ağ yapısı ve çözeltinin bileşenleri arasındaki etkileşimler ile belirlenir. Bu nedenle hem çapraz bağlanmamış çözeltinin sıvı özelliklerini, hem de çapraz bağlı hidrojel yapısının mekanik özelliklerini kontrol edebilmek 3B biyobaskı çalışmalarında önem arz etmektedir [26].

Polimerik zincirler ve hidrojeller arasındaki çapraz bağlanma kuvvetine göre hidrojeller, kimyasal hidrojeller, fiziksel hidrojeller ve her ikisinin kombinasyonu ile hibrit hidrojeller şeklinde sınıflandırılabilir. Fiziksel hidrojeller, polimer zinciri arasındaki çapraz bağlanmalar hidrojen bağı, iyonik kuvvetler, Van der Waals etkileşimleri, hidrofilik ve hidrofobik kuvvetler gibi kovalent olmayan bağlar aracılığı ile sağlanır [25]. Hidrojen bağları ile çapraz bağların oluşturulması yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hidrojen bağlarının artması ile daha kuvvetli hidrojeller elde edilebilir. İyonik kuvvetler kullanılarak gerçekleştirilen çapraz bağlanmalar, iyonlaşabilen polimerlerin katyonlarla etkileşimine dayanmaktadır. Buna örnek olarak aljinatın kalsiyum klorür kullanılarak çapraz bağlanması verilebilir. Katyonlar farklı değerlik seviyelerinde olması durumunda çapraz bağlanma seviyelerini etkileyebilir ve çapraz bağ içerisinde yer alan bir maddenin kontrollü salınımlarında rol oynayabilir. Hidrofobik çapraz bağlanma ise miseller yapısı sayesinde dış kuvvetlerin dağılmasını sağlayabilir [37]. Fiziksel çapraz bağlanmaların hem avantajı hem dezavantajı bulunmaktadır. Fiziksel hidrojeller, polimer zincirleri arasındaki ikincil etkileşimler çok kuvvetli olmadığı için tersinir özellik sergilerler. Zayıf bağlardan dolayı hidrojeller dış uyaranlara maruz kaldığında düzensiz, kırılabilir ve mekanik olarak kuvvetli değildirler. Ayrıca yine zayıf bağlardan dolayı ısıtıldıklarında organik çözücülerde ve suda çözünür hale gelirler [25]. Fiziksel çapraz bağlanmaların avantajı ise kovalent çapraz bağlanmalar için ihtiyaç duyulabilecek toksik ve zararlı çapraz bağlama maddelerinin kullanılmamasıdır [37].

Kimyasal hidroojeller ise polimer zincirleri arasında kovalent bağlanmalar ile meydana gelir. Makromoleküler zincirler arasında güçlü kovalent bağlar olduğu için fiziksel hidroojellerde olduğu gibi tersinir özellikte değildir, hidrojelci çevreleyen ortamda çözünmezler ve depo modülünün artması gibi mekanik dayanımları daha yüksektir [25, 37]. Kovalent çapraz bağlanmalar termal polimerizasyon, fotopolimerizasyon, enzimatik çapraz bağlanma gibi birçok yöntemle sağlanabilmektedir. Fotopolimerizasyon, jel oluşumunu başlatmak için özel bir serbest radikal polimerizasyon şeklidir. Başlatma, yayılma, zincir transferi ve sonlandırma olmak üzere serbest radikal polimerizasyon dört adımdan oluşur. Çapraz bağlanma reaksiyonu fotobaşlatıcılara UV ışığının uygulanması ile başlar. Işığı (foton) soğuran fotobaşlatıcılar hızla radikallere veya iyonlara parçalanan aktif formlara dönüşür yani başlatma adımında yayılma zincirlerini başlatan serbest radikal aktif merkezler oluşturulur. Ardından yayılma adımında, ardışık monomer birimleri büyüyen polimer yapısına eklenir. Zincir transferinde büyüyen bir polimer sonlandırılır ve bir başkası başlatılır. Son olarak sonlandırma adımında ise aktif merkezler yok edilerek polimer büyümesi sonlandırılır [38]. Bu yöntemin avantajı, istenilen bölgelerde çapraz bağlanma sağlanarak seçici çapraz bağlanma elde edilmesidir. Ayrıca reaksiyonun zorlu olmayan koşullar ve sıcaklık altında gerçekleştirilmesi, bu yöntemin tercih edilirliliğini artırır. Genel olarak fotopolimerizasyon, metakrilat gruplarına sahip polimerler üzerinden gerçekleştirilir. Çift bağ, bileşikler UV ışığa karşı duyarlı hale getirir, böylelikle zincir polimerizasyonu gerçekleştirilebilir. Metakrilatlanmış hyaluronik asit, fotopolimerizasyon için en çok çalışılan hidroojellerden biridir. Bir başka kovalent çapraz bağlanma tekniği ise enzimatik polimerizasyondur ve enzim substrat özgüllüğüne dayanır. Hidroojeller için toksik olmayan ve kararlı bir çapraz bağlanma sağlar. Reaksiyon nötr pH ve atmosferik sıcaklık gibi hafif koşullarda meydana gelebilir [37]. Kimyasal çapraz bağlanmalar formaldehit, glutaraldehit, genipin, diglisidil eter ve N, N'-metilenbisakrilamid kullanılarak çeşitli yollarla gerçekleştirilebilir. Kimyasal çapraz bağlanma hidroojellere mükemmel termal, mekanik, kimyasal ve yüzey özellikleri kazandırmasının yanı sıra hidroojellerin şişmiş bir ağ durumunda kalmasından da sorumludur [25].

1.6.1.2. 3B Biyoyazıcılarda Kullanılan Hidroojeller

Bu bölümde 3B biyoyazıcılarda kullanılan bazı hidroojellerden bahsedilmiştir. Biyobaskı sırasında kullanılan bu hidroojellerin temel işlevi, baskı sırasında ve sonrasında hücreleri

3B bir alanda konumlandırabilmektir. Piyasadaki çoğu hidrojel, geçici hücre dışı matriks rolleri ile aljinat, kolajen, jelatin, hyaluronik asit, kitosan, selüloz, agaroz, karajenan gibi doğal hücre dışı matriks kaynaklarından elde edilirler. Doğal kaynaklardan üretilen bu polimerler hidrojel olarak çok uygundur çünkü hücre bağlanması ve çoğalmasını destekler, aynı zamanda kolaylıkla parçalanabilip vücut tarafından metabolize edilebilirler. Birçok avantajının yanında bu polimerlerin yüksek değişkenlik potansiyeli, vücutta reddedilme veya immün reaksiyonlara neden olma, nispeten hızlı bozunma ve zayıf mekanik özellikler gibi çeşitli sınırlayıcı dezavantajları da bulunmaktadır [27].

Sodyum aljinat, kahverengi deniz yosunundan elde edilen, anyonik bir polisakkarittir. M (β -D mannuronik asit monomerleri) ve G (α -L-guluronik asit blokları) gruplarını içeren bir lineer blok kopolimer yapısına sahiptir. G blokları, iki değerlikli katyonlarla etkileşime girerek iyonik bağlar oluşturabilir, böylelikle çözeltilerde jel haline gelebilmektedir. Aljinatı biyobaskı için tercih edilir hale getiren özellikleri biyobenzer yapıda olması, uygun viskozite değerleri, ideal sıcaklıklarla jelleşebilmesi ve yüksek biyouyumluluğa sahip olmasıdır [17]. Ancak aljinat doğal olarak üretilmiş bir polimer olsa da memeliler bu polimer ECM yapısında kullanmadıkları için biyomimetik olarak kabul edilemezler. Ayrıca aljinatta bulunan yüksek kalsiyum içeriği bu hidrojinin büyük doku yenilenmesi için kullanılması durumunda kan dolaşımına veya çevreleyen dokuya salınımı ile hiperkalsemi ve böbrek hasarına yol açma potansiyeli vardır [27].

Kolajen, büyük miktarda hidroksiprolin, prolin, glisin gibi aminoasitlerden ve eser miktarda sülfür içeren amino asit ve aromatik amino asit içeriğine sahip doğal bir polimerdir. Hidroksiprolin ve prolin kolajenin üçüncül yapısını korur. Çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için kullanılan kolajen, ECM yapısına ait temel proteinlerden biridir ve hücre davranışında büyük etkiye sahiptir. Ancak zayıf mekanik özellikleri nedeniyle 3B biyobaskı için kullanımı sınırlıdır [17]. Jelatin ise kolajenin denatürasyona uğramış halidir. Bu nedenle daha az tersiyer yapıya sahiptir. Genellikle 40 °C’de sarmal yapıda bulunur ve soğutulduğunda üçlü helis formunu tekrar kazanabilir. Hücre bağlanmasında etkin rol oynayan hücre adezyonu sekansı arginin glisin aspartik asit alanlarının bulunması nedeniyle doku mühendisliğinde geniş çapta kullanılmaktadır. Hücresel biyouyumluluk göstermesine rağmen oldukça viskoz yapısı ile biyobaskı uygulamaları için dezavantaj oluşturur [17].

Hyaluronik asit, (β -1,3) β -1,4-bağlı D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozamin disakkaritlerden oluşan lineer bir polisakkarittir. Viskoelastik, biyobozunur ve yüksek biyoyumluluk özellikleri ile 3B biyobaskı için elverişli bir polimer olsa da yüksek hidrofilik özelliğe sahip olması biyobaskı için limitasyon oluşturmaktadır. Hidrofilikliği azaltmak için çeşitli kimyasal çapraz bağlama yöntemleri ve hidrofobik yan zincirler ile türetilmesi üzerine çalışılmıştır [17]. Ayrıca istenilen şekil ve gözenekli yapıya elde edilmesinde de zorluklar yaşanabilmektedir. Bu nedenler ile hyaluronik asit ve diğer polimerlerin bir arada kullanılarak hidrojel elde edildiği çeşitli stratejiler geliştirilmiştir [1].

Kitin türevidir olan kitosan, omurgasızlar ve kabukluların dış iskeletlerinde, ayrıca mantarlarda bulunabilen bir polimerdir. β -D-glukozamin zincirleri ve N-asetil- β -D-glukozamin birimlerinden glikosidik bağlarla oluşan katyonik bir heteropolimerdir. Kitinin %40-%98 oranlarında deasetilasyonu ile oluşturulur. Nötr ve bazik ortamlarda çözünmeyen kitosan, 6.2 üzerinde bir pH'da iyonik kuvvetlerin varlığından dolayı hidrojinin çökmesine neden olur [1]. Pozitif yüklü alkalın polisakkarit olan kitosan, biyobozunur, biyoyumlu ve antibakteriyel özelliklere sahiptir. Aynı zamanda kimyasal modifikasyonu da kolaydır [15]. Ancak zayıf mekanik özelliklere sahip olmasından dolayı sert doku mühendisliği uygulamaları sınırlıdır [1].

Selüloz, bitkiler, hayvanlar ve bazı bakterilerde olmak üzere çok çeşitli canlılarda bulunabilmektedir. En çok ticari kaynaklı olarak kullanılan selüloz ağaç ve bitki liflerinden elde edilenlerdir. Aynı zamanda bakteri, alg ve deniz canlıları tarafından da üretilmektedir [34]. Homopolimer yapıda olan selüloz, uygun gerilme özelliklerine ve kristal formda bir yapıya sahiptir. Selüloz, özellikle β -(1 $\rightarrow$ 4) glikosidik bağlar ile bağlanan iki β -D-anhidroglukopiranoz birimlerini içeren, tekrar eden selobiyoz birimlerinden oluşur. Bu düzenleme şerit yapı oluşturmak üzere molekül içi hidrojen bağları ile stabilize edilmiştir. Hidrojen bağları molekülleri temel bir mikrofibriler yapı halinde birleştirir ve bu lifler biraraya gelerek kristal yapı oluşturur [1]. Selüloz, 3B biyobaskı için biyoyumlu, biyobozunur ve hidrofilik özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir [34]. Ancak zayıf mekanik özellik göstermektedir.

Agaroz, kırmızı alglerden elde edilen bir polisakkarittir. Yapısında 1,4-bağlı 3,6-anhidro-L-galaktoz ve 1,3-bağlı -D-galaktoz zincirlerini barındırır. Vasküler ve cilt rejenerasyonu

uygulamalarında biyouyumlu, toksik olmaması ve ayarlanabilir özellikleri ile tercih edilmektedir [15]. Agarozun hidrojel oluşumunu etkileyen iki temel faktör vardır; sıcaklık ve konsantrasyon. Çözelti halindeki agaroz zincirleri, yüksek sıcaklık altında rastgele bir sarmal yapı sergilerken, sıcaklığın düşürülmesi ile tek veya çift sarmal yapı oluşturarak jel haline dönüşür [1]. Yapılan bir çalışmada agarozun sol-gel geçişinin 37 °C’de gerçekleştiği ve 4-37°C aralığında yapının kararlı özellik sergilediği gösterilmiştir [39].

Karajenan, sıcak suda çözünen, kırmızı deniz alglerinden elde edilen sülfatlanmış bir polisakkarittir. α (1→3) ve β (1→4) glikosidik bağlar ile bağlanmış anyonik bir polimer olan karajenan, β -D-galaktopiranoz ve 3,6-anhidro- α -D-galaktopiranoz birimlerinden oluşur. Karajenanın önemli özelliklerinden biri elde edildiği alg kaynağı ve ekstrakte edilme yöntemidir. Bu kaynaklara göre benzer kimyasal yapıya sahip, kappa (κ), iota (ι) ve lambda (λ) olmak üzere 3 farklı karajenan türü elde edilebilmektedir. Her tipte yer alan sülfat ester seviyesi hem jelleşme üzerinde hem de çözünürlük sıcaklığı ve jel kuvveti üzerinde etkiye sahiptir [1]. İyi biyouyumluluğa ve kararlı yapıya, aynı zamanda mükemmel antikoagülasyon özelliklerine sahip olmasından dolayı karajenan kemik dokusu ve diğer doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır [15].

1.6.1.3. Foto-Çapraz Bağlanabilir Hidrojeller

Işığın malzemenin reaksiyon davranışı üzerinde uzay-zamansal kontrol sağlamasından dolayı foto çapraz bağlanabilir hidrojeller doku mühendisliğinde ilgi çekici hale gelmiştir. Bu nedenle foto çapraz bağlanma, 3B biyobaskı teknolojisinde üretimin doğruluğu üzerinde kontrol sağlamaktadır. Ayrıca foto çapraz bağlanmanın kimyası üzerinde kontrol sağlanması ile minimal yan ürünler elde edilebilmektedir. Böylelikle hücre içeren yapıların 3B baskısı güvenli bir şekilde elde edilebilir [40].

Sentetik hidrojeller ile karşılaştırıldığında, jelatin, kolajen, aljinat, hyaluronik asit gibi polipeptid, polisakkarit, glikozaminoglikan temelli doğal polimerler daha iyi biyobozunur, biyouyumlu ve biyolojik yanıtlar oluşturan işleve sahiptir. Ayrıca bu hidrojeller ECM yapısını taklit edebildikleri, ayarlanabilir viskoelastik özelliklere sahip oldukları ve yüksek geçirgenliğe sahip oldukları için tercih edilmektedirler. Bu özellikler hücrelerin bağlanması, yayılması, çoğalması üzerinde etkilidir [40]. Ancak doğal polisakkaritler tekrarlayan monosakkarit birimleri ve makromoleküller arasındaki ve

içindeki güçlü hidrojen bağları nedeniyle biyomedikal uygulamalarda yetersiz kalabilmektedir [23]. Ek olarak pH ve sıcaklık gibi çevresel faktörler doğal polisakkaritlerin stabilitesini kolaylıkla etkileyebilmektedir. Ayrıca polipeptid, polisakkarit temelli doğal hidrojellerin güncel problemleri 2B ve 3B yapılarda zayıf mekanik özellik göstermesi, düşük kararlılık, ham maddede oluşan varyasyonlar ve hücrelerle kullanılmak üzere saflaştırılmasının zor olmasıdır [40]. Ancak polipeptid ve polisakkaritler çok çeşitli fonksiyonel gruplara sahiptir ve polimerlerin glikosil birimlerine bağlanan çok sayıda fonksiyonel gruplar üzerinden kimyasal modifikasyonlar gerçekleştirilmektedir [23, 40]. Böylelikle çeşitli jelleşme mekanizmaları ile mekanik ve biyolojik özellikleri ayarlanabilen, hücre davranışlarında direk etkiye sahip hidrojeller elde edilebilir [23, 40]. Fonksiyonelleştirilmiş bu hidrojeller reolojik davranışları, mekanik özellikleri, biyobozunurluğu, biyouyumluluğu ve biyolojik aktiviteleri ile doku mühendisliği uygulamaları ihtiyaçlarına hitap etmektedir [23].

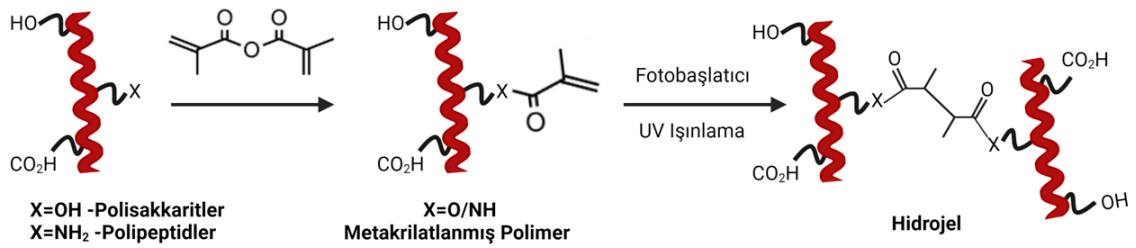
3B biyobaskı teknolojisinin gelişim sürecinde en önemli tasarım değişiklikleri, polimerlerin kimyasal olarak modifiye edilmesi ve bu polimerlerin kullanımının artması ile sağlanmıştır. Biyolojik olarak aktif özellik gösteren bu hidrojeller, farklı çapraz bağlanma teknikleri ile fonksiyonelleştirilebilir. Fiziksel yollar ile çapraz bağlanan doğal hidrojeller, genellikle kovalent bağlar ile çapraz bağlanan sentetik hidrojellere göre daha zayıftır. Ancak fiziksel çapraz bağlar tersinirdir ve sıcaklık, pH, iyon konsantrasyonu gibi çevresel faktörlere karşı duyarlılık gösterir. Bu nedenle doğal polimerlerin, kovalent bağlar ile çapraz bağlanarak fonksiyonelleştirilmesi ile hidrojinin hem mekanik kuvvetinin artırılması hem de çevresel faktörlere olan duyarlılığın azalması sağlanabilir. Aljinat, jelatin, hyaluronik asit ve kolajen dahil olmak üzere bir çok doğal hidrojel mekanik kuvveti ve in vivo ortamda stabiliteyi artırmak için fonksiyonelleştirilmiştir. Ayrıca fonksiyonelleştirme işlemi hücre bağlanması ve bozunma özelliklerini değiştirmek için kullanılabilir [26].

1.6.1.3.1. Metakrilasyon

Bu bölümde birçok hidrojel fonksiyonelleştirme teknikleri arasından tez kapsamında çalışılan metakrilasyon işlemi anlatılmaktadır.

Metakrilasyon, polimer fonksiyonelleştirme yöntemleri arasından en popüler olanlardan biridir. Şekil 1.3.'de görüldüğü üzere metakrilasyon işlemi -OH grubu bağlı polimer

omurgasına sahip polisakkaritler veya $-NH_2$ grubu bağlı polimer omurgasına sahip polipeptitlerin kovalent çapraz bağlar aracılığı sayesinde metakrilat grupları ile fonksiyonelleştirilmesi temeline dayanır [26]. Foto çapraz bağlanabilir polimerler tasarlanmanın en yaygın yolu, metakrilik anhidrit kullanılarak esterleşme yoluyla metakriloil gruplarının dahil edilmesidir. Bu metakrilatlanmış öncüller (ışık enerjisi kullanılarak çapraz bağlanabilen fonksiyonel bir gruba sahip olan polimerler), fotobaşlatıcı varlığında serbest radikal zincir polimerizasyon yoluyla hızlı bir şekilde çapraz bağlanabilir. Serbest radikal zincir polimerizasyon, fotobaşlatıcı konsantrasyonu, reaktif grup konsantrasyonu veya ışık yoğunluğunun istenilen şekilde belirlenebilmesi ile ağ yapısı ve çapraz bağlanma yoğunluğu üzerinde ayarlamalar yapılmasına olanak tanır [40].



Şekil 1.3. Polimerlerin metakrilatlanma işlemi

Çoğu akrilatlanmış ve metakrilatlanmış polimerler düşük viskoziteye sahiptir. Bu nedenle hidrojin 3B basımı için UV ışık kullanılarak yerinde çapraz bağlanması sağlanır. Metakrilatlanmış hyaluronik asit, metakrilatlanmış jelatin gibi hücre yüklü birçok hidrojel foto çapraz bağlanılarak 3B biyobaskı sistemlerinde kullanılabilir. UV fotobaşlatıcı ve görünür ışık fotobaşlatıcı kullanılarak yapılan çalışmalarda hücreler üzerinde belirgin farklılıklar gözlemlenmemiştir. Polisakkarit hidrojeller genellikle sert ve kırılğan yapıya sahiptir. Aynı zamanda hidrojel üzerine basma yükü uygulanması durumunda geri dönüşümsüz deformasyon meydana gelebilmektedir. Ancak kovalent fonksiyonelleştirme, sertliği azaltarak elastikliği artırır. Kovalent fonksiyonelleştirme, polimer yapısındaki değişikliklere duyarlı olan fiziksel çapraz bağların oluşumuna müdahale eder. Ancak bazı polimerlerde, fiziksel çapraz bağlanma yetenekleri korunarak her iki çapraz bağlanmanın bir ağ yapısında gerçekleştirilmesi sağlanabilir [26].

1.6.1.3.2. EDC-NHS Kimyası

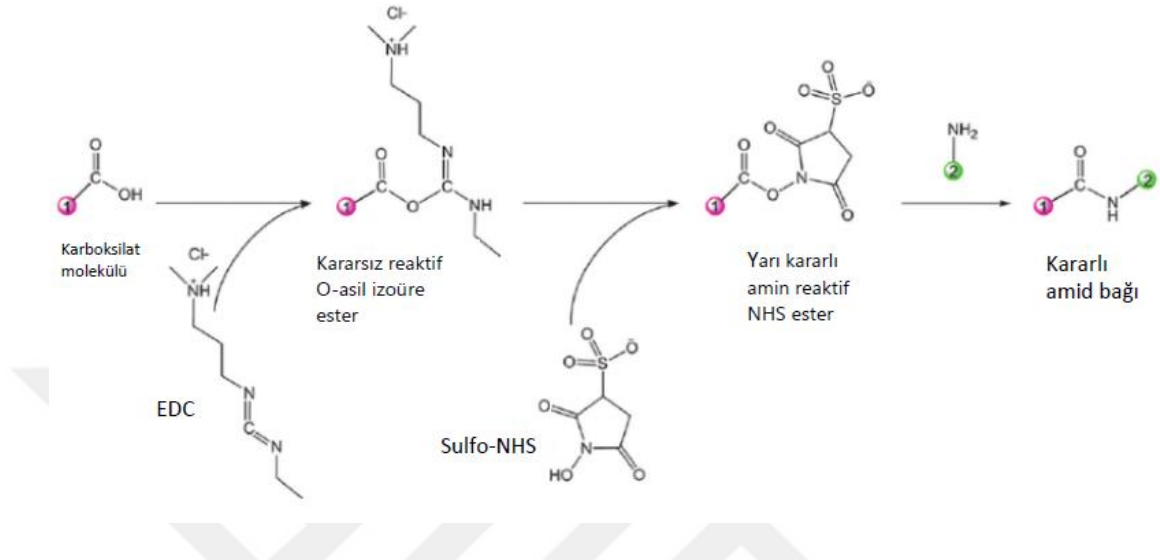
Daha önce de belirtildiği üzere doğal hidrojelers zayıf mekanik özellikler barındırmaktadır. 3B biyobaskı ile yük taşıyabilen sağlam yapıların elde edilebilmesi için bu hidrojelersin mekanik özelliklerinin kuvvetlendirilmesi gerekmektedir. Hidrojelersin hem mekanik özelliklerini artırmak hem de hızlı bozunmanın önüne geçmek için en yaygın kullanılan yöntem kimyasal çapraz bağlanmadır [41].

Kimyasal çapraz bağlanma yöntemleri arasında aldehitler, karbodiimidler, epoksi ve diizosiyanatlar gibi çapraz bağlanma ajanları kullanılabilir. Ancak bu ajanların birçoğu insanlar için toksik özellik taşımaktadır. Bu nedenle düşük toksisiteye sahip çapraz bağlanma ajanları çalışmalar için ilgi çekici konumdadır. Bu bölümde tez çalışması için de kullanılan organik ve biyokonjugat kimyasında köklü bir yere sahip çapraz bağlayıcı ajan olan EDC-NHS kimyası anlatılmaktadır.

EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid), amino bağlarının çapraz bağlanması için güvenli ve etkili bir yol sunan, suda çözünür, toksik olmayan ve biyouyumlu bir karbodiimiddir. Sıfır uzunlukta (nihai üründe orjinal reaktan bulunmayan) bir çapraz bağlama maddesi olan EDC, amin reaktif NHS esterlerinin oluşumu ile karboksil gruplarını birincil aminlere bağlar. NHS (N-hidroksisüksinimit) ise çapraz bağlanmanın etkinliği artırmak amaçlı kullanılan bir stabilizatördür [42].

Şekil 1.4.'de de görülen ve çapraz bağlanma ajanı olarak kullanılan EDC-NHS kimyasının mekanizması şu şekildedir. Çözeltiye eklenen EDC, karboksil grupları ile reaksiyona girerek O-asil izoüre (aktif ester) ara maddesini oluşturur. Ancak bu reaktif kompleksin amin grupları ile reaksiyona girmesi yavaş gerçekleşir ve sıvı çözelti içinde hidrolize uğrayabilir. Eğer hedeflenmiş amin grupları, hidroliz meydana gelmeden önce aktif karboksil gruplarına erişemezse istenen bağlanma gerçekleşemez. Bu durum özellikle protein moleküllerinde olduğu gibi, hedef molekül suya kıyasla düşük konsantrasyonda olduğu durumda problem oluşturur [43]. Bu nedenle reaksiyona NHS eklenir. Böylelikle karboksilik asit grupları amin reaktif NHS esterlerine dönüşür [44]. NHS eklemenin avantajı, aminle reaksiyona giren ara ürünün çözünürlüğünü ve kararlılığını artırmaktır [43]. Bu teknikle karboksil grupları içeren ve amin grupları içeren iki maddenin bağlanması sağlanabilir. EDC-NHS reaksiyonda katalizör görevi görürler ve reaksiyon sonrası diyaliz ile ortamdan uzaklaştırılabilirler. Bu yöntem kullanılarak

hidrojellerde bulunan polimerlerin fonksiyonelleştirilmesi sağlanır. Reaksiyon sonucunda, amin bağlı polimer zincirleri elde edilir.



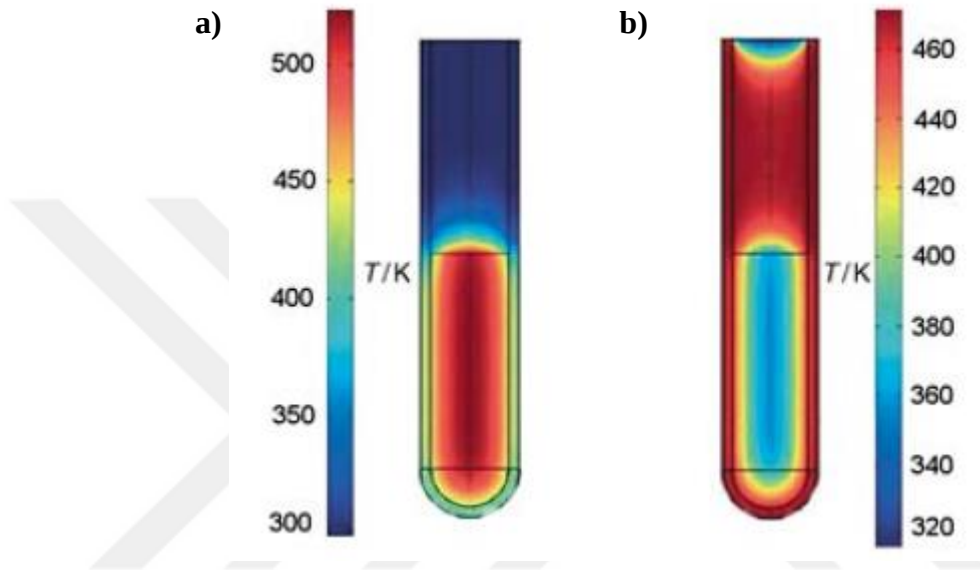
Şekil 1.4. EDC-NHS kimyası mekanizması: EDC, karboksilik asit grubuyla reaksiyona girerek bir amin reaktif O-asil izoüre ara ürünü oluşturur. Bu grup amin ile reaksiyona girerek, iki eşlenikli amid bağı oluşturur. Reaksiyona Sulfo-NHS ilavesi ile amin reaktif ara ürünü, amin reaktif sulfo NHS esterine dönüştürülerek kararlı hale getirilir. Böylelikle EDC aracılı konjugasyon reaksiyonlarının etkinliği artırılır [44].

1.6.1.3.2.1. Konvansiyonel Metakrilasyon

Doku mühendisliğinde son zamanlarda oldukça tercih edilen biyopolimerlerin kullanılmadan önce işlenmesi ve işlevsel hale getirilmesi gerekmektedir. Biyopolimerlerin fonksiyonelleştirilmesi için gerekli olan organik reaksiyonlar genellikle harici ısı kaynakları kullanılarak konvansiyonel termal yollarla gerçekleştirilir [45]. Reaksiyon için ısıtma iletken yollarla, örneğin bir yağ banyosunun kullanılması ile sağlanır. Sıcaklığın nüfuz etmesi gereken malzemeler çeşitli iletkenlik değerlerine sahip olduğu için, aynı zamanda ısıtma sonucu reaksiyon kabının sıcaklığının reaksiyon karışımından daha yüksek olmasından dolayı, konvansiyonel ısıtma nispeten yavaş ve verimsiz bir yöntemdir [46].

Konvansiyonel ısıtma yöntemine göre mikrodalga ısıması uygulanarak gerçekleştirilen reaksiyonlarda, çözücü, reaktif, katalizör gibi reaksiyon çözeltisinde yer alan moleküllerin mikrodalga enerjisi ile doğrudan bağlanması ile verimli bir internal ısıtma sağlanır. Mikrodalga enerjisi kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlarda borosilikat cam, kuartz, teflon gibi mikrodalga geçirgen malzemelerden oluşan reaksiyon kablari

kullanılarak, konvansiyonel ısıtma yöntemine göre ters bir sıcaklık gradyanı oluşur. Şekil 1.5.'de görüldüğü üzere, yağ banyosu kullanılarak konvansiyonel ısıtma ve mikrodalga enerjisi kullanılarak 1 dakikalık ısıtma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yağ banyosu ile ısıtmada reaksiyon kabı ile temas eden kısımlar önce ısınırken, mikrodalga enerjisi kullanılan sistemde tüm hacmin sıcaklığı aynı anda artmıştır [46].



Şekil 1.5. Sıcaklık profilleri. a) Mikrodalga enerjisi, b) yağ banyosu [46].

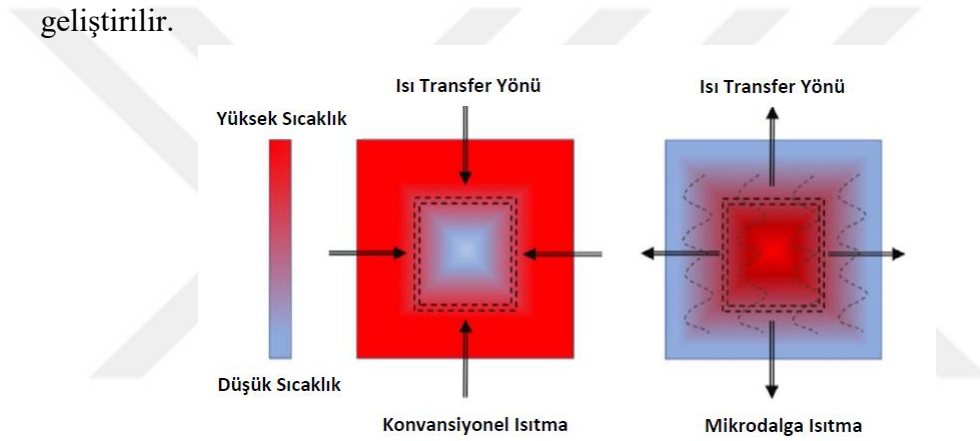
Yukarıda belirtilen dezavantajlarının yanı sıra, konvansiyonel ısıtma ile yapılan reaksiyonlarda, yan ürünlerin oluşması, homojen olmayan sıcaklık dağılımı, reaksiyonun tamamlanamaması gibi durumlar oluşabilmektedir. Ayrıca lokal ısınma substrat, ürün ve reaktiflerin ayrışmasına neden olur. Bu durum doku mühendisliği için en temel özelliklerden biri olan tekrarlanabilirliği etkiler [45].

1.6.1.3.2. Mikrodalga Destekli Metakrilasyon

Mikrodalga destekli metakrilasyon işlemi, konvansiyonel metakrilasyonun içerdiği dezavantajları ortadan kaldıracak potansiyele sahip yeni bir sentez yöntemidir [45]. Mikrodalga enerjisi, malzemeleri ısıtmak ve kurutmak için iyi bilinen bir yöntemdir. Mikrodalga, frekansı 300 MHz ile 300 GHz arasında değişen, dalga boyu 1 mm ile 1 m arasında olabilen elektromanyetik bir radyasyondur [47]. Mikrodalga ısıtma, mikrodalga enerjisinin belirli bir maddeye ait partiküller tarafından absorblanmasına ve elektromanyetik enerjiyi ısıya dönüştürme yeteneğinden kaynaklanır. Dipol momentli

moleküllerin mikrodalga enerjisini kolayca soğurması ile çok sayıda molekül rotasyonel olarak uyarılır. Bu uyarılan moleküller diğer moleküllere çarptığında, dönme enerjisi kinetik enerjiye dönüşerek ısınma meydana gelir [48]. Standart konvansiyonel termal ısıtma yerine bu alternatif yöntemde mikrodalga enerjisi kullanılarak çok çeşitli polimer sentezi/fonksiyonelleştirilmesi gerçekleştirilebilmektedir [49].

Şekil 1.6.'de görüldüğü üzere konvansiyonel ısıtma tekniğinde önce malzeme yüzeyi ısıtılıp, ısı daha sonra içe aktarılırken mikrodalga ile ısıtma, malzemenin elektromanyetik enerjiyi soğurup ısıya dönüştürmesi ile sağlanır. Bunun sonucunda malzemenin morfoloji ve fizikokimyasal özellikleri konvansiyonel ısıtma tekniğine göre önemli ölçüde geliştirilir.



Şekil 1.6. Konvansiyonel ısıtma ve mikrodalga ısıtma ısı transfer yönü [47].

Mikrodalga enerjisinin konvansiyonel ısıtmaya göre avantajları şu şekildedir; reaksiyonun konvansiyonel ısıtmaya göre çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesi sağlanır. Böylelikle düşük enerji tüketimi ve kısa işlem süresi ile enerji ve zamandan tasarruf sağlar. Temassız ısıtma sağlanarak, malzemenin lokal ısınma sonucu ayrışması önlenir ve malzemenin homojen bir şekilde ısınması sağlanır. Ayrıca kapalı kaplarda gerçekleştirilen reaksiyonlar için yüksek basınçlı sentezler kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Bu sayede düşük kaynama noktalı çözücülerin kullanımı kolaylaşır ve çevreye zarar vermeyen reaksiyonlar elde edilebilir [50]. Ek olarak mikrodalga enerjisi kimyasal çapraz reaksiyonunun verimliliğini artırabilir [48]. Mikrodalga ışıınının dipolar titreşimini uyarıp iyonik iletimi indükleyen dalga boyundan dolayı malzeme seçiciliği sağlanır, böylelikle oldukça spesifik bir ısıtma elde edilebilir [50]. Tüm bu özellikler, mikrodalga destekli hidrojel sentezini hem laboratuvar hem de endüstriyel uygulamalar için güçlü bir aday haline getirmektedir.

1.6.1.3.2.3. Metakrilatlanmış Hidrojeller

Bu bölümde 3B biyobaskı teknolojisi için kullanılmakta olan konvansiyonel ve mikrodalga destekli metakrilasyon ile sentezlenmiş olan hidrojeller anlatılmaktadır. Tablo 1.2.'de metakrilasyon ile sentezlenmiş hidrojellerin özelliklerine yer verilmiştir.

Tablo 1.2. Metakrilatlanmış hidrojeller

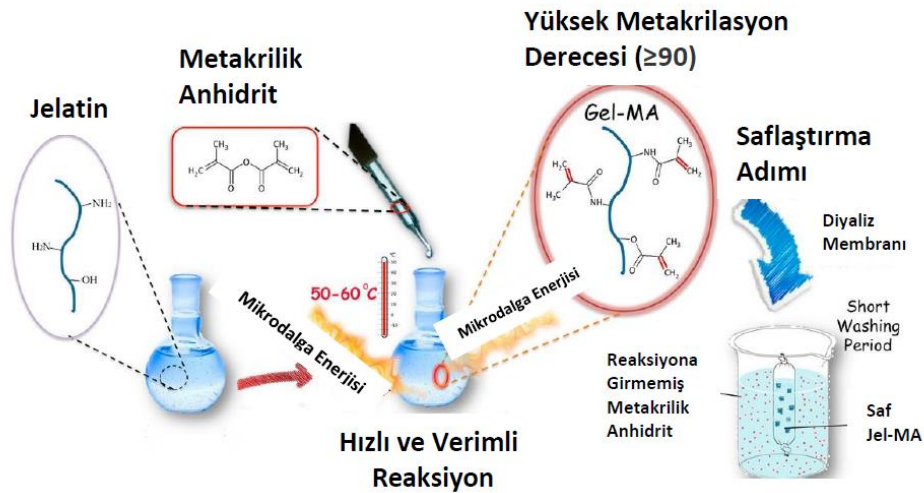
	Metakrilasyon Tekniği	Işık Uygulama Süresi	Metakrilat Kaynağı	Fotobaşlatıcı Konsantrasyonu (w/v)	Ref
Metakrilatlanmış Jelatin	Konvansiyonel	2-8 dakika UV	MA	%1	[51]
	Mikrodalga	40 saniye UV	MA	%0.1 %0.3 %0.5	[48]
Metakrilatlanmış Aljinat	Konvansiyonel	1 saat UV	AEMA	%10	[52]
	Konvansiyonel	1 saat UV	Glisidil metakrilat	%10	[52]
	Konvansiyonel	1 saat UV	MA	%10	[52]
Metakrilatlanmış Hyaluronik Asit	Konvansiyonel	10 dakika UV	MA	%0.1	[53]
Metakrilatlanmış Selüloz	Konvansiyonel	6 dakika UV	MA	%2	[54]
Metakrilatlanmış Kitosan	Konvansiyonel	2 dakika UV	MA	%0.5	[55]
	Mikrodalga	5 dakika görünür ışık	MA	%2	[45]
Metakrilatlanmış Karajenan	Konvansiyonel	40 saniye UV + iyonik çapraz bağlanma	MA	%0.25	[56]
	Mikrodalga	40 saniye UV	MA	%1	[57]

1.6.1.3.2.3.1. Metakrilatlanmış Jelatin

Kolajenin denatürasyonu ile elde edilen jelatin, biyouyumlu ve biyobozunur olmasının yanı sıra amino asit gruplarının varlığı ile fonksiyonelleştirmek için büyük bir kapasiteye sahiptir. 37 °C'nin altındaki sıcaklıklarda jelatin üçlü sarmal yapısı gereği fiziksel olarak jel formunda görünür. Ancak kovalent olmayan bu bağlar 37 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kolaylıkla kırılır ve fiziksel bağ ortadan kalkar. Jelatinin mekanik özelliklerini artırabilmek için çeşitli çapraz bağlama kimyasalları kullanılarak (gluteraldehit, genipin ve glioksal) kimyasal modifikasyonlar uygulanabilmektedir. Jelatinin vücut sıcaklığında kararlılığını sağlayabilmek için metakrilik anhidrit ile kimyasal modifikasyonu sağlanarak metakrilatlanmış jelatin (jel-MA) elde edilebilir. Ardından fotobaşlatıcı varlığında UV ışık uygulanması sonucu foto çapraz bağlanabilir [48].

Jelatinin hem konvansiyonel hem de mikrodalga enerjisi kullanılarak metakrilatlandığı çalışmalar bulunmaktadır. İlk defa üretilen jel-MA, konvansiyonel yöntem kullanılarak üretilmiştir [58]. Bu çalışmada, jelatine ait lizin ve hidroksilizin bağlarında yer alan birincil amin grupları ile metakrilat zincirleri 50 °C'de 1-3 saat aralığında reaksiyona girer. Ancak jel-MA üretimi sırasında konvansiyonel metakrilasyonun birtakım dezavantajları vardır. Teoride her bir metakrilik anhidrit molekülü, bir lizin grubu ile reaksiyona girmelidir. Ancak konvansiyonel metakrilasyon ile elde edilen jel-MA çalışmalarında %40-85 aralığında metakrilasyon derecesine ulaşabilmek için %10-30 aralığında metakrilik anhidrit kullanılmaktadır [48]. Bu yüksek orandaki metakrilik anhidrit miktarı hücreler için toksik etki oluşturmaktadır. Ayrıca bir başka çalışmada ise jelatinin jel-MA'ya dönüşmesi için jelatinde yer alan amin gruplarına göre 20-30 kat daha molar yükseklikte metakrilik anhidrit kullanıldığı bildirilmiştir [59]. Bu fazla metakrilik anhidrit kullanımı ve düşük verim nedeniyle metakrilatlanmamış grupların ortamdan uzaklaştırılması için 1-2 hafta gibi uzun saflaştırma sürelerine ihtiyaç duyulur. Konvansiyonel metakrilasyon ile üretilen jel-MA, doku mühendisliği uygulamaları için zayıf mekanik ve reolojik özellikler sergilemektedir. Bunlara ek olarak, jel-MA, sentezi gerçekleştiren kişiye göre UV ışık altında farklı jelleşme süresi, farklı mekanik özellikler ve farklı metakrilasyon derecesi gibi çeşitli karakteristik özellikler sergilemektedir.

Ancak mikrodalga destekli metakrilasyon sonucu elde edilen jel-MA için bu problemler ortadan kaldırılmıştır. Jel-MA'nın mikrodalga destekli metakrilasyon yoluyla ilk defa elde edildiği bir çalışmada (Şekil 1.7.), farklı mikrodalga enerjileri (100 W, 600 W, 800 W, 1000 W) ve farklı metakrilik anhidrit (%4, %8) oranları kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Metakrilasyon işlemi mikrodalga enerjisi sayesinde 5 dk gibi bir sürede tamamlanmıştır. Ayrıca çok düşük metakrilik anhidrit miktarı ile 1000 W mikrodalga enerjisi kullanılarak %90'dan daha fazla metakrilasyon derecesine ulaşılmıştır. Reaksiyona girmemiş metakrilik anhidrit için saflaştırma işlemi yüksek reaksiyon verimi sonucu 1 günde tamamlanmıştır. Ek olarak reolojik ve mekanik analizler sonucu mikrodalga destekli metakrilasyon sonucu elde edilen jel-MA'nın, konvansiyonel metakrilasyon ile elde edilen jel-MA'ya göre daha sert ve daha elastik hidrojeller olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada hücreler ile yapılan deneyler sonucunda metakrilik anhidrit konsantrasyonu ve mikrodalga enerjisinin gücünü değiştirerek, doku oluşumu gereksinimlerini karşılamak için jel-MA'nın fiziksel ve biyolojik özelliklerinin etkili bir şekilde kontrol edilebileceği sonucuna varılmıştır [48].



Şekil 1.7. Jel-MA'nın mikrodalga destekli metakrilasyon yöntemi ile sentezlenmesi: Jel-MA, Primer amin grupları içeren jelatin makromerlerin metakrilik anhidrit ile mikrodalga enerjisi altında reaksiyona girmesi sonucu yüksek verimli ve düşük saflaştırma süresi ile elde edilir [48].

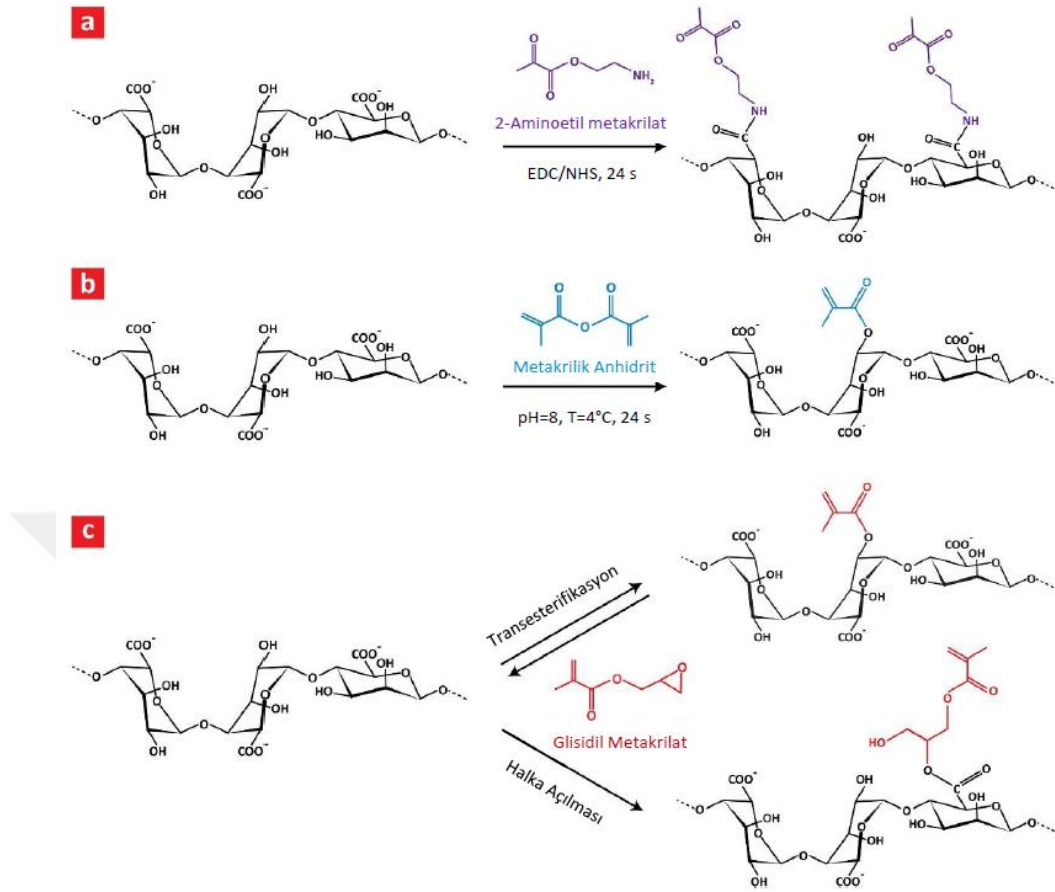
1.6.1.3.2.3.2. Metakrilatlanmış Aljinat

Metakrilatlanmış aljinat (ALMA) hidrojelleri, foto çapraz bağlanma özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu özelliği

sayesinde hücre yüklenebilmesi, aynı zamanda mekanik özellikler, gözenek boyutu ve bozunma hızı gibi fiziksel özellikleri üzerinde kontrol sağlanabilir. Aljinatın, mükemmel biyoyumluluğu ve divalent katyonların varlığında çapraz bağlanabildiği uzun zamandır bilinen özelliklerindendir. Ancak iyonik bağlar ile çapraz bağlanan aljinat hidrojelleri birçok dezavantaja sahiptir [60].

Aljinat hidrojelleri, karboksilik asit grupları ile Ca^{+2} gibi divalent katyonlar ile iyonik çapraz bağlar oluşturabilir. Fiziksel ve kimyasal özellikleri katyon konsantrasyonu ve maruziyet süresi değiştirilerek ayarlanabilir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda kullanılan Ca^{+2} hücreler üzerinde toksik etki oluşturur, düşük esneklik ve kırılgan yapısından dolayı kullanımı sınırlıdır. Ek olarak hücre göçü ve içe büyümesi için önemli parametreler olan iyonik çapraz bağlanmış aljinat hidrojelin şişmesi ve biyobozunurluk hızını kontrol etmesi kolay değildir [60]. Ayrıca fizyolojik çözeltilerde kalsiyum aljinatta yer alan kalsiyum iyonları, diğer iyonlar veya suda çözünebilir makromoleküller ile yer değiştirebilir. Bu durum ise kalsiyum iyonik çapraz bağlı hidrojellerin yapısı ve mekanik özelliklerini zayıflatır, 3B yapısını kaybetmesine neden olabilir ve biyomedikal uygulamalarda kullanımını engelleyebilmektedir [61]. Literatürde yapılan çalışmalarda ALMA hidrojel, biyomedikal uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. ALMA, Şekil 1.8.'de görüldüğü üzere karboksil ve hidroksil gruplarının metakrilat grupları ile kimyasal modifikasyonu sonucu sentezlenir. Ardından ALMA hidrojeline foto başlatıcı eklenmesi ve UV ışık uygulaması ile metakrilat gruplarının serbest radikal polimerizasyonu yoluyla oluşturulur [60].

Güncel olarak aljinatın metakrilat grupları fonksiyonelleştirilmesi için kullanılan en yaygın yöntem, aljinatın karboksil gruplarını EDC-NHS kimyası ile aktive edip, Şekil 1.8.a'da görüldüğü üzere 2-aminoetil metakrilat (AEMA) ile konjugasyonunu sağlama prensibine dayanmaktadır. Bu fonksiyonelleştirme tekniğinin avantajı, reaksiyona eklenen AEMA miktarının ayarlanması ile farklı derecelerde metakrilasyon elde edilebilmesidir. Böylelikle ALMA, farklı fiziksel ve mekanik özelliklerde sentezlenebilir. Metakrilasyon derecesi, metakrilat grupları ile değiştirilen aljinattaki karboksil gruplarının yüzdesine göre tanımlanır ve proton nükleer manyetik rezonans (^1H NMR) ile belirlenir. Ek olarak ALMA'nın mekanik ve fiziksel özellikleri, fotobaşlatıcı konsantrasyonu, UV ışık uygulanma süresi ve yoğunluğu, ALMA kütle/hacim oranları değiştirilerek ayarlanabilir [60].



Şekil 1.8. Farklı metodlar ile ALMA sentezi. a) 2-aminoetil metakrilat ile modifikasyon, b) metakrilik anhidrit ile modifikasyon, c) glisidil metakrilat ile modifikasyon [60].

Şekil 1.8.b'de görüldüğü üzere ALMA, aljinatın metakrilik anhidrit ile fonksiyonelleştirilmesi sonucu ile de elde edilebilir. Metakrilik anhidrit ile yapılan modifikasyon, metakrilat gruplarını çeşitli biyopolimerlere dahil etmek için kullanılan en yaygın, basit ve ucuz yöntemlerden biridir. Aljinat yapısında bulunan hidroksil grupları ile metakrilik anhidritte bulunan metakriloil grupları ile doğrudan bağlanması ile ALMA elde edilir. Reaksiyona eklenen metakrilik anhidrit miktarına göre farklı metakrilasyon dereceleri elde edilebilir. Ayrıca pH, reaksiyon sıcaklığı ve diğer reaksiyon koşulları metakrilasyon derecesi üzerinde etkiye sahiptir. Ancak metakrilik anhidrit kullanılarak sentezlenen ALMA'nın metakrilasyon derecesi ve mekanik özelliklerinin, 2-aminoetil metakrilat kullanılarak sentezlenen ALMA'ya göre daha düşük olduğu görülmüştür [60].

Aljinatta yer alan hidroksil veya karboksil gruplarının, glisidil metakrilat veya metakriloil klorür ile reaksiyona sokulması sonucu da ALMA elde edilebilmektedir. Şekil 1.8.c'de

görüldüğü üzere aljinatın, glisidil metakrilasyon ile reaksiyona sokulması transesterifikasyon veya halka açılma mekanizmaları ile gerçekleştirilebilir. Transesterifikasyon, aljinatın hidroksil grupları ile gerçekleşirken, halka açılma reaksiyonu karboksil grupları ile sağlanır. Her iki reaksiyon mekanizması da pH, reaksiyon süresi ve solventin kimyasal yapısına bağlıdır. Tipik olarak reaksiyon süresinin kısa tutulması ve alkali bir ortamda gerçekleştirilmesi sonucu, ALMA transesterifikasyon mekanizması üzerinden elde edilirken, reaksiyon süresinin uzun tutulması ve asidik ortamda gerçekleşmesi sonucu epoksi halka açılma reaksiyonu baskın gelmektedir. Glisidil metakrilat kullanılarak sentezlenmiş ALMA hidrojel üzerine çalışmalar yapılmış olsa da henüz reaksiyon mekanizmaları ve ALMA üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak araştırılmamıştır [60].

1.6.1.3.2.3.3. Metakrilatlanmış Hyaluronik Asit

Hyaluronik asit ile hidrojel elde edilebilse de biyobozunmanın bir belirleyicisi olan polimer zincirler arasındaki çapraz bağlanma seyrek olarak gerçekleşir. Bu durumdan dolayı hyaluronik asit oda sıcaklığında oldukça çözünür hale gelir ve 3B biyobaskı ile yapı iskelesi olarak basılması durumunda bütünlüğü bozulabilir. Yapı iskelesinin kan ile 2-5 dakika temasından itibaren, iskelenin yarı ömrü 0.5-3 gün arasındadır. Bu nedenle hyaluronik asitin fonksiyonel yan gruplarının metakrilasyon tekniği de dahil olmak üzere çeşitli kovalent bağlar ile modifikasyonu sağlanır [27].

Bir çalışmada metakrilatlanmış hyaluronik asitin (MeHA) 3B biyobaskı özellikleri incelenmiştir. Hyaluronik asit, yapısında hidroksil, karboksil ve amin gruplarını içerdiği için modifikasyona elverişlidir. MeHA sentezi, hyaluronik asit çözeltisinin hazırlanmasının ardından metakrilik anhidritin çözeltiye eklenmesi ve reaksiyonun gece boyu gerçekleşmesi sonucu konvansiyonel metakrilasyon ile elde edilmiştir. Irgacure 2959 fotobaşlatıcı kullanılarak UV ışık altında çapraz bağlanma ile MeHA hidrojelleri elde edilebilmiştir. İyi bir biyouyumluluğa sahip MeHA hidrojelinin, hyaluronik asit hidrojellerine göre daha sert ve bozunmaya karşı dirençli olduğu görülmüştür. Metakrilasyon, 3B biyobaskısı sağlanan hidrojellerin UV ışık kullanılarak çapraz bağlanması ile 3B yapı iskelesini korumasını sağlamıştır. MeHA hidrojelinde bulunan mezenkimal stromal hücrelerin farklılaşması gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre kemik doku mühendisliğinde 3B biyobaskısı yapılmış MeHA yapı iskeleleri umut verici görülmektedir [53].

1.6.1.3.2.3.4. Metakrilatlanmış Selüloz

Karboksi metil selüloz (CMC), gıda uygulamalarından boyalara kadar geniş bir yelpazede kullanımı olan, suda çözünebilir selüloz eteridir. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı ve biyoyoumlu olmasından dolayı rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamaları için ilgi çekici bir doğal polimerdir. Ayrıca ECM bileşeninde bulunan glikozaminoglikan bileşenine benzerliğinden dolayı biyomimik özelliğine sahiptir. CMC, ekstrüzyon 3B biyobaskı teknolojisinde baskı yapılabilir iyi bir aday malzeme olarak görülmektedir ancak yapılan bir çalışmada CMC'nin ışıkla foto çapraz bağlanabilirliği ve 3B biyobaskı sisteminde kullanılabilirliği araştırılmıştır [54]. CMC'nin foto çapraz bağlanabilir hidrojel formuna dönüştürülmesi için metakrilasyon tekniği kullanılarak fonksiyonelleştirilmesi sağlanmıştır. Metakrilasyon işlemi, CMC çözeltisi 50 °C'de hazırlanıp NaOH ile uygun pH değerine (pH=8) ulaşılmıştır. Çözelti 0 °C'ye soğutulduktan sonra, metakrilik anhidrit damla damla çözeltiye eklenerek 24 saat boyunca reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Reaksiyona girmemiş metakrilik asit ve metakrilik anhidritin ortamdan uzaklaştırılması için çözelti önce etanol ile yıkanmış ardından 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonunda liyofilize edilerek kurutulmuş ve metakrilatlanmış karboksi metil selüloz (M-CMC) elde edilmiştir.

Lityum fenil-2,4,6-trimetilbenzoil fosfinat (LAP) fotobaşlatıcı kullanılarak foto çapraz bağlanması sağlanan M-CMC'nin mekanik özellikleri, şişme kapasitesi ve sitotoksitesi incelenmiştir. 3B biyobaskısı sağlanmış M-CMC hidrojellerin sulu ortamda, başlangıç ağırlıklarının %650'sine kadar suyu absorbladığı görülmüştür. LAP fotobaşlatıcının ve reaksiyona girmemiş polimer zincirlerinin 24 saat içinde salınması ile NIH/3T3 hücre canlılığı araştırılmış ve hiçbir sitotoksik olay gözlemlenmemiştir. Mekanik ve şişme özellikleri bakımında M-CMC hidrojellerin, 3B biyobaskı için umut verici özellikler sergilediği sonucuna varılmıştır [54].

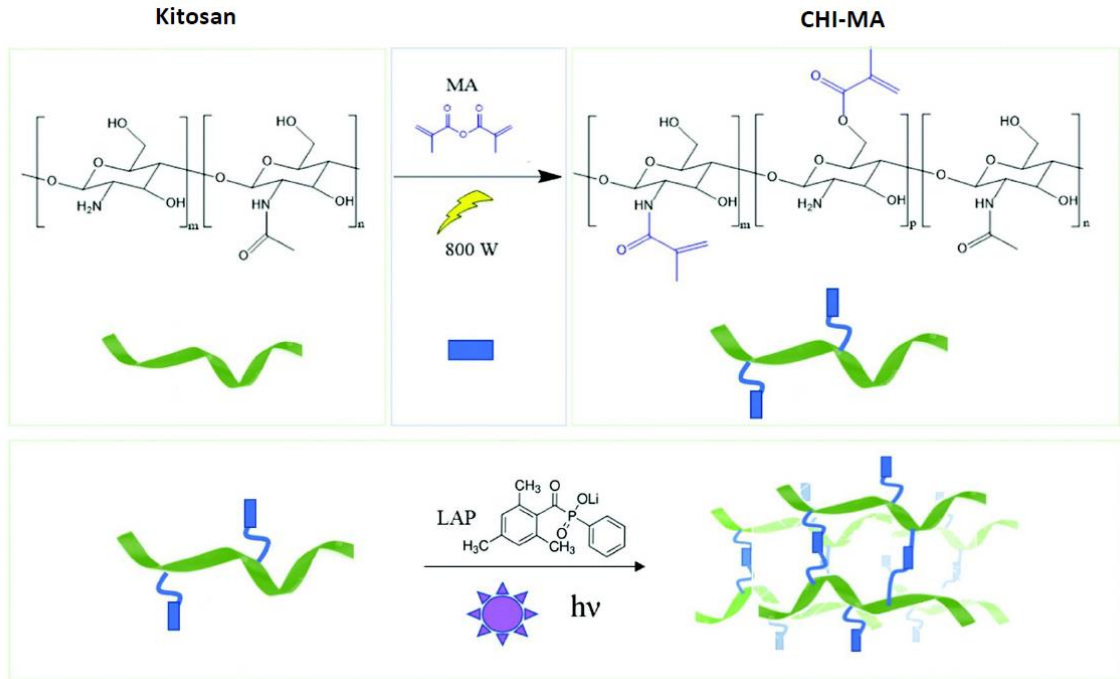
1.6.1.3.2.3.5. Metakrilatlanmış Kitosan

Doğal bir hidrojel olan ve polisakkaritlerden oluşan kitosan, doku mühendisliği uygulamaları için umut verici bir malzemedir. Ancak mekanik özelliklerinin zayıf olmasından dolayı özellikle sert doku mühendisliği uygulamaları sınırlı ve modifikasyona ihtiyacı vardır [1]. Kitosanın yapısında bulunan amino grupları, birincil ve ikincil hidroksil grupları sayesinde, kitosanı fonksiyonelleştirmek mümkündür [45].

Yapılan bir çalışmada kitosan, mikrodalga destekli metakrilasyon tekniği kullanılarak metakrilatlanmıştır. Konvansiyonel metakrilasyonun getirmiş olduğu yavaş ve kontrolü zor olan reaksiyon, homojen olmayan sıcaklık dağılımı, tamamlanmayan reaksiyon, yan ürünlerin oluşması ve doku mühendisliğinde önemli konuma sahip olan tekrarlanabilirlik özelliğine sahip olmaması gibi çeşitli dezavantajlardan dolayı mikrodalga destekli metakrilasyon tercih edilmiştir.

Metakrilasyon işlemi Şekil 1.9.'da görüldüğü üzere şu şekilde gerçekleştirilmiştir; ilk olarak kitosan asetik asit ve su çözeltisi içerisinde gece boyu çözündürülmüştür. Ardından çözeltiye metakrilik anhidrit eklenmiştir. Kitosanda yer alan aminoglukoz ile metakrilik anhidrit oranı 1:1 ve 1:6 olacak şekilde düzenlenmiştir. Çözelti mikrodalga sistemine yerleştirildikten sonra 800 W maksimum enerji uygulanmıştır. Farklı aminoglukoz/metakrilik anhidrit oranına ek olarak, reaksiyonun sıcaklığı, zamanı, çözeltinin reaksiyon sıcaklığından oda sıcaklığına düşene kadar geçen zaman gibi parametreler de araştırılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra diyaliz işlemi ardında, liyofiiize edilerek kurutulmuş ve metakrilatlanmış kitosan (CHI-MA) elde edilmiştir. Ardından kurutulmuş CHI-MA çözündürülüp LAP fotobaşlatıcı varlığında foto çapraz bağlanarak CHI-MA hidrojenleri elde edilmiştir.

Çalışma sonucunda mikrodalga destekli metakrilasyon tekniğiyle hidrojel üretiminin kimyasal reaksiyon süresini ciddi şekilde azalttığı ve birkaç dakikada reaksiyonun tamamlanmıştır. Ayrıca reaksiyon parametrelerinin optimize edilmesi ile yüksek metakrilasyon derecelerine ulaşılabileceği ve hidrojin mekanik özellikleri üzerinde kontrol sağlanabilmiştir. Aminoglukoz/metakrilik anhidrit oranının 1:1 şeklinde kullanılması sayesinde toksik reaktiflerin kullanımı azaltılmıştır. 3B biyobaskı ile basımı gerçekleştirilen CHI-MA'nın mikro porlu yapısı sayesinde hücre göçü ve penetrasyonuna izin vererek uzun süreli hücre büyümesine elverişli olduğu görülmüştür. Böylelikle biyoyumlu özelliklere sahip, konvansiyonel yöntemlerden sıyrılan CHI- MA'nın doku mühendisliği uygulamaları için gelecek vaad ettiği sonucuna varılmıştır [45].



Şekil 1.9. CHI-MA'nın mikrodalga destekli metakrilasyon yöntemi ile sentezlenmesi [45]. Metakrilik anhidrit kullanılarak 800 W mikrodalga enerjisi altında metakrilatlanan kitosan, LAP fotobaşlatıcı varlığında çapraz bağlanarak CHI-MA hidrojel elde edilmiştir.

1.6.1.3.2.3.6. Metakrilatlanmış Karajenan

Her bir disakkaritte yer alan sülfat grubuna göre kappa(κ -1 sülfat grubu), iyota (ι -2 sülfat grubu) ve lambda (λ -3 sülfat grubu) olacak şekilde 3 gruba ayrılan karajenan, bu sülfat gruplarının hücrelerin adhezyonu, proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu için 3B biyobaskı teknolojisinde tercih edilmektedir. Ayrıca yapısında bulunan negatif yüklü karboksil grupları ile birlikte sülfat gruplarının inflamasyonu azalttığı bilinmektedir. Kappa karajenan (κ -Car), jelleşme özellikleri, mekanik dayanıklılığı ve ECM yapısına benzerliğinden dolayı doku mühendisliği uygulamaları için potansiyel bir adaydır. Ancak potasyum iyonları ile iyonik olarak çapraz bağlanan kappa karajenan, zayıf ve kırılğan yapıya sahiptir. Fiziksel koşullar altında mekanik bütünlüklerini yitirirler [57]. Bu nedenle kappa karajenanın hem konvansiyonel hem de mikrodalga destekli metakrilasyon çalışmaları mevcuttur.

Literatürde yer alan bir çalışmada metakrilik anhidrit kullanılarak konvansiyonel yöntem ile metakrilatlanmış kappa karajenan (κ -Car-MA) elde edilmiştir [56]. Ancak

konvansiyonel teknikte birçok problemle karşılaşmıştır. %12 (v/v) değerinde fazla miktarda metakrilik anhidrit kullanılmasına rağmen %37 değerinde düşük metakrilasyon derecesine ulaşılmıştır. Ayrıca bu kimyasal çapraz bağlanmaya ek olarak, KCl ile iyonik çapraz bağlanma reaksiyonu da gerçekleştirilmiştir. Bunun nedeni ise metakrilatlama sonrası uygulanan UV ışık ile düşük metakrilasyon derecesinden dolayı yeterli foto çapraz bağlanmanın elde edilememesi ve stabil bir hidrojele ulaşılamamasıdır. Ayrıca κ -Car-MA'nın mekanik ve bozunma özellikleri, doku mühendisliği uygulamalarında uzun süreli kullanımına elverişli değildir. Mekanik mukavemeti artırabilmek için κ -Car-MA yapısına dopamin, nanosilikat ve aljinat gibi çeşitli biyomalzemeler eklenebilmektedir [57].

Yukarıda belirtilen dezavantajlardan dolayı, bir başka çalışmada κ -Car-MA hidrojelini mikrodalga destekli metakrilasyon tekniğiyle üretilmiştir. Sadece kimyasal çapraz bağlanma kullanılarak ilk defa κ -Car-MA elde edilen çalışmada, hem konvansiyonel hem de mikrodalga destekli teknikler karşılaştırılmıştır. Metakrilasyon derecesi konvansiyonel teknikle %25 iken, mikrodalga destekli metakrilasyon sayesinde bu değer %85'e çıkarılmıştır. Ayrıca 6 saatlik reaksiyon süresi de 5 dakikaya düşürülmüştür. Ekstrüzyon 3B biyobaskı sistemi ile başarılı bir biyobaskı gerçekleştirilmiş, UV ışık uygulaması ile stabil κ -Car-MA hidrojelleri elde edilmiştir. Ek olarak hücre canlılığı ve yoğunluğu, mikrodalga destekli metakrilasyon ile elde edilen hidrojellerde konvansiyonel metakrilasyon ile elde edilen hidrojellere göre daha yüksek olduğu, böylelikle kıkırdak doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir biyomürekkep olduğu sonucuna varılmıştır [57].

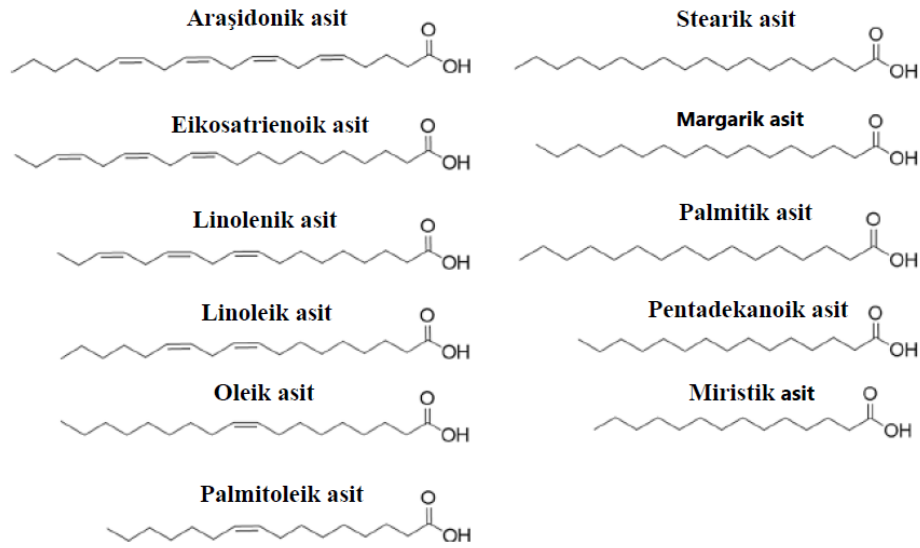
1.7. Chia Tohumu Müsilajı

Salvia hispanica L. olarak da bilinen chia, Meksika ve Guatemala'ya özgü, nane grubuna ait bir bitkidir [62]. Şekil 1.10.'da görüldüğü üzere chia siyah, bej ve kahverengi renklerde eliptik veya oval şekilde tohumlara sahiptir [63]. Chia tohumlarının uzunluğu 1.8-2.5 mm arasında, genişliği ise 1.5-2 mm arasında değişmektedir. Ketan tohumlarından daha küçük olup susama benzer boyutlardadır [64]. Aztek ve Maya uygarlıklarında temel gıda maddesi olarak kullanılan chia, aynı zamanda diz ve ayak yaralanmalarında ağrıların giderilmesinde de kullanılırdı [62]. Günümüzde ise zengin içeriğinden dolayı süper besin olarak da bilinen potansiyel bir besin kaynağı olan chia tohumunun popüleritesi artmakta ve gıda takviyesi olarak tüketilebilmektedir [63].



Şekil 1.10. Chia tohumları [63].

Chia tohumlarının kimyasal içeriği oldukça zengindir. %16-26 oranında protein, %30-34 oranında yağ, %34'ü besinsel liflerden oluşmak üzere yaklaşık %42 karbonhidrat içermektedir [62]. Aynı zamanda kalsiyum, fosfor, magnezyum, potasyum, demir ve çinko gibi mükemmel bir mineral kaynağıdır [65]. Chia tohumları, diğer tohum türlerine kıyasla %60'ı alfa linolenik olmak üzere daha yüksek oranda yağ asiti içeriğine sahiptir. Ayrıca Şekil 1.11.'de görüldüğü üzere linoleik, oleik, palmitik asit gibi birçok yağ asitini de içeriğinde barındırmaktadır. Ek olarak omega 3 ve omega 6 asitlerini de içermektedir [66]. Chia tohumları buğday, mısır, pirinç, yulaf gibi diğer tahıllara kıyasla nispeten yüksek düzeyde protein içerir. Büyük çoğunluğunu arginin, lösin, fenilalanin, valin ve lizinin oluşturduğu aminoasit içeriği Tablo 1.3.'de verilmiştir [67, 68]. Bunlara ek olarak çalışmalar sonucunda chia tohumunda B1, B2 ve Niasin gibi çeşitli vitaminlerin bulunduğu doğrulanmıştır. Ayrıca chia tohumları bitkisel kaynaklı, yüksek biyolojik aktivite gösteren fito bileşikler olarak da adlandırılan gruplar açısından zengin bir kaynağa sahiptir. Bunlar, gallik, kafeik, klorojenik, sinnamik ve ferulik asit ve kuersetin, kaempferol gibi polifenollerdir [67]. Chia tohumunun bir diğer faydası ise yüksek lif oranına sahip olmasıdır [62].

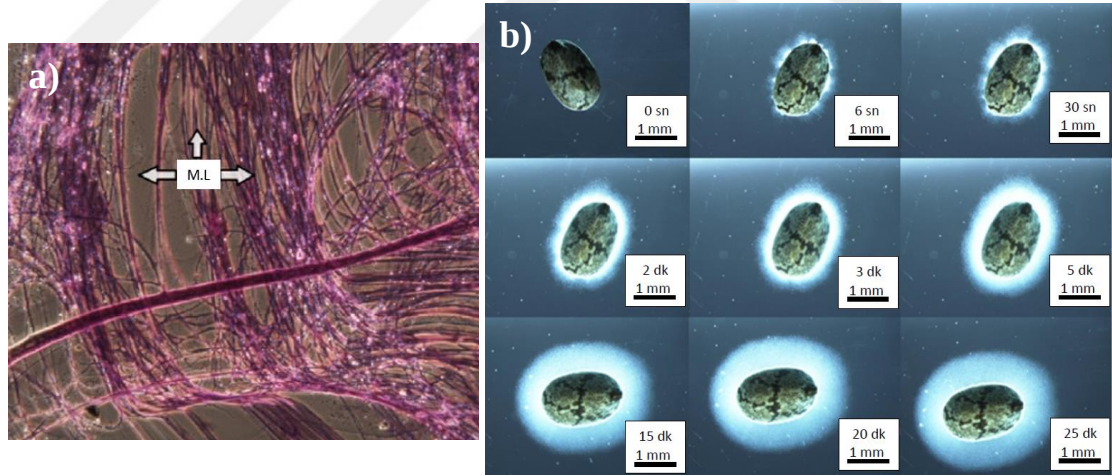


Şekil 1.11. Chia tohumlarından elde edilen yağ asitlerinin kimyasal yapıları [66].

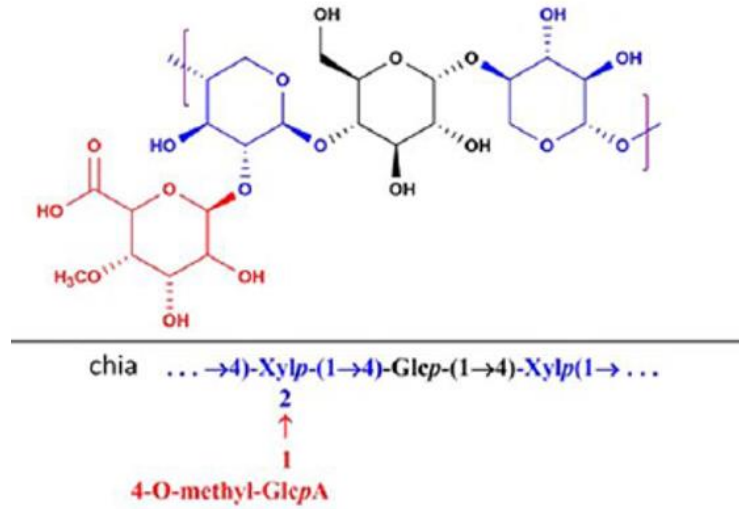
Tablo 1.3. Chia tohumlarının amino asit içeriği.

Amino Asit	İçerik (g/100g)	
Esansiyel Amino Asitler		
	[67]	[68]
Arginin	2.14	2.00
Histidin	0.53	0.61
İzolösin	0.80	0.74
Lösin	1.37	1.42
Lizin	0.97	0.93
Metiyonin	0.59	0.67
Fenilalanin	1.02	1.6
Treonin	0.71	0.54
Triptofan	0.44	-
Valin	0.95	0.79
Esansiyel Olmayan Amino Asitler		
Sistin	0.41	0.42
Tirozin	0.56	0.61
Alanin	1.04	0.94
Aspartik asit	1.69	1.28
Glutamik asit	3.50	2.87
Glisin	0.94	0.91
Prolin	0.78	1.28
Serin	1.05	0.94

Chia tohumları su ile temasa geçtikleri durumda müsilağ salgınımı yapabilme özelliğine sahiptir. Müsilağ, tohumların kabuğunun ilk üç tabakasında bulunur ve bu kabuk $13 \pm 0.41 \mu\text{m}$ kalınlığa sahiptir. Tohum kabuğunun dış kısmında yer alan diyet lifi olarak da bilinen müsilağ, tohumun kuru ağırlığının %5 ile 6'sını oluşturur [63]. Şekil 1.12.a'da görüldüğü üzere chia tohumu su ile temasa geçip tamamen hidratlandığında müsilağ lifleri görünür hale gelir ve bu lifler özellikle polisakkaritler (%71.22) açısından oldukça zengindir [69]. Chia tohumları çok yüksek su tutma (hidrasyon) kapasitesine sahiptir. Chia tohumları kendi ağırlığının 27 katı su absorblayarak müsilağ salgınımı gerçekleştirebilirler [63]. Salgılanan müsilağ, 800 ile 2000 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip anyonik bir heteropolisakkarittir [70]. Ksiloglukon olarak da bilinen bu yapı, 1:2:1 oranında ksiloz, glikoz ve metil glukoronik asit içeriğine sahiptir (Şekil 1.12.) [71]. Mükemmel su tutma kabiliyetinden dolayı çözünebilir bir lif gibi davranabilir. Hidrasyona izin veren bu özellik biyomedikal uygulamalar için malzemelerin geliştirilmesinde önemli role sahiptir. Ayrıca ksilogukan, mutajenik ve toksik olmaması, kanla teması halinde tahriş etmemesi gibi özellikleri ile de ön plana çıkmaktadır [70].



Şekil 1.12. Chia müsilağı. a) M.L: müsilağ lifleri, b) tohumlarının zamana göre müsilağ salgılaması [64].



Şekil 1.13. Chia müsilajının kimyasal yapısı. Xylp: ksilopiranozil; Glep: glukopiranosil; GlepA: glukopiranosiluronik asit [71, 72].

Chia müsilajının daha önce metakrilasyonu gerçekleştirilmemiştir. Bu tez çalışmasında hem konvansiyonel hem de mikrodalga destekli metakrilasyon teknikleri kullanılarak ilk defa chia müsilajının metakrilasyonu sağlanmış ve chiaMA hidrojelleri elde edilmiştir.

2.BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışmasında öncelikle chia tohumlarından müsilaj elde edilmiştir. Ardından chia müsilajının hem konvansiyonel hem de mikrodalga destekli metakrilasyon yöntemleri kullanılarak metakrilasyonu sağlanmış ve metakrilatlanmış chia müsilajından foto çapraz bağlanmış hidrojeller elde edilmiştir. Bir sonraki adımda ise metakrilatlanmış chia müsilajının karakterizasyon çalışmaları ve 3B biyobaskı sağlanmıştır. Tezin bu bölümünde yukarıda belirtilen deneysel çalışmalar için kullanılan yöntemler ve adımlar açıklanmıştır.

2.1. Kullanılan Malzemeler

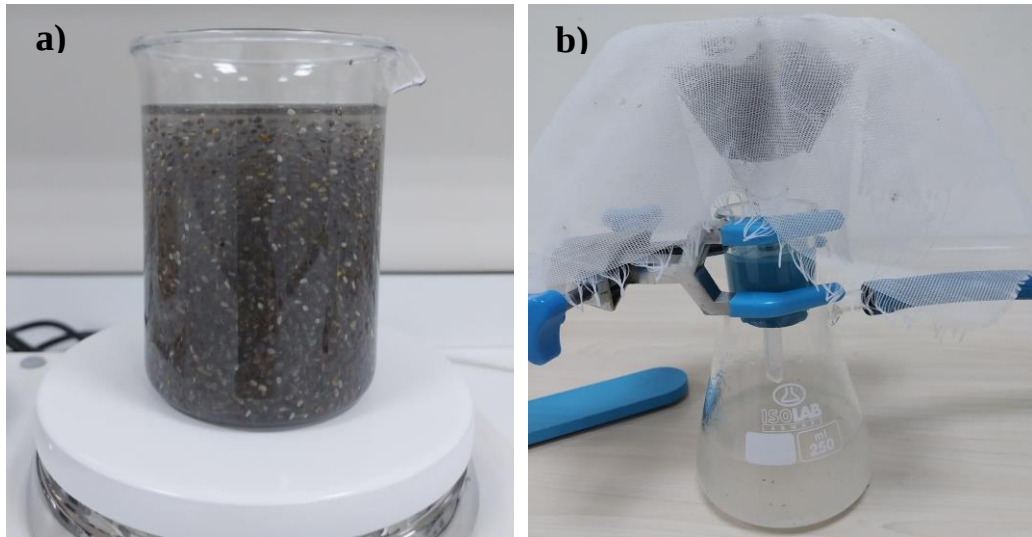
Hidrojellerin üretimi için kullanılan kimyasallar ve satın alındığı firmalar aşağıda belirtilmiştir.

Hidrojellerin temel maddesi olan chia müsilajı, Yayla (Türkiye) firmasına ait chia tohumlarından elde edilmiştir. Chia müsilajının homojen olarak çözündürüldüğü tablet fosfat tamponu (PBS, pH=7.4) Bioshop Kanada (ABD) firmasından satın alınmıştır. Chia müsilajının metakrilatlanması için biyokonjugasyon ajanı olarak kullanılan N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etil karbodiimid hidroklorür (EDC), N-hidroksi süksinimit (NHS), chia müsilajının metakrilasyonu için kullanılan 2-aminoetil metakrilat hidroklorid (AEMA) ve hidrojellerin çapraz bağlanabilmesi için kullanılan lityum fenil-2,4,6-trimetilbenzoil fosfinat (LAP) fotobaşlatıcı Sigma Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Reaksiyona girmemiş AEMA'yı ortamdan uzaklaştırmak için kullanılan diyaliz membranı Sigma Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

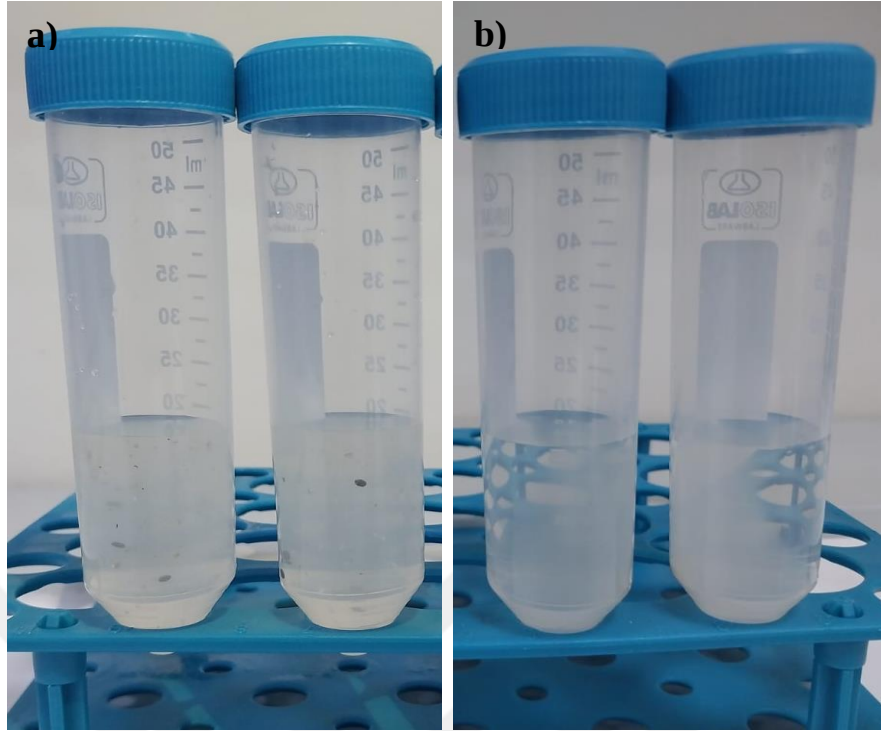
2.2. Yöntem

2.2.1. Chia Tohumu Müsilajının Üretilmesi

İlk olarak 13.3 g chia tohumu tartılarak 250 mL distile su içerisinde 2-3 saat aralığında, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Belirtilen süre sonunda chia tohumlarından müsilaj salınımı gerçekleşmiştir. Chia müsilajını tohumlardan ayırabilmek için chia tohum ve müsilaj karışımı (Şekil 2.1.a) vakum sistemine aktarılmıştır. Vakum sistemi (Şekil 2.1.b) bir huni, cam filtrasyon şişe, tohumları müsilajdan ayırabilmek için huni üzerine yerleştirilen gözenekli bir tül ve vakum pompasından oluşmaktadır. Tohum ve müsilaj karışımı tül üzerine döküldükten sonra vakum uygulanmıştır (300 mbar). Gözenek çapı chia tohumlarından daha küçük olan tül sayesinde vakum, müsilajı aşağı çekerken, chia tohumları tül üzerinde kalarak tohum ve müsilajın birbirinde ayrılması sağlanmıştır. Müsilaj içerisinde ufak tohum parçaları karışmış olabildiği için, vakumla ayrılan müsilaj falkon tüplere alınmış (Şekil 2.2.a) ve 8000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası (Şekil 2.2.b) yüzeyde kalan tohum parçaları ve fazla su, pastör pipeti yardımı ile müsilajdan ayrılmıştır. Sonuçta çekirdeklerden arındırılmış chia müsilajı (Şekil 2.3.a) elde edilmiştir. Ardından chia müsilajı liyofilizatör (Teknosem, Türkiye) cihazına yerleştirilerek 1 hafta boyunca dondurarak kurutulmuştur (Şekil 2.3.b).



Şekil 2.1. Chia tohumundan müsilaj eldesi. a) Chia tohum ve müsilaj karışımı, b) chia müsilajının tohumlardan vakum uygulanarak ayrılması.



Şekil 2.2 Chia müsilajının santrifüjlenmesi. a) Santrifüj öncesi chia müsilajı, b) santrifüj sonrası chia müsilajı.



Şekil 2.3 Chia müsilajının kuru formda eldesi. a) Çekirdeklerinden arındırılmış chia müsilajı, b) chia müsilajının liyofilizatör cihazı ile kurutulması.

2.2.2. Chia Tohumu Müsilajının Metakrilatlanması

Chia müsilajının ilk olarak metakrilik anhidrit kullanılarak mikrodalga destekli metakrilasyonu denenmiştir. Metakrilasyonun ardından LAP fotobaşlatıcı kullanılarak UV uygulaması yapılmıştır. Ancak fotoçapraz bağlanma elde edilememiş, hidrojel yapı gözlemlenememiştir. Bu nedenle metakrilik anhidrit ile yapılan çalışmaya yer verilmemiştir.

Metakrilatlanmış chia müsilajı (chiaMA) hem konvansiyonel hem de mikrodalga destekli metakrilasyon teknikleri ile AEMA kullanılarak ilk defa sentezlenmiştir. chiaMA sentezi için EDC-NHS kimyasından faydalanılmıştır. Chia müsilajında yer alan karboksil ve hidroksil grupları EDC-NHS kimyası aracılığı ile AEMA'da yer alan amin gruplarına bağlanması sağlanmıştır.

Konvansiyonel metakrilasyon tekniği kullanılarak sentezlenen chiaMA için şu adımlar izlenmiştir; öncelikle 100 mg kurutulmuş chia müsilajı, 10 mL PBS (pH=7.4) içerisinde ~1 saat boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen bir şekilde çözündürülmüştür. Ardından çözelti içerisine 176 mg EDC eklenerek 15 dakika boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra çözeltiye 53 mg NHS eklenerek 15 dakika boyunca onun da karışması sağlanmıştır. EDC-NHS içeren çözeltiye son olarak 80 mg AEMA eklenerek oda sıcaklığında 1 gün boyunca karıştırılıp reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon, çözeltinin içinde bulunduğu reaksiyon kabı alüminyum folyo ile kaplanarak karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Ardından çözelti 12-14 kDa diyaliz membranına alınarak 3 gün boyunca 37 °C'de diyaliz edilmiştir. Günde bir diyalize ait distile su yenilenmiştir. Bu işlemin sonunda çözelti liyofilizatör sisteminde 5 gün boyunca kurutulması sağlanmış ve konvansiyonel metakrilatlanmış chia müsilajı elde edilmiştir.

Mikrodalga destekli metakrilasyon tekniği kullanılarak sentezlenen chiaMA için şu adımlar izlenmiştir; öncelikle 100 mg kurutulmuş chia müsilajı, 8 mL PBS içerisinde ~1 saat boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen bir şekilde çözündürülmüştür. Aynı zamanda 80 mg AEMA, 2 mL PBS içerisinde ~1 saat boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen bir şekilde çözündürülmüştür. Çözünen chia müsilajına ilk olarak 176 mg EDC eklenmiş ve 15 dakika karıştırılmıştır. EDC'nin çözünmesinin ardından 53 mg NHS çözeltiye eklenerek 15 dakika karıştırılmıştır. Homojen bir şekilde elde edilen

chia müsilajı/EDC/NHS çözeltisine, çözünen AEMA eklenmiştir ve bekletilmeden mikrodalga sistemine yerleştirilmiştir. Mikrodalga sistemi (Milestone, İtalya), çözeltinin maksimum sıcaklığı 50 °C olacak şekilde ayarlanılmıştır. Mikrodalga sisteminde 3 farklı güç (100 W, 250 W, 500 W) tercih edilmiştir. 100 W mikrodalga uygulamasında 30 saniye mikrodalga enerjisi verilip ardından yaklaşık 3 dakika buz içerisinde çözelti soğutulmuştur. Mikrodalga uygulaması ve soğutma döngüsü 12 defa uygulanarak çözeltiye toplam 6 dakika (30 sn x 12) mikrodalga uygulanmış ve reaksiyon tamamlanmıştır. 250 W mikrodalga uygulamasında ilk olarak 20 saniye mikrodalga enerjisi uygulanıp yaklaşık 2 dakika soğutulmuştur. Bu döngü 10 defa gerçekleştirilmiştir. Ardından mikrodalga enerjisi 30 saniye uygulanıp, çözelti soğutularak bu işlem 5 defa uygulanmıştır. Toplamda 6 dakika (20 sn x 10 + 30 sn x 5) mikrodalga uygulaması sonucu reaksiyon sonlandırılmıştır. 500 W mikrodalga uygulaması ise ilk olarak 10 saniye mikrodalga enerjisi uygulaması ve yaklaşık 2 dakika soğutma yapılarak döngü 20 defa tekrarlanmıştır. Ardından 15 saniye mikrodalga uygulanıp soğutularak 10 döngü sonrası işlem tamamlanmıştır. Toplam reaksiyon 6 dakikada (10 sn x 20 + 15 sn x 10) tamamlanmıştır. Sürelerin gruplar arasında farklı olmasının nedeni, uygulanan mikrodalga'nın gücünün artması ile daha yüksek sıcaklıklara hızlı bir şekilde ulaşılmasıdır. Bu nedenle güç artışı ile uygulanan mikrodalga süresi ters orantılıdır. Mikrodalga uygulama işlemi tamamlandıktan sonra çözeltiler 12-14 kDa diyaliz membranına alınarak, 3 gün boyunca 37 °C'de diyaliz edilmiştir. Günde bir diyalize ait distile su yenilenmiştir. Diyalizin tamamlanmasının ardından çözelti liyofilizatör sisteminde 5 gün boyunca kurutulmuş ve mikrodalga destekli metakrilatlanmış chia müsilajı elde edilmiştir.

Her iki yöntem için kullanılan parametreler Tablo 2.1.'de verilmiştir.

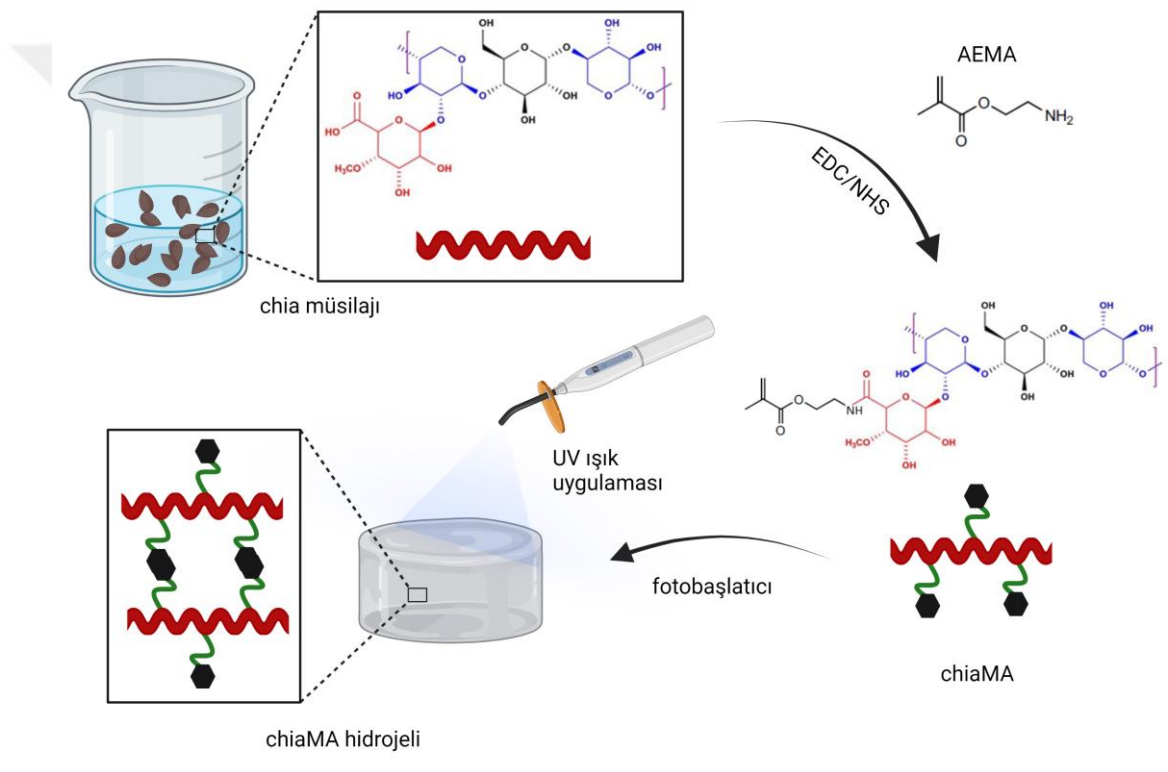
Tablo 2.1. Konvansiyonel ve mikrodalga sentezli metakrilasyon tekniklerinin parametreleri.

chiaMA sentezi	EDC miktarı (mg)	NHS miktarı (mg)	AEMA miktarı (mg)	Güç (W)	Reaksiyon süresi	Diyaliz süresi (gün)
Konvansiyonel	176	53	80	-	24 saat	3
Mikrodalga	176	53	80	100	6 dakika (30 sn x 12)	3
Mikrodalga	176	53	80	250	6 dakika (20 sn x 10 + 30 sn x 5)	3
Mikrodalga	176	53	80	500	6 dakika (10 sn x 20 + 15 sn x 10)	3

2.2.3. ChiaMA Hidrojelinin Elde Edilmesi

Chia müsilajının konvansiyonel ve mikrodalga destekli metakrilasyon reaksiyonu, Şekil 2.4.'de görüldüğü üzere chia müsilajında yer alan karboksil gruplarının EDC/NHS kimyası kullanılarak AEMA'da yer alan amin gruplarına bağlanması ile gerçekleştirilmiştir ve sonucunda metakrilatlanmış chia (chiaMA) sentezlenmiştir. ChiaMA hidrojellerini elde etmek için ilk olarak fotobaşlatıcı LAP distile su içerisinde çözündürülmüştür. Fotobaşlatıcı konsantrasyonunun çapraz bağlanma üzerindeki etkisini görebilmek için %0.3, %0.5 ve %1 oranlarında LAP kullanılmıştır. Ardından aşağıda yer verilen gruplara göre %2.5 (w/v) veya %5 (w/v) oranlarında konvansiyonel metakrilatlanmış veya mikrodalga destekli metakrilatlanmış chiaMA, çözelti içerisine eklenerek çözündürülmüştür. Elde edilen çözelti 24 kuyulu petri kabına alınmış, UV ışık (Valo Cordless, ABD) 3200 mW/cm² olacak şekilde uygulaması yapılmış ve çapraz bağlanma elde edilmeye çalışılmıştır. ChiaMA grupları aşağıdaki gibidir.

1. grup: Konvansiyonel chiaMA %2.5
2. grup: Konvansiyonel chiaMA %5
3. grup: 100 W chiaMA %2.5
4. grup: 100 W chiaMA %5
5. grup: 250 W chiaMA %2.5
6. grup: 250 W chiaMA %5
7. grup: 500 W chiaMA %2.5
8. grup: 500 W chiaMA %5



Şekil 2.4. ChiaMA hidrojelinin elde ediliş adımları.

2.2.4. ChiaMA Hidrojelinin Karakterizasyonu

2.2.4.1. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi Analizi

ChiaMA hidrojellerine ait metakrilasyon derecesi proton NMR spektroskopisi (Bruker 400, ABD) kullanılarak belirlenmiştir (400 MHz). Analizi yapabilmek için 10 mg liyofilizatörle ile kurutulmuş metakrilatlanmış chia müsilajı, konvansiyonel chiaMA, 100 W chiaMA, 250 W chiaMA ve 500 W chiaMA 600 µl döteryum oksit (D₂O) içerisinde çözündürülmüştür. Ardından oda sıcaklığında NMR analizi gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Bu adımda kızılötesi ışığın numune tarafından soğurulması sonucu maddenin molekül veya bileşik yapısında bulunan kimyasal bağların tanımlanmasını sağlayan FTIR (Carl-Zeiss, Almanya) kullanılmıştır. Chia müsilağı ve ChiaMA hidrojellerine ait yapı ve fonksiyonel grupların tespiti FTIR spektrum ölçümleri ile yapılmıştır.

2.2.4.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Zaman ve sıcaklık değişimi ile birlikte numune kütleğinde meydana gelen değişimlerin tespit edilmesi amacıyla TGA yöntemi kullanılmıştır. Chia müsilağı, ve chiaMA hidrojellerine ait TGA (Perkin Elmer Diamond, USA) analizi 25-900 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dakika ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Yukarıda belirtilen 8 farklı chiaMA hidrojelleri ve chia müsilağı liyofilizatör ile kurutulmuştur. Kuruyan numuneler ikiye kesilerek hem kesit görüntüsü hem de yüzey görüntüsü incelenmek üzere hazırlanmıştır. Ardından altın ile kaplanan numunelerin kesit ve yüzey morfolojisi, SEM (Carl-Zeiss, Almanya) görüntüleri ile incelenmiştir.

2.2.4.5. X-Işını Difraktometresi (XRD)

Kristale özel çeşitli yönlerde kırımını gerçekleştiren X ışını demetinin açısı ve genliklerini ölçerek malzemenin atomik ve moleküler yapısını tespit eden XRD (Panalytical Empyrean, İngiltere) yöntemi kullanılmıştır. Chia müsilağı ve chiaMA hidrojellerine ait XRD analizi 5-60° aralığında, 2 °/dakika tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.6. Reoloji Analizi

ChiaMA hidrojellerinin reolojik özellikleri reometre (Anton Paar, Avusturya) kullanılarak belirlenmiştir. Hidrojeller 2 mm kalınlığında 16 mm çapında silindirik disk şeklinde elde edilmiştir. Reolojik özellikler frekans, gerinim ve sıcaklık olmak üzere üç farklı ana parametre üzerinden değerlendirilmiştir. Frekans bağımlı reolojik analiz, %0.2 gerinim altında 0.5-200 rad/s aralığında gerçekleştirilmiştir. Yapılan dinamik analiz sonucu hidrojellerin depo modülü (G'), kayıp modülü (G'') ve kompleks modül (G^*) değerleri belirlenmiştir. Gerinim bağımlı reolojik analiz, 1 Hz sabit frekansta, %0-2 gerinim aralığında gerçekleştirilmiştir. Yapılan dinamik analiz sonucu hidrojellerin G' ,

G'' ve G^* değerleri belirlenmiştir. Hidrojelin farklı sıcaklıklarda yapısal kararlılığını görebilmek için sıcaklık bağımlı reolojik analiz, 1 Hz sabit frekansta, 15-45  C aralığında gerçekleştirilmiştir. Yapılan dinamik analiz sonucu hidrojellerin kayma gerilmesi belirlenmiştir.

2.2.4.7. Viskozite Analizi

Liyofilizatör ile kurutulan her bir chia müsilajı, konvansiyonel ve mikrodalga destekli (100 W, 250 W, 500 W) metakrilatlanan chia müsilajları %2.5 ve %5 oranlarında distile su içerisinde çözündürülerek biyo  zelti elde edilmiştir. Ardından biyo  zeltilerin 3B biyoyazıcıda basımının uygun olup olmadığını görmek için sıcaklık 30 saniyede bir 0.5  C artırılarak 15-45  C aralığında reometrede (Anton Paar, Avusturya) viskozite tayini gerçekleştirilmiştir.

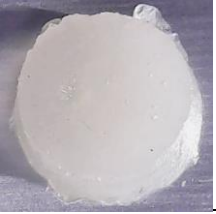
3. BÖLÜM

BULGULAR

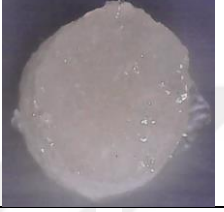
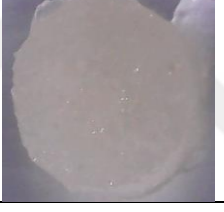
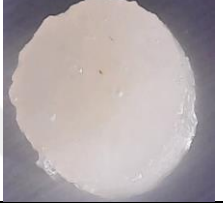
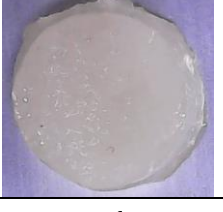
3.1 ChiaMA Hidrojelinin Çapraz Bağlanma Bulguları

Bu bölümde yer alan bulgularda %0.3, %0.5 ve %1 LAP kullanılarak, 30 sn UV ışık uygulaması yapılan %2.5 ve %5 konsantrasyonlarda konvansiyonel, 100 W, 250 W, 500 W chiaMA hidrojellerine yer verilmiştir. Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de yer aldığı üzere fotobaşlatıcı miktarının düşükten yükseğe kullanıldığı tüm gruplarda çapraz bağlanma gerçekleşmiş ve chiaMA hidrojelleri elde edilmiştir.

Tablo 3.1. Üç farklı konsantrasyonda LAP fotobaşlatıcı kullanılarak hazırlanan %2.5 chiaMA hidrojelleri

%2.5 chiaMA	%0.3 LAP	%0.5 LAP	%1 LAP
Konvansiyonel chiaMA			
Çapraz bağlanma	✓	✓	✓
100 W chiaMA			
Çapraz bağlanma	✓	✓	✓
250 W chiaMA			
Çapraz bağlanma	✓	✓	✓
500 W chiaMA			
Çapraz bağlanma	✓	✓	✓

Tablo 3.2. Üç farklı konsantrasyonda LAP fotobaşlatıcı kullanılarak hazırlanan %5 chiaMA hidrojel­leri

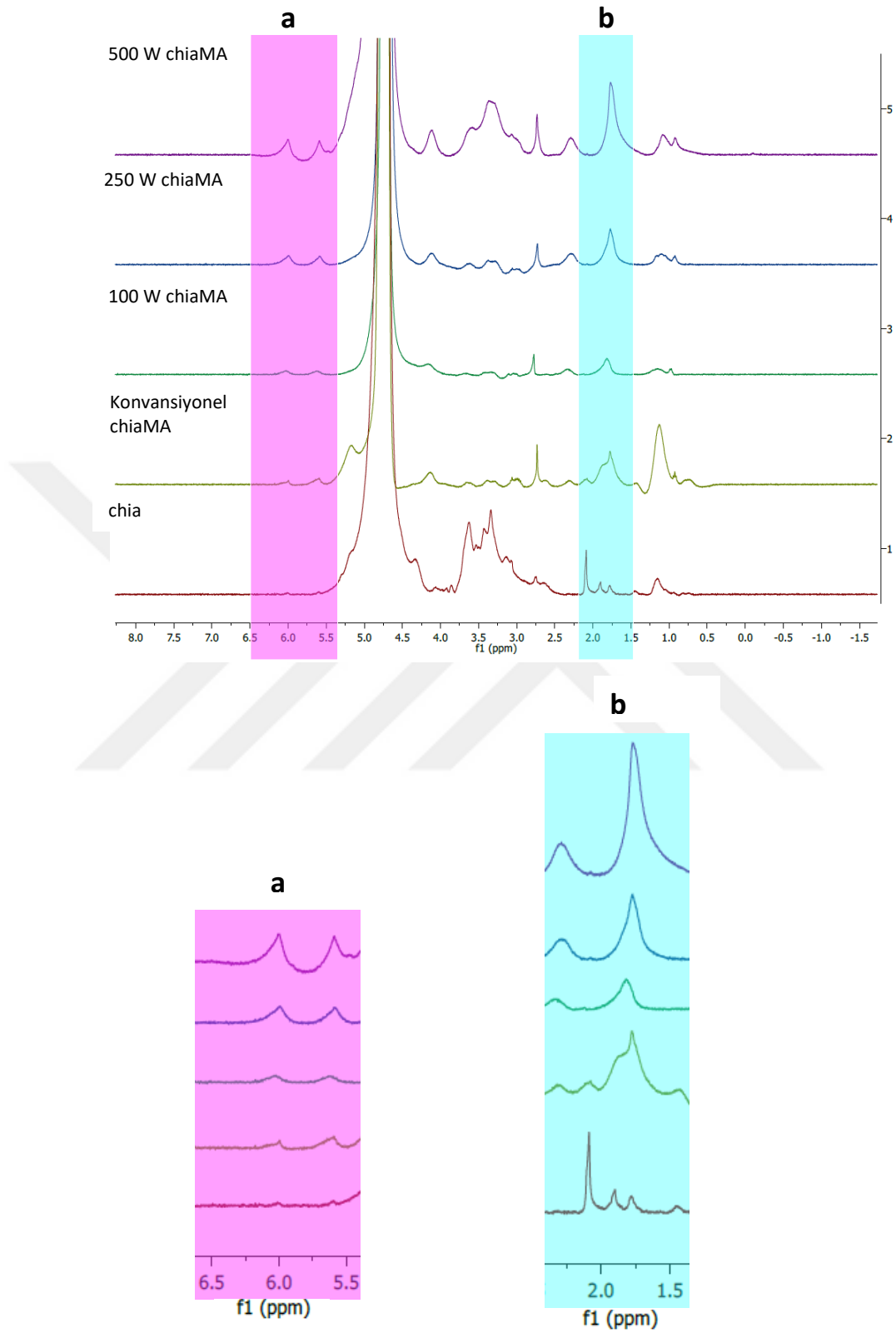
%5 chiaMA	%0.3 LAP	%0.5 LAP	%1 LAP
Konvansiyonel chiaMA			
Çapraz bağlanma	✓	✓	✓
100 W chiaMA			
Çapraz bağlanma	✓	✓	✓
250 W chiaMA			
Çapraz bağlanma	✓	✓	✓
500 W chiaMA			
Çapraz bağlanma	✓	✓	✓

3.2. ChiaMA Hidrojelinin Karakterizasyonu

3.2.1. NMR Analizi Bulguları

Chia müsilajı ve tüm chiaMA gruplarına proton NMR analizi yapılarak konvansiyonel ve mikrodalga destekli metakrilasyon sonucu chia müsilajının kimyasal yapısında meydana gelen değişiklikler ve metakrilasyon dereceleri incelenmiştir.

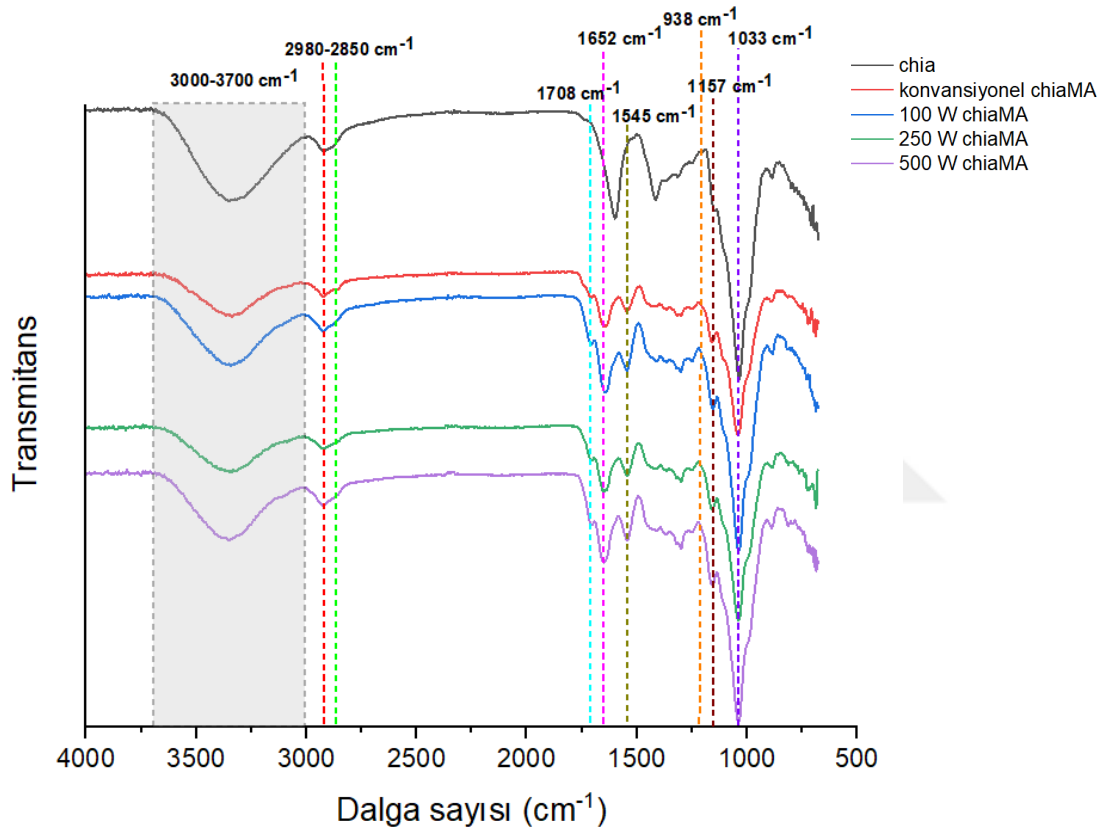
Şekil 3.1.'de chia müsilajının ve tüm chiaMA gruplarına ait proton NMR grafiği yer almaktadır. AEMA'ya ait vinil hidrojenleri NMR grafiğinde 5.20-6.30 ppm aralığında, metil hidrojenleri 2 ppm civarında ayırt edici pikler oluşturmaktadır [52]. Chia müsilajına ait grafik incelendiğinde 5.20-6.30 ppm aralığında bir pik oluşumu gözlemlenmemiştir. 2 ppm civarında ise chia müsilajından kaynaklı olarak üç küçük pik gözlemlenmiştir. Konvansiyonel chiaMA grubuna ait NMR grafiği incelendiğinde 5.20-6.30 ppm aralığında iki pik meydana gelirken, 2 ppm civarında chia müsilajında meydana gelen üç küçük pik, konvansiyonel chiaMA grubunda birleşmeye başlamıştır. 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA gruplarında 5.20-6.30 ppm aralığında iki pik oluşumu meydana gelmiş. Chia müsilajında yaklaşık 2 ppm'de yer alan üç küçük pik, 100 W chiaMA grubunda tamamen birleşerek tek pik haline gelmiş, 250 W ve 500 W chiaMA gruplarında bu pikin yoğunluğunun giderek arttığı gözlemlenmiştir. 5.20-6.30 ppm aralığında yer alan iki pik yoğunluğu konvansiyonel chiaMA grubunda en düşük iken, 100 W, 250 W, 500 W chiaMA gruplarında mikrodalga enerjisinin artışı ile piklerin yoğunluğu gözle görülür şekilde artış göstermiştir.



Şekil 3.1. Chia müsilajı ve chiaMA grupları proton NMR analizi. a) AEMA'ya ait vinyl grubuna ait pikler, b) AEMA'ya ait metil grubuna ait pikler.

3.2.2. FTIR Analizi Bulguları

Chia müsilajının konvansiyonel ve mikrodalga destekli yöntemler kullanılarak metakrilatlandığını gösterebilmek için FTIR analizi yapılmıştır. FTIR ile moleküle ait bileşim yapısı analiz edilebilmektedir. Kızılötesi ışık, molekül içerisinde yer alan titreşimsel bağ enerjisi ile ilişkili olarak belirli frekanslarda adsorblanır. Titreşimin bağ enerjisi ile kızılötesi ışığın dalga boyunun aynı olması durumunda adsorbe edilen kızılötesi ışık sayesinde molekülün karakteristik yapısı tespit edilir.



Şekil 3.2. Chia müsilajı ve chiaMA gruplarına ait FTIR analizi.

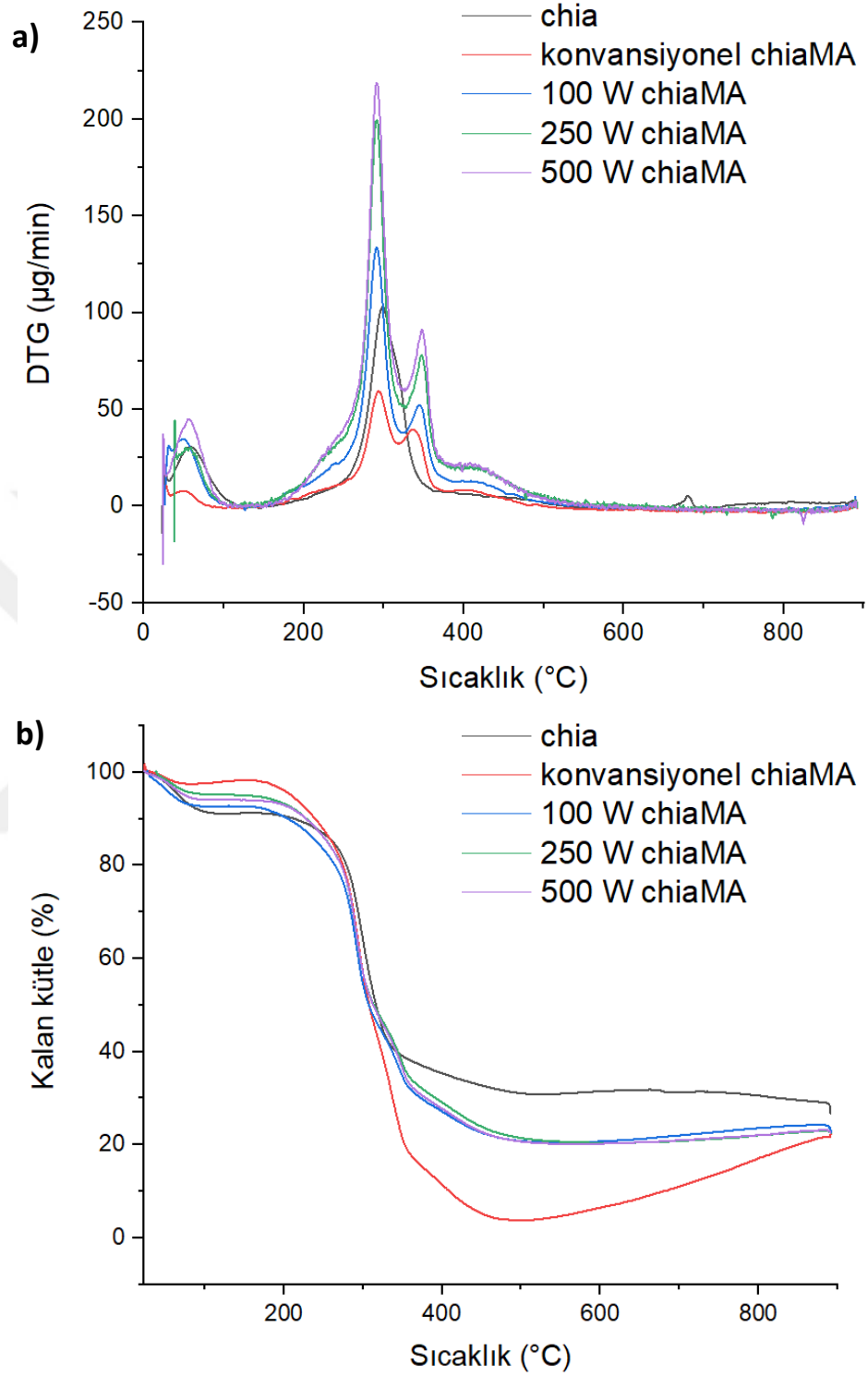
Şekil 3.2.'de görüldüğü üzere tüm gruplarda yer alan 3700-3000 cm⁻¹ ve 2980-2850 cm⁻¹ alanlarında görülen pikler bütün poliksakkaritlerde bulunmaktadır ve sırasıyla -OH ve -CH gerilme titreşimlerine aittir [52]. Ek olarak 1033 cm⁻¹'de yer alan pik genel olarak polisakkaritlerde bulunan C-O-C gerilimine aittir [73]. 938 cm⁻¹'de yer alan pik ise chia müsilajına ait karbonhidrat gruplarında yer alan C-O bağlarından kaynaklanmaktadır [74]. Chiaya ait grafikte görüldüğü üzere 1700-1600 cm⁻¹ alanında yer alan geniş pik proteinler için en karakteristik band olan amid 1 bandına aittir [74]. Ancak bu değerler aralığında konvansiyonel, 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA grafiklerinde amid 1 bandının üç ayrı pik oluşturduğu gözlemlenmiştir. 1652 cm⁻¹'de oluşan yeni pik, chia

müsilajı ve AEMA'nın birleştirme reaksiyonu sonucu NH-CO bağına ait gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1708 cm^{-1} ve 1545 cm^{-1} 'de oluşan yeni pikler metakrilat grubuna ait C=O ve N-H bağlarının gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1157 cm^{-1} 'de yer alan pik, chia grafiğinde zayıf şekilde oluşmuştur ancak metakrilatlanmış gruplara ait grafiklerde AEMA'dan kaynaklı C-N bağlarının gerilim titreşimi sonucu 1157 cm^{-1} 'de yer alan pik kuvvetlenmiştir.

3.2.3. TGA Bulguları

TGA analizi ile chia müsilajının ve chiaMA gruplarının termal davranışları incelenmiştir. Şekil 3.3'de tüm grupların hem diferansiyel termal termogravimetrik (DTG), hem de termogravimetrik analiz (TGA) grafiklerine yer verilmiştir. DTG analizinde amaç bir malzemenin sıcaklık değişimine bağlı olarak en çok hangi sıcaklıkta kayıp verdiğini tespit etmektir. Malzemenin ağırlık kaybındaki hızına karşı zaman veya sıcaklık fonksiyonu oluşturulur. TGA analizi ise bir malzemenin hangi sıcaklık noktalarında ağırlık kaybına uğrayıp uğramadığı bilgisini verir. Malzemenin ağırlığında meydana gelen değişim oranı, zamanın veya sıcaklığın bir fonksiyonu olarak gösterilir.

Şekil 3.3.a.'da yer alan DTG grafiğine göre chia müsilajı $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, chiaMA grupları ise $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $345\text{ }^{\circ}\text{C}$ civarında maksimum ağırlık kaybı vermiştir. Şekil 3.3.b.'de yer alan TGA grafiğine göre tüm gruplarda yaklaşık $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar suyun buharlaşmasına bağlı olarak ilk ağırlık kaybı meydana gelmiştir. $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar en fazla ($\sim\%10$) su kaybı chia müsilajında olurken, chiaMA gruplarında daha az su kaybı meydana gelmiştir. En az su kaybı ($\sim\%3$) ise konvansiyonel chia grubunda olmuştur. $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar tüm grupların kararlı yapıda olduğu, $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ ile $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ aralığında ise tüm gruplarda büyük bir kütle kaybı meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu kayıp polisakkarit moleküllerin depolarizasyonu ile düşük moleküler ağırlıklı uçucular haline gelmesinden dolayı kaynaklanmaktadır. En fazla kayıp ($>\%90$) konvansiyonel chiaMA grubunda meydana gelirken en az kayıp ($\sim\%60$) chia müsilajında gözlemlenmiştir. 100 W , 250 W ve 500 W chiaMA grupları ise konvansiyonel chiaMA grubuna göre daha az ağırlık kaybı vermiştir.



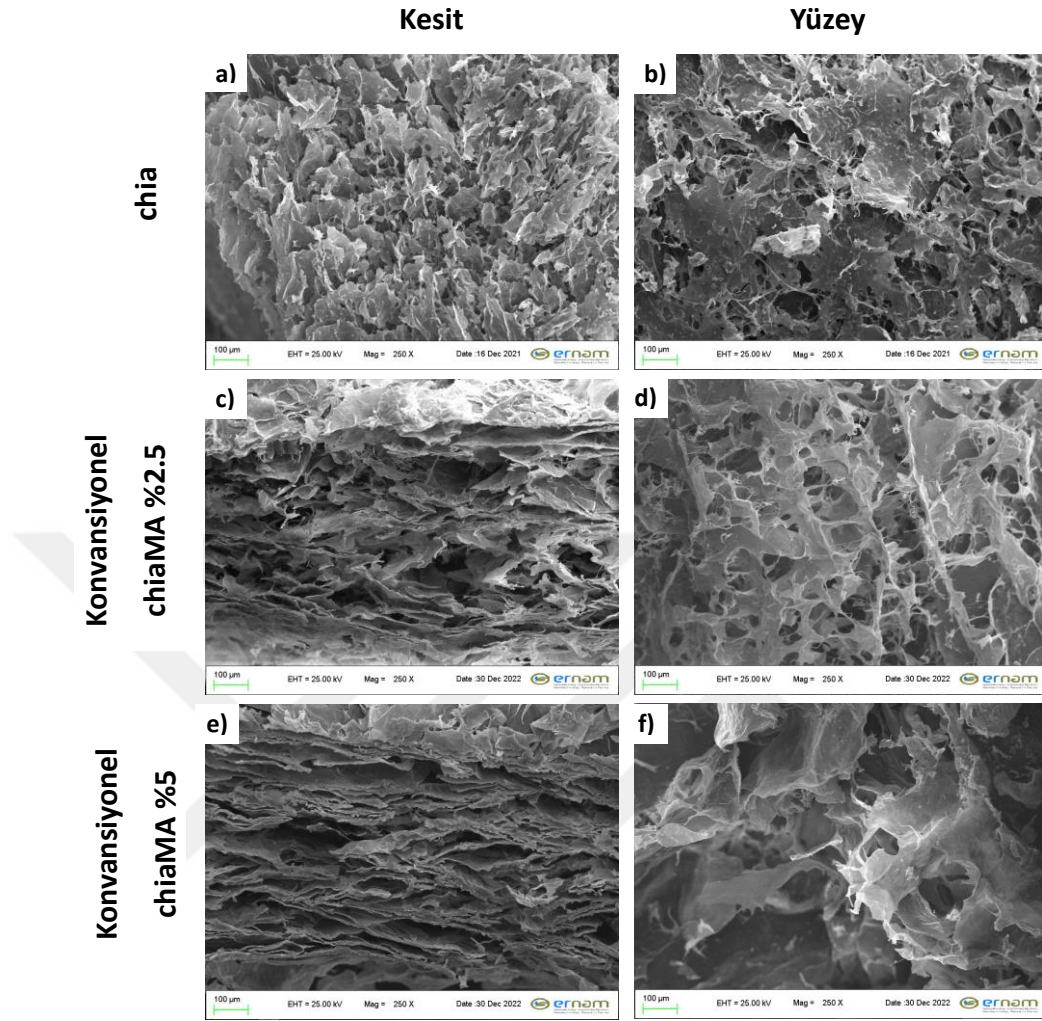
Şekil 3.3. Chia müsilajı ve chiaMA gruplarının termal davranış grafikleri. a) DTG grafiği, b) TGA grafiği.

3.2.4. SEM Analizi Bulguları

Yüzey morfolojilerini incelemek üzere chia müsilajı ve tüm chiaMA hidrojel grupları ilk olarak liyofilizatör ile kurutulmuş, ardından ikiye kesilip 6 nm altın kaplaması yapılarak SEM cihazında hem kesit hem yüzey görüntüleri alınmıştır.

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere tasarlanan hidrojellerin morfolojik yapısı hücre yapışması, çoğalması, gelişmesi ve farklılaşması için önem arz etmektedir. Çalışılacak hücre tipine göre farklılık göstermekle birlikte, hidrojellerin gözenekli yapıya sahip olması aranan bir özelliktir. Gözenekli yapı sayesinde hücreler yüzeye tutunabilir, çoğalıp, gelişebilir ve bu alanda farklılaşabilir. Ayrıca gözenekler sayesinde hücrelerin ihtiyaç duyduğu besin ve oksijen taşınımı sağlanırken, hücre atıkları da ortamdan uzaklaştırılabilir.

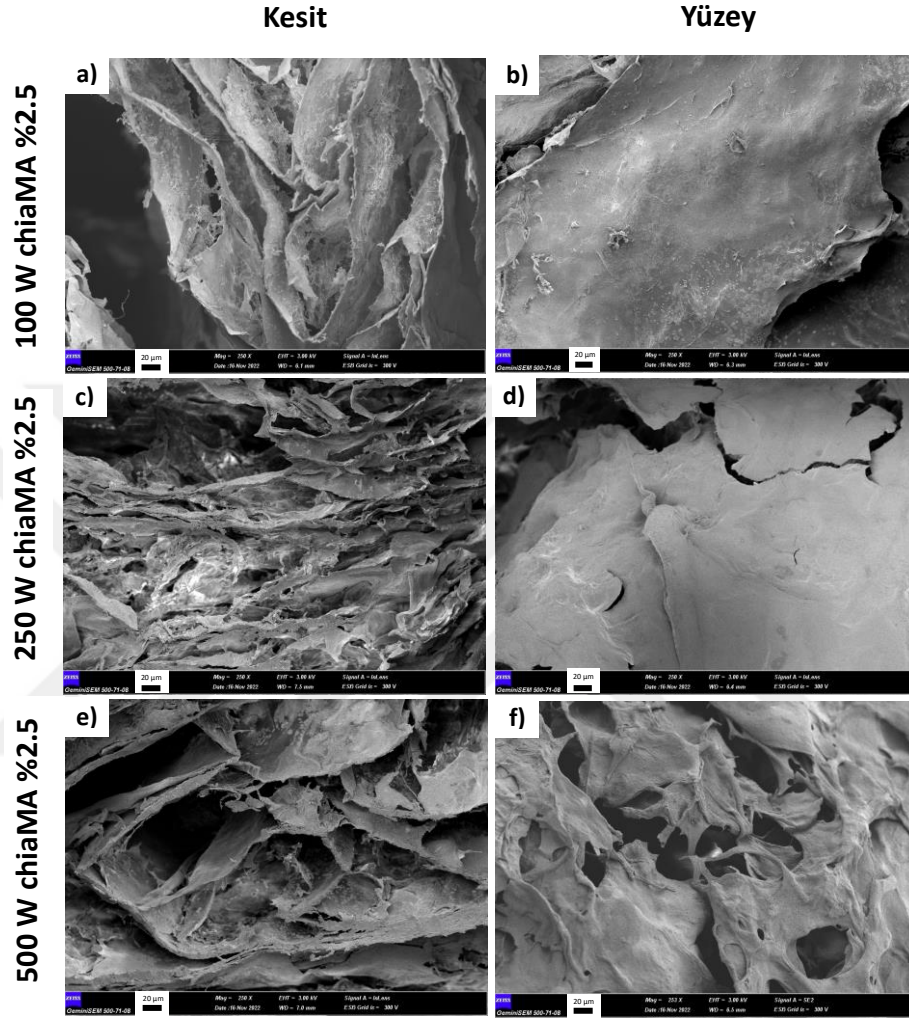
Şekil 3.4.'de chia müsilajı ve %2.5 ve %5 konvansiyonel chiaMA hidrojel gruplarına ait kesit ve yüzey SEM görüntüleri yer almaktadır. Chia müsilajının gözenekli yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 3.4.a ve Şekil 3.4.b). Konvansiyonel metakrilasyon sonucunda, hidrojellerin kesit görüntülerinde katman katman bir yapının oluşumu görülmüştür (Şekil 3.4.c ve Şekil 3.4.e). Ayrıca konvansiyonel chiaMA hidrojellerinin yüzeylerinin de gözenekli yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 3.4.d ve Şekil 3.4.f).



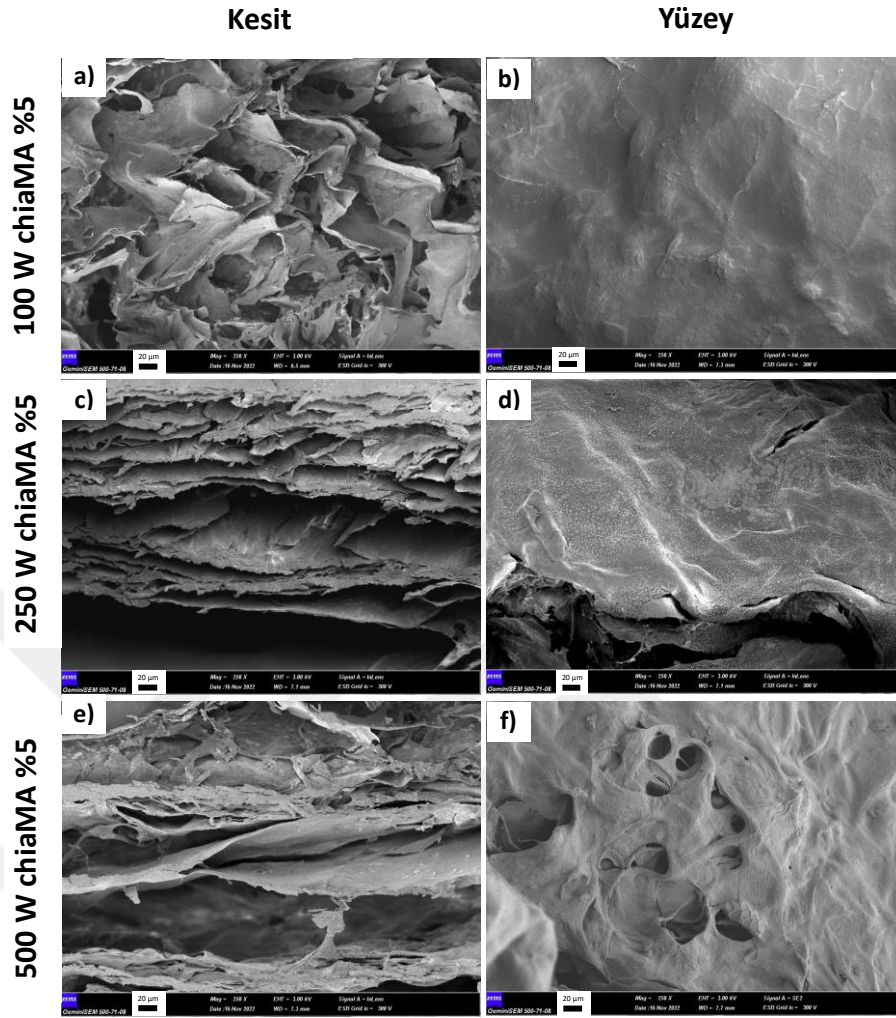
Şekil 3.4. Chia müsilajı ve konvansiyonel chiaMA hidrojellerine ait kesit ve yüzey SEM görüntüleri. (a, b) Chia müsilajı, (c, d) konvansiyonel chiaMA %2.5, (e, f) konvansiyonel chiaMA %5. Tüm büyütme 250X'dir.

%2.5 konsantrasyonda hazırlanan 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA hidrojellerinin görüntüleri Şekil 3.5'de, %5 konsantrasyonda hazırlanan 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA hidrojellerinin görüntüleri Şekil 3.6.'da yer almaktadır. 100 W, 250 W ve 500 W mikrodalga enerjisi kullanılarak elde edilen tüm chiaMA hidrojellerin kesit yapılarında katmanlı oluşum gözlemlenmektedir. 100 W ve 250 W mikrodalga enerjisi kullanılarak elde edilen chiaMA hidrojellerinin yüzey morfolojisi düz bir yapıya sahipken, 500 W mikrodalga enerjisi kullanılarak elde edilen chiaMA hidrojelinin yüzey morfolojisinde gözenekli yapının oluşumu gözlemlenmiştir. Ancak yüzeyde meydana gelen gözenekli

yapı %2.5 konsantrasyonda hazırlanan chiaMA hidrojellerinde, %5 konsantrasyonda hazırlanan chiaMA hidrojellerine göre daha yoğun şekilde gözlemlenmiştir.



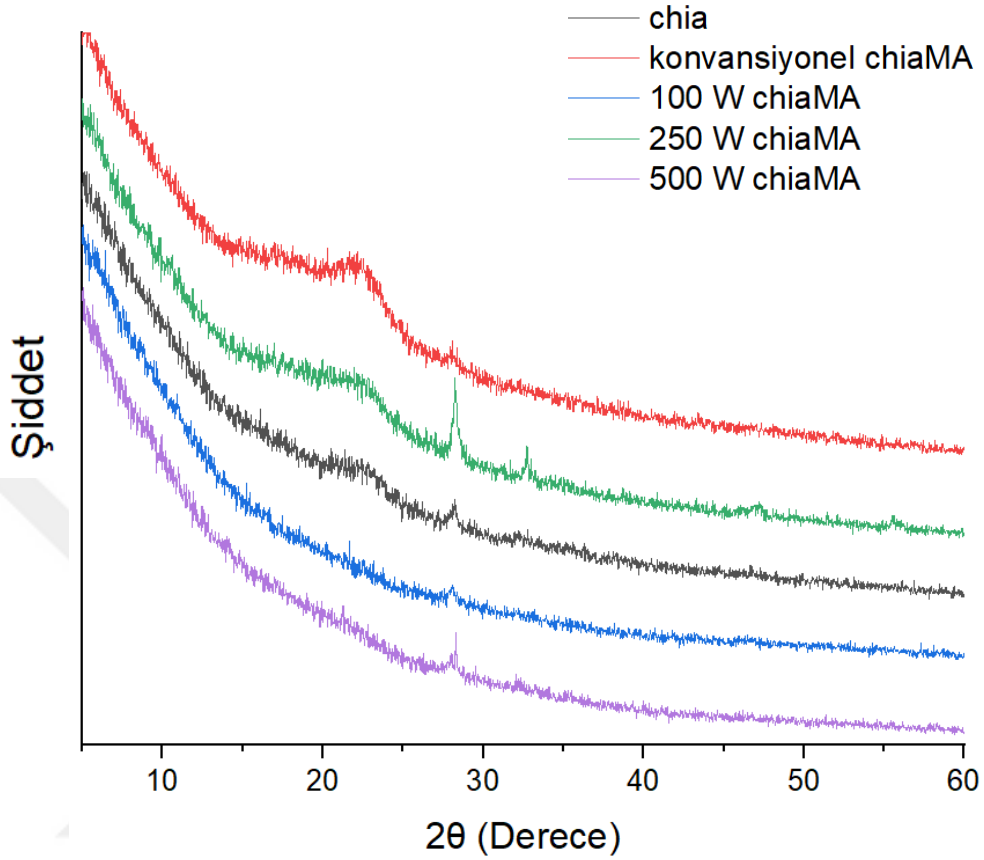
Şekil 3.5. Mikrodalga destekli metakrilasyon ile sentezlenmiş 100 W, 250 W, 500 W chiaMA hidrojellerine ait kesit ve yüzey SEM görüntüleri. (a, b) 100 W chiaMA %2.5, (c, d) 250 W chiaMA %2.5, (e, f) 500 W chiaMA %2.5. Tüm büyütme 250X'dir.



Şekil 3.6. Mikrodalga destekli metakrilasyon ile sentezlenmiş 100 W, 250 W, 500 W chiaMA hidrojellerine ait kesit ve yüzey SEM görüntüleri. (a, b) 100 W chiaMA %5, (c, d) 250 W chiaMA %5, (e, f) 500 W chiaMA %5. Tüm büyütme 250X'dir.

3.2.5. XRD Analizi Bulguları

XRD yapının kristallliği hakkında bilgi veren, polisakkarit yapılarını da çözmek için kullanılabilen güçlü bir tekniktir. Şekil 3.7.'de chia müsilağı ve chiaMA gruplarına ait XRD grafiğine yer verilmiştir. Chia müsilağı, konvansiyonel chiaMA ve 250 W chiaMA için ~13-26 dereceleri arasında geniş bir pik gözlemlenmiştir. Literatürde yer alan bitki kaynaklı polisakkaritler üzerine yapılan çalışmalara göre tepe noktaları 16.96, 20.04, 22 derecelerde yer alan asimetric, geniş piklerin yapısının amorf benzeri olduğu, kristallliğinin düşük böylelikle yarı kristal özelliğini ifade ettiğı belirtilmiştir [75-78]. Çalışmalarda ekstrakte edilen polisakkaritlerin yarı kristal yapısının CO, CH ve OH fonksiyonel bağlarından kaynaklandığı belirtilmiştir [75]. Bu verilere dayanarak konvansiyonel ve mikrodalga destekli metakrilasyonu gerçekleştirilen chiaMA'nın yarı kristal yapıda olduğu görölmektedir. Ayrıca chia müsilağı ve 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA gruplarında ~28 derecelik açıda pik gözlemlenmiştir. Bu pikin şiddeti chia müsilağı, 250 W ve 500 W'da yüksek iken, konvansiyonel ve 100 W chiaMA'da daha düşük gözlemlenmiştir. Chia müsilağının literatürde yer alan XRD grafiğine göre 29.4, 31.4 ve 39.4 derecelerde yer alan piklerin kalsiyum karbonat yapısına benzer olduğu belirtilmiştir. Bu veriler ile chia müsilağında magnezyum, fosfor ve kalsiyumun varlığı gösterilmiştir [65]. Literatürde yer alan çalışmadan yola çıkarak chia müsilağı ve tüm chiaMA gruplarının ~28 derecelik pik değerine göre, magnezyum, fosfor ve kalsiyum içeriğine sahip olabileceğı bulgusuna ulaşılabilir.



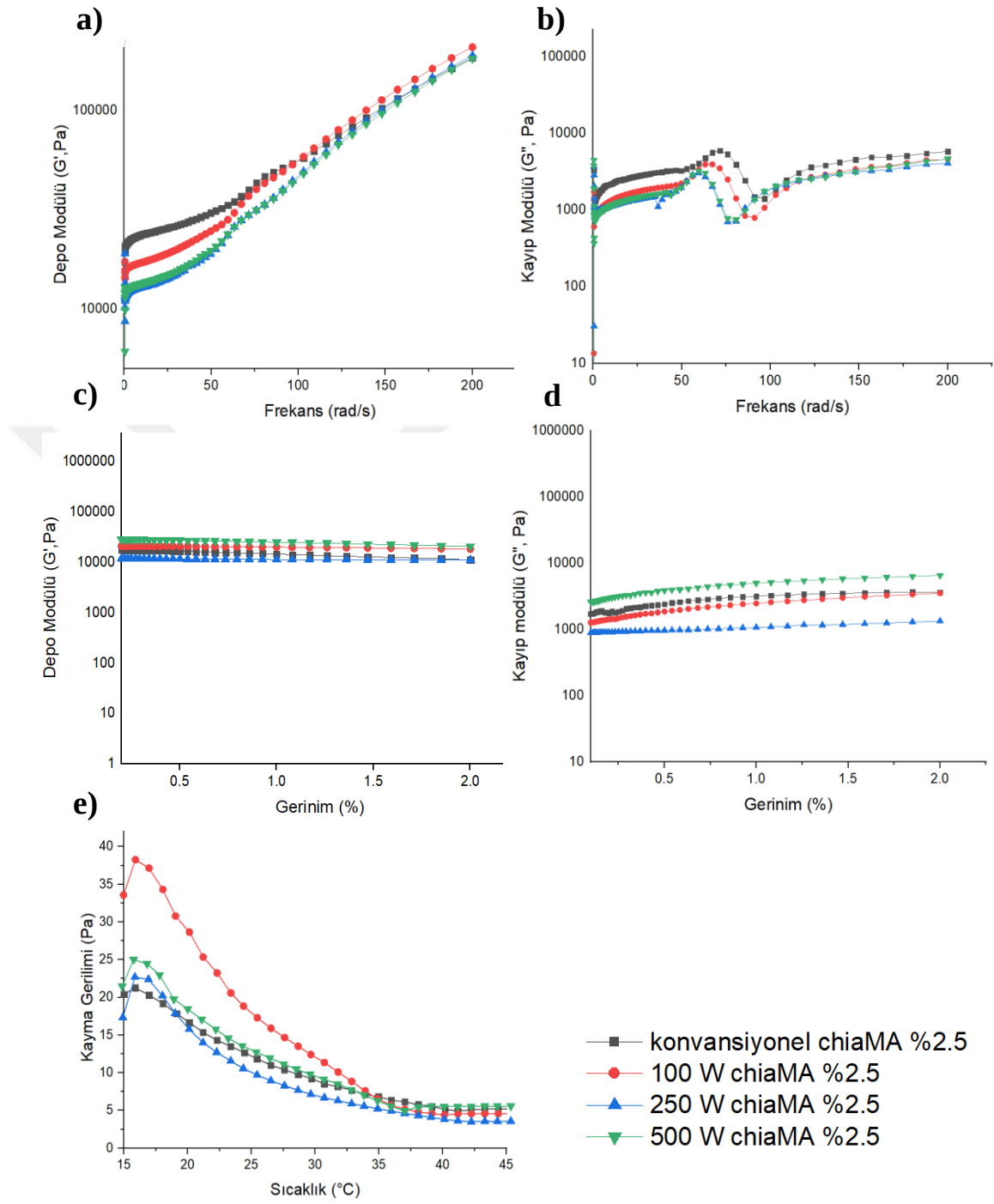
Şekil 3.7. Chia müsilajı ve chiaMA gruplarına ait XRD grafiği.

3.2.6. Reoloji Analizi Bulguları

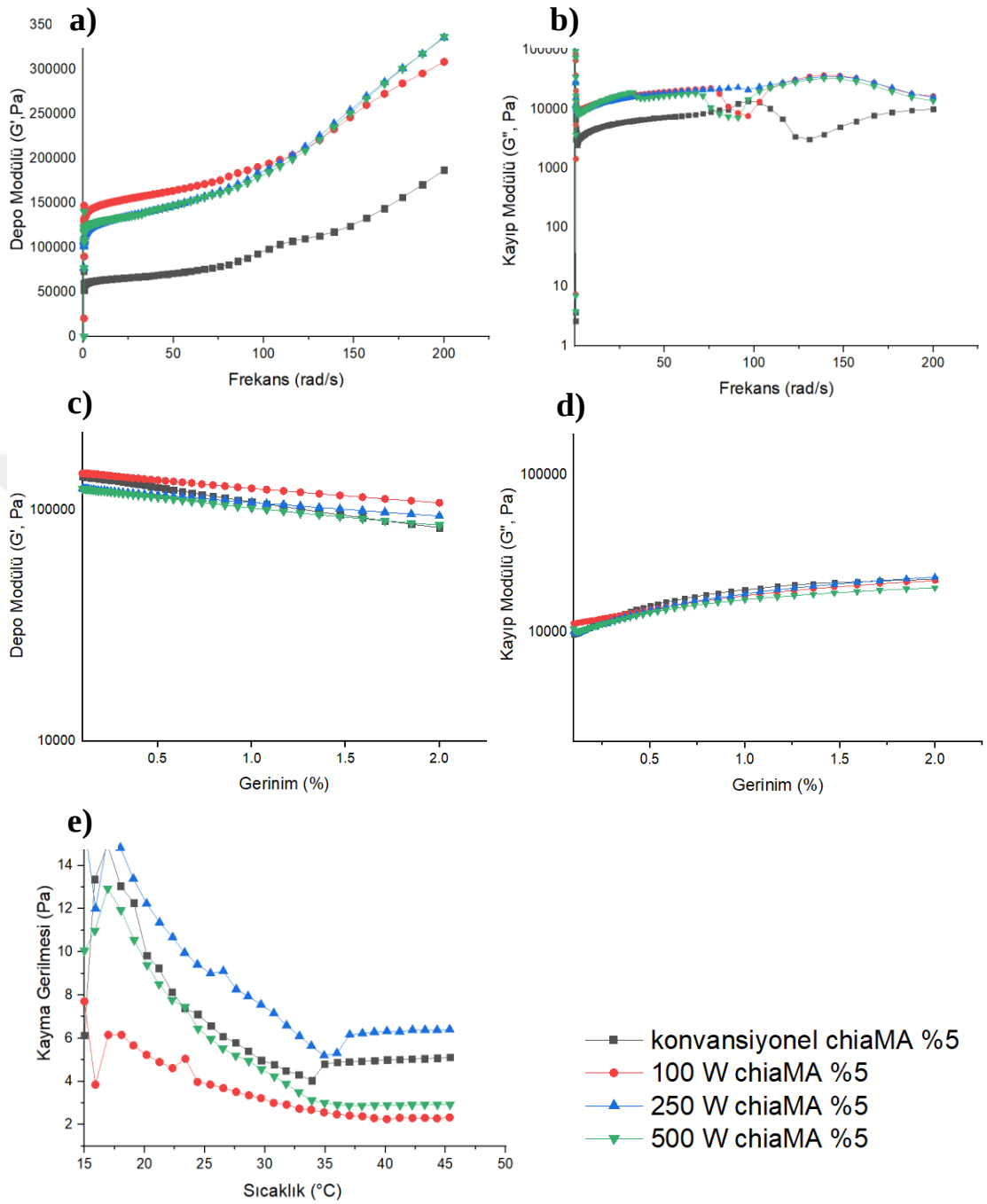
%2.5 konsantrasyonda, %1 LAP kullanılarak, 1 dakika UV ışık uygulaması ile hazırlanan konvansiyonel ve 100 W, 250 W, 500 W mikrodalga destekli chiaMA hidrojellerinin reolojik analizleri Şekil 3.8.'de gösterilmiştir. Yapılan frekans bağımlı dinamik analize göre tüm chiaMA hidrojel grupları elastik özellik sergilemektedir. Tüm hidrojeller kararlı ve 0.5-200 rad/s frekans aralığında yapısal bütünlüklerini korudukları gözlemlenmiştir. %2.5 konsantrasyon değerlerinde konvansiyonel chiaMA hidrojelinin, 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA hidrojellerine göre daha yüksek elastisiteye sahip olduğu görülmüştür. Tüm gruplarda frekansla birlikte depo modülününün, kayıp modülüne göre daha fazla artış gösterdiği görülmüştür. $G' > G''$ sonucuna ulaşıldığı için tüm gruplar viskoelastik özelliğe sahiptir. Tablo 3.3.'de %2.5 konsantrasyonda hazırlanan tüm chiaMA hidrojel gruplarının 200 rad/s frekans noktasındaki depo ve kayıp modülü değerleri verilmiştir. Bu tabloya göre tüm grupların viskoelastik özellik sergilediği açıkça görülmektedir. Gerinim bağımlı dinamik analize göre %0-2 aralığında uygulanan gerinime göre depo

modülünde de kayıp modülünde de görüldüğü üzere tüm chiaMA hidrojelleri kararlı bir yapı sergilemiştir ve herhangi bir deformasyon gözlemlenmemiştir. Depo modülüne göre 100 W ve 500 W chiaMA hidrojellerinin, konvansiyonel chiaMA hidrojeline göre daha yüksek dayanıma sahip olduğu görülmüştür. Tüm chiaMA hidrojellerinin kayma gerilmesi-sıcaklık grafiği incelendiğinde sıcaklık artışıyla birlikte $\sim 37^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar kayma gerilmesinde düşüş meydana gelmiştir ancak $\sim 37^{\circ}\text{C}$ 'den sonra kayma gerilmesi sabit bir değerde kalarak kararlı hale gelmiştir.

Şekil 3.9.'da ise %5 konsantrasyonda, %1 LAP kullanılarak, 1 dakika UV uygulaması ile hazırlanan konvansiyonel ve 100 W, 250 W, 500 W mikrodalga destekli chiaMA hidrojellerinin reolojik analizleri gösterilmiştir. 0-200 rad/s aralığında değişen frekans uygulandığı takdirde tüm hidrojel gruplarının elastik özelliklere sahip olduğu görülmüştür. 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA hidrojelleri büyük bir farkla konvansiyonel hidrojele göre daha yüksek elastisiteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. %5 konsantrasyonda hazırlanan tüm chiaMA hidrojel gruplarının 200 rad/s frekans noktalarındaki depo ve kayıp modülü değerleri Tablo 3.4.'de verilmiştir. Frekans artışı ile birlikte depo modülündeki artışın, kayıp modülündeki artışa göre daha fazla ($G' > G''$) olması nedeniyle tüm gruplar viskoelastik özellik sergilemektedir. Gerinim bağımlı dinamik analize göre %0-2 aralığında uygulanan deformasyona karşı tüm chiaMA hidrojellerinin kararlı bir davranış sergilediği gözlemlenmiştir. %2.5 chiaMA kullanılarak hazırlanan hidrojeller gibi %5 chiaMA kullanılarak hazırlanan hidrojellerin tamamı da $\sim 37^{\circ}\text{C}$ 'den sonra kayma gerilmesinin sabit bir değerde kalması ile kararlı bir yapı sergilemiştir.



Şekil 3.8. %2.5 chiaMA kullanılarak hazırlanan hidrojenlerin reolojik analiz sonuçları. Frekans bağımlı a) depo modülü, b) kayıp modülü; gerinim modülü c) depo modülü, d) kayıp modülü; sıcaklık bağımlı e) kayma gerilmesi değerleri.



Şekil 3.9. %5 chiaMA kullanılarak hazırlanan hidrojelilerin reolojik analiz sonuçları. Frekans bağımlı a) depo modülü, b) kayıp modülü; gerinim modülü c) depo modülü, d) kayıp modülü; sıcaklık bağımlı e) kayma gerilmesi değerleri.

Tablo 3.3. Frekans bağımlı dinamik analize göre 200 rad/s frekansında %2.5 chiaMA hidrojenlerinin özellikleri.

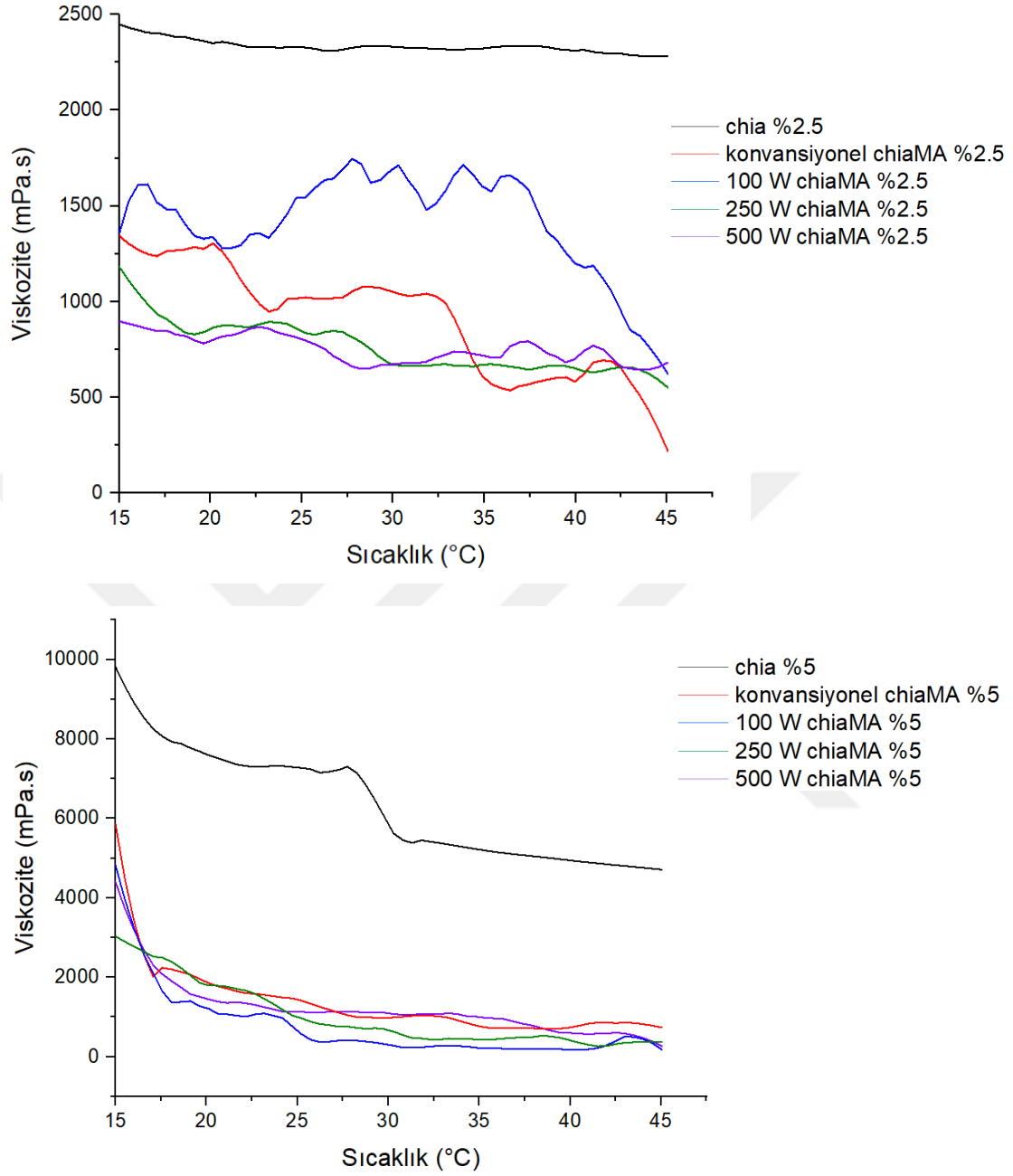
%2.5 chiaMA	Konvansiyonel chiaMA	100 W chiaMA	250 W chiaMA	500 W chiaMA
Depo Modülü (G', Pa)	183950	208660	189330	182900
Kayıp Modülü (G'', Pa)	5796	4580	4075	4638

Tablo 3.4. Frekans bağımlı dinamik analize göre 200 rad/s frekansında %5 chiaMA hidrojenlerinin özellikleri.

%5 chiaMA	Konvansiyonel chiaMA	100 W chiaMA	250 W chiaMA	500 W chiaMA
Depo Modülü (G', Pa)	187200	308600	335940	336910
Kayıp Modülü (G'', Pa)	10013	16557	15940	13773

3.3.7. Viskozite Analizi Bulguları

3B biyobaskı sistemlerinde kullanılan biyomürekkeplerin viskozite değerleri, biyomürekkebin basılabilirliği hakkında bilgi vermektedir. Biyomürekkebin viskozitesinin yüksek olması durumunda biyobaskının kontrollü bir şekilde gerçekleştirilememesi, iğnede tıkanmalar, ekstrüder sistemlerde yüksek basınç uygulanması sonucu hücrelerde ölümler meydana gelebilirken, viskozitenin düşük olması sonucunda biyomürekkep basıldığı yüzeyde sabit kalmayarak çökmeler meydana gelmesi ve katmanlı baskı gerçekleştirilememesi gibi durumlar oluşabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı 3B biyobaskı sistemlerinde kullanılan viskozite değerleri önem arz etmekte ve kullanılan biyomürekkebin viskozitesi, sıcaklık uygulanarak değiştirilebilmektedir. Literatüre göre 3B ekstrüder biyobaskı sistemlerinde viskozite 30 mPa.s ile 6×10^7 mPa.s aralığında olmalıdır [79, 80]. Çalışmanın bu bölümünde chia müsilajı ve chiaMA hidrojenlerine ait çözeltiler hazırlanarak reometre cihazında farklı sıcaklıklar altında çapraz bağlanma öncesi viskozite değerlerinin nasıl değiştiği incelenmiştir. Şekil 3.10.a ve Şekil 3.10.b'ye göre viskozite değerleri göz önüne alındığında chia müsilajı kendi başına her iki konsantrasyonda da en yüksek viskozite değerine sahiptir. %2.5 konsantrasyonda hazırlanan chiaMA gruplarının viskozite değerleri 300-1800 mPa.s aralığında, %5 konsantrasyonda hazırlanan chiaMA gruplarının viskozite değerleri 250-7000 mPa.s aralığında değişmektedir. Tablo 3.5 ve Tablo 3.6.'da 3B biyobasım için önemli parametreler olan oda sıcaklığı ve vücut sıcaklığında tüm grupların viskozite değerleri verilmiştir. Bu değerlere göre her iki konsantrasyonda da 3B ekstrüder biyobaskı sistemleri için basılabilir aralıkta olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.10. Chia müsilajı ve chiaMA hidrojellerinin çapraz bağlanma öncesi viskozite değerleri. a) %2.5 konsantrasyonda, b) %5 konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler.

Tablo 3.5. %2.5 konsantrasyonda hazırlanan chia müsilağı ve chiaMA çözeltilerin 25 °C ve 37 °C’deki viskozite değeri.

%2.5 chiaMA	Chia	Konvansiyonel chiaMA	100 W chiaMA	250 W chiaMA	500 W chiaMA
25 °C’deki viskozite değerleri (mPa.s)	2334.1	1083.5	1578.6	833.92	779.32
37 °C’deki viskozite değerleri (mPa.s)	2324.6	544.77	1582.2	705.4	690.11

Tablo 3.6. %5 konsantrasyonda hazırlanan chia müsilağı ve chiaMA çözeltilerin 25 °C ve 37 °C’deki viskozite değeri.

%5 chiaMA	Chia	Konvansiyonel chiaMA	100 W chiaMA	250 W chiaMA	500 W chiaMA
25 °C’deki viskozite değerleri (mPa.s)	7320.1	1413.9	428.7	933.36	1119.6
37 °C’deki viskozite değerleri (mPa.s)	5070.9	752.73	180.76	480.08	925.01

Bu tez çalışmasının amacı, chia müsilağının metakrilatlanması ile doku mühendisliği uygulamaları ve 3B biyobaskı teknolojisinde kullanılmak üzere yeni bir hidrojel sisteminin elde edilmesidir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma

Bu tez çalışmasının amacı, chia müsilağının metakrilatlanması ile doku mühendisliği uygulamaları ve 3B biyobaskı teknolojisinde kullanılmak üzere yeni bir hidrojel sisteminin elde edilmesidir.

Chia tohumu, yağı ve müsilağı kullanılarak literatürde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Zengin içeriğinden dolayı chiaya olan ilgiden dolayı chia üzerinde yapılan çalışmalar artsa da, bu çalışma alanları kozmetik, farmasötik ve genellikle gıda endüstrisi üzerine olmuştur [69, 81-83]. Doku mühendisliği uygulamaları için yapılan çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır. Yara iyileşmesi amaçlı yapılan bir çalışmada kitosan ve chia tohumlarından elde edilen polisakkarit (ksiloglukan) farklı oranlarda karıştırılmış, yapıya gliserol eklenerek hidrojel elde edilmiştir. Chia tohumlarının su ile etkileşime girmesi sonucu elde edilen müsilağın fiber yapıda olması ve sonucunda sıvıyı tutan bir yapıya sahip olmasından dolayı chia kullanımı tercih edilmiştir. Ayrıca kitosan zayıf mekanik özelliklere sahip olup chia polisakkaritlerinin moleküler ağırlığının kitosana göre daha fazla olmasından dolayı çalışmada kitosan ile ksiloglukan karıştırılarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kitosana bitkisel bazlı polimerlerin eklenmesi ile mekanik mukavemette değişiklikler yapılabileceği, uygun mekanik mukavemet ve fizyolojik sıvıları emebilecek yara iyileştirici materyallerin elde edilebileceği sonucuna varılmıştır [70]. Ayrıca bir başka çalışmada chia tohumlarından elde edilen yağ asitlerinin hücre göçü, proliferasyonu, anjiyogenez ve inflamatuvar mediyatörlerin üretimini sağlayarak yara iyileşmesini sağlayabileceği vurgulanmıştır [84].

Chia müsilağının çeşitli hücreler üzerinde etkisi de incelenmiştir. Çalışmaya göre chia müsilağının KOH ve enzimatik hidrolizi işlemleri uygulanmasının ardından rahim ağzı

kanseri hücre hattı olan HeLa, meme kanseri hücresi olan MCF7 ve insan karaciğer kanser hücre hattı olan HepG2 hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonunu sağladığı gösterilmiştir [85].

Doku mühendisliği uygulamaları için sıklıkla kullanılan JelMA hidrojelinin metakrilasyonu yapılan bir çalışmada ilk defa mikrodalga destekli olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya göre farklı mikrodalga enerjileri ve farklı metakrilik anhidrit konsantrasyonları kullanılarak JelMA hidrojelleri (600 W/%8 MA, 1000 W/%8 MA, 600 W/%4 MA, 1000 W/%4 MA) elde edilmiştir. Bu hidrojellerin frekans bağımlı reolojik analizinin 100 rad/s'de elde edilen depo modülleri sırasıyla 39 kPa, 39.1 kPa, 27.5 kPa ve 41.1 kPa'dır. Kayıp modülleri ise hepsinin 0.1 kPa şeklindedir. Tez çalışmasında elde edilen chiaMA hidrojellerinin frekans bağımlı reolojik analizi incelendiğinde 100 rad/s'de, %2.5 konsantrasyonda chia kullanılarak hazırlanan konvansiyonel, 100 W, 250 W ve 500 W hidrojel grupların depo modülleri sırasıyla 57.5 kPa, 58.4 kPa, 49.2 kPa ve 48 kPa'dır. Kayıp modülleri ise sırasıyla 1.8 kPa, 1.5 kPa, 1.9 kPa ve 2 kPa'dır. %5 konsantrasyonda chia kullanılarak hazırlanan konvansiyonel, 100 W, 250 W ve 500 W hidrojel gruplarının depo modülleri 98.4 kPa, 194.3 kPa, 188.3 kPa ve 184.4 kPa şeklindedir. Kayıp modülleri ise 13 kPa, 13.3 kPa, 23.9 kPa ve 20 kPa'dır. Elde edilen bu değerlerden de görüldüğü üzere, literatürde sıklıkla kullanılmakta olan JelMA hidrojellerine göre hem konvansiyonel, hem de mikrodalga destekli metakrilasyon ile elde edilen chiaMA hidrojelleri tüm konsantrasyonlarda daha viskoelastik özellik sergilemiştir.

Irgacure 2959 suda çözünebilen ve ticari olarak temin edilebilen ilk fotobaşlatıcılardan biridir. JelMA, MeHA gibi bir çok hidrojel hazırlamak için kullanılır. Ancak Irgacure 2959, uzun süre ışık uygulaması sonucu çapraz bağlanmayı sağlayabilir. Bu durum hücreler üzerinde mutasyon, hücre ölümü gibi olumsuz etkilere neden olabilmektedir [86]. Yapılan bir çalışmada JelMA hidrojellerinin çapraz bağlanması Irgacure 2959 ve LAP fotobaşlatıcıları kullanılarak sağlanmış ve fotobaşlatıcıların hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Düşük fotobaşlatıcı konsantrasyonlarında her iki fotobaşlatıcı için de hücre canlılığı iyi durumda iken, konsantrasyon miktarı artırıldıkça hücre canlılığının LAP kullanılan hidrojellerde, Irgacure 2959 kullanılan hidrojellere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Hidrojellerin morfolojik özellikleri incelendiğinde Irgacure 2959 kullanılan hidrojellerin daha büyük gözenek boyutuna sahip olduğu, daha hızlı

bozunduğu tespit edilmiştir [87]. Yapılan tez çalışmasında ise LAP fotobaşlatıcı kullanılarak chiaMA hidrojelini ile kullanılacak olan hücreler üzerinde daha az toksik etki oluşması hedeflenmiştir.

4.2. Sonuç ve Öneriler

- Bir maddenin moleküllerine ait kimyasal yapının hidrojen atomları üzerinden analiz edilmesini sağlayan proton NMR yöntemi kullanılarak konvansiyonel ve mikrodalga destekli metakrilasyon ile chia müsilajının metakrilatlandığı ispat edilmiştir. NMR grafiğinde yer alan 5.20-6.30 ppm aralığında AEMA'nın vinil hidrojenine ve yaklaşık 2 ppm'de yer alan AEMA'nın metil hidrojeline ait pikler ile AEMA'nın chia müsilajının yapısına katıldığı gösterilmiştir. Konvansiyonel metakrilasyonda yer alan piklerin yoğunluğu, 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA gruplarında yer alan piklerin yoğunluğuna göre çok daha düşüktür. Buna göre mikrodalga destekli metakrilasyonun, konvansiyonel metakrilasyona göre daha verimli olduğu sonucuna ulaşılabilir. Ayrıca mikrodalga enerjisinin gücü artırıldığıa 5.20-6.30 ppm aralığında ve 2 ppm civarında yer alan piklerin yoğunluklarının giderek artması, 500 W mikrodalga enerjisinin en verimli metakrilasyon uygulaması olduğunu göstermektedir.
- Kızılötesi ışığın adsorblanması sonucu molekül yapısında bulunan bağ titreşimleri hakkında bilgi veren FTIR analizi sonucu chia müsilajı ve chiaMA grupları karşılaştırıldığında 1157 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} ve 1708 cm^{-1} 'de yer alan pikler chia müsilajının metakrilatlandığı gösterilmiştir.
- Chia müsilajının, konvansiyonel ve mikrodalga destekli chiaMA hidrojellerinin morfolojik yapıları SEM ile incelenmiştir. SEM görüntülerine göre chia müsilajında katmanlı bir yapı gözlenmezken, tüm chiaMA hidrojellerinin kesit görüntülerinde hidrojellerin katmanlı bir yapıya sahip olduğu görölmüştür. Bu katmanlı yapı hücrelerin tutunma, çoğalma, gelişme farklılaşmasında destekleyici bir özellik sergileyecektir. Ayrıca hücrelere besin ve oksijen taşınımında yer alacak, hücre atıklarının ortamdan uzaklaştırılmasına yardımcı olacaktır.
- Reoloji analizine göre, %2.5 konsantrasyon değerlerinde konvansiyonel chiaMA hidrojelinin, 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA hidrojellerine göre daha yüksek

elastisiteye sahip olduğu görülmüştür ancak bu farklılık 0-50 rad/s aralığında çok düşük değerlere sahiptir. Gerinim bağımlı dinamik analize göre hem depo modülü hem de kayıp modül de 100 W ve 500 W chiaMA hidrojenlerinin konvansiyonel chiaMA hidrojenine karşı daha yüksek değerlere sahip olması, mikrodalga destekli chiaMA hidrojenlerinin konvansiyonel chiaMA hidrojenine göre daha yüksek mekanik dayanıma sahip olduğunu göstermektedir. %5 konsantrasyon değerlerinde 100 W, 250 W ve 500 W chiaMA hidrojenlerinin konvansiyonel chiaMA hidrojenine göre daha yüksek elastisiteye sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuca göre mikrodalga destekli metakrilasyonun, konvansiyonel metakrilasyona göre daha yüksek mekanik dayanıma sahip olduğu anlaşılmaktadır.

- Reolojik analize göre %2.5 ve %5 konsantrasyonda hazırlanan tüm chiaMA hidrojenleri karşılaştırıldığında %5 chiaMA hidrojenlerinin (52000-336000 Pa), %2.5 chiaMA hidrojenlerine (10000-208000 Pa) göre çok daha yüksek depo modülüne sahip olduğu, %5 chiaMA hidrojenlerinin daha yüksek elastisite özelliklerine sahip olduğu görülmektedir. Aynı zamanda %5 chiaMA hidrojenleri gerinimine karşı 83000-143000 Pa aralığında depo modülüne sahipken, %2.5 chiaMA hidrojenleri gerinime karşı 11000-28000 Pa aralığında depo modülüne sahiptir. Bu değerlere göre %5 chiaMA hidrojenlerinin, %2.5 chiaMA hidrojenlerine göre deformasyona karşı daha yüksek mekanik dayanım gösterdiği anlaşılmaktadır.
- %2.5 ve %5 konsantrasyonlarında hazırlanan tüm chiaMA hidrojenlerinin kayma gerilmesi-sıcaklık grafiğine göre tüm hidrojenlerde $\sim 37^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar sıcaklık artışı ile birlikte kayma gerilmesinde düşüş meydana gelirken $\sim 37^{\circ}\text{C}$ 'den itibaren kayma gerilmesi sabit bir değerde kalmaktadır. Bu değerlere göre hidrojenlerin $\sim 37^{\circ}\text{C}$ vücut sıcaklığında kararlı bir yapı sergileyeceğini, üzerine kayma gerilmesi gibi vücut hareketleri ile birlikte yük uygulanması durumunda mekanik dayanım göstereceği anlaşılmaktadır.
- %2.5 ve %5 konsantrasyonlarında hazırlanan chia müsilajı ve chiaMA hidrojenlerinin çapraz bağlanma öncesi viskozite değerleri incelendiği zaman, tüm grupların 3B ekstrüder biyobaskı için uygun değerlere sahip olduğu görülmüştür. 3B ekstrüder biyobaskı sistemlerinde daha yüksek viskozite değerlerine sahip

biyomürekkeplerin basımı için daha yüksek basınçların kullanılması gerekmektedir ancak yüksek basınçlar hücreler üzerinde stres oluşturabilmekte ve hücre ölümüne neden olabilmektedir. Viskozite değerlerine göre tüm chiaMA hidrojel gruplarının chia müsilaına göre daha düşük viskozitede basılabilir özellikte olması hücreler üzerinde oluşabilecek olumsuz etkenlerin önüne geçilebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak doğal bir polimer olan chia müsilaının literatürde ilk defa metakrilasyonu gerçekleştirilmiştir. Hem konvansiyonel hem de farklı enerjiler kullanılarak mikrodalga destekli metakrilasyon ile elde edilen chiaMA hidrojelinin ilk defa karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Metakrilasyon sayesinde chia müsilaının hem mekanik özellikleri artırılmış hem de chia müsilaından viskoelastik bir hidrojel sentezi elde edilmiştir. Farklı fotobaşlatıcı miktarları (%0.3, %0.5, %1) kullanılarak chiaMA'nın çapraz bağlanabilirliği gösterilmiştir. Zengin içeriğı ile ECM yapısına benzerlik gösten chiaMA hidroجلي, 3B biyobaskı teknolojilerinde kullanılmak üzere umut vaad eden bir biyomürekkep olarak yerini alacaktır. İlerleyen süreçlerde in vitro ve in vivo çalışmalar ile doku mühendisliğı uygulamalarında kullanıma sunulabilecektir.

KAYNAKÇA

1. Fatimi, A., et al., 2022. Natural hydrogel-based bio-inks for 3D bioprinting in tissue engineering: a review. **Gels**, **8**(3): 179.
2. O'brien, F.J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, **14**(3): 88-95.
3. Hinderer, S., Layland, S.L., Schenke-Layland, K. 2016. ECM and ECM-like materials—biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **97**: 260-269.
4. Collins, M.N., et al., 2021. Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering. **Advanced Functional Materials**, **31**(21): 210609.
5. Hashmi, S., 2014. Comprehensive Materials Processing. Elsevier
6. Freeman, J.W., Kwansa, A.L., 2008. Recent advancements in ligament tissue engineering: the use of various techniques and materials for ACL repair. **Recent Patents on Biomedical Engineering**, **1**(1): 18-23.
7. Vig, K., et al., 2017. Advances in skin regeneration using tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, **18**(4): 789.
8. Mantha, S., et al., 2019. Smart hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine. **Materials**, **12**(20): 3323.
9. Sun, B.K., Siprashvili, Z., Khavari, P.A., 2014. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science** **346**(6212): 941-945.
10. Howard, D., et al., 2008. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. **Journal of anatomy**, **213**(1): 66-72.
11. Banigo, A.T., Iwuji, S.C., Iheaturu, N.C., 2019. Application of biomaterials in tissue engineering: a review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, **11**(4): 1-16.
12. Agarwal, S., et al., 2020. Current developments in 3D bioprinting for tissue and organ regeneration—a review. **Frontiers in Mechanical Engineering**, **6**: 589171.
13. Bartolo, P., et al., 2022. 3D bioprinting: materials, processes, and applications. **CIRP Annals**, **71**(2): 577-597.
14. Jeong, H.-J., et al., 2020. 3D bioprinting strategies for the regeneration of functional tubular tissues and organs. **Bioengineering**, **7**(2): 32.

15. Su, C., et al., 2022. Natural materials for 3D printing and their applications. **Gels**, **8**(11): 748.
16. Irvine, S.A., Venkatraman, S.S. 2016. Bioprinting and differentiation of stem cells. **Molecules**, **21**(9): 1188.
17. Sundaramurthi, D., Rauf, S., Hauser, C., 2016. 3D bioprinting technology for regenerative medicine applications. **International Journal of Bioprinting**, **2**(2): 9-26
18. Xing, F., et al., 2020. 3D bioprinting for vascularized tissue-engineered bone fabrication. **Materials**, **13**(10): 2278.
19. Panda, S., et al., 2022. A focused review on three-dimensional bioprinting technology for artificial organ fabrication. **Biomaterials Science**. 6
20. Groll, J., et al., 2018. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, **11**(1): 013001.
21. Mobaraki, M., et al., 2020. Bioinks and bioprinting: a focused review. **Bioprinting**, **18**: 80.
22. Parimala C. R., Zhang X. M., Wang H., 2022. A comprehensive assessment on the pivotal role of hydrogels in scaffold-based bioprinting. **Gels**, **8**(4): 239.
23. Yang, Q., et al., 2022. Polysaccharide hydrogels: functionalization, construction and served as scaffold for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, **278**: 118952.
24. Chamkouri, H., Chamkouri, M., 2021. A review of hydrogels, their properties and applications in medicine. **Am. J. Biomed. Sci. Res**, **11**(6): 485-493.
25. Bashir, S., et al., 2020. Fundamental concepts of hydrogels: synthesis, properties, and their applications. **Polymers**, **12**(11): 2702.
26. Chimene, D., Kaunas, R., Gaharwar, A.K., 2020. Hydrogel bioink reinforcement for additive manufacturing: a focused review of emerging strategies. **Advanced Materials**, **32**(1): 1902026.
27. Merceron, T.K., Murphy, S.V., 2015. Hydrogels for 3D Bioprinting Applications, in *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. Elsevier, 21
28. Sikdar, P., et al., 2021. Recent advances in the synthesis of smart hydrogels. **Materials Advances**, **2**: 4532-4573

29. Ng, J.Y., et al., 2020. Biomimicry of microbial polysaccharide hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine—a review. **Carbohydrate Polymers**, **241**: 116345.
30. Ahmad, Z., et al., 2022. Versatility of hydrogels: from synthetic strategies, classification, and properties to biomedical applications. **Gels**, **8**(3): 167.
31. Naahidi, S., et al., 2017. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, **35**(5): 530-544.
32. Li, Y., Yang, H.Y., Lee, D.S., 2022. Biodegradable and injectable hydrogels in biomedical applications. **Biomacromolecules**, **23**(3): 609-618.
33. Li, X., et al., 2022. Biomaterial inks for extrusion-based 3D bioprinting: property, classification, modification, and selection. **International Journal of Bioprinting**, **9**(2): 1-26
34. Kaczmarek, B., Nadolna, K., Owczarek, A., 2020. The Physical and Chemical Properties of Hydrogels Based on Natural Polymers. 151-172.
35. Schwab, A., et al., 2020. Printability and shape fidelity of bioinks in 3D bioprinting. **Chemical reviews**, **120**(19): 11028-11055.
36. Kulkarni, V., Shaw, C., 2016. Rheological Studies. Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages. 145-82.
37. Stojkov, G., et al., 2021. Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications. **Gels**, **7**(4): 255.
38. Ribas-Massonis, A., et al., 2022. Free-radical photopolymerization for curing products for refinish coatings market. **Polymers**, **14**(14): 2856.
39. Gu, Y., et al., 2020. Advanced bioink for 3D bioprinting of complex free-standing structures with high stiffness. **Bioengineering**, **7**(4): 141.
40. Jongprasitkul, H., et al., 2020. Photocross-linkable methacrylated polypeptides and polysaccharides for casting, injecting, and 3D fabrication. **Biomacromolecules**, **22**(2): 481-493.
41. Výborný, K., et al., 2019. Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair. **Scientific Reports**, **9**(1): 1-15.
42. Hua, J., et al., 2016. Preparation and properties of EDC/NHS mediated crosslinking poly (gamma-glutamic acid)/epsilon-polylysine hydrogels. **Materials Science and Engineering: C**, **61**: 879-892.

43. Hermanson, G.T., 2013. Bioconjugate Techniques: Academic Press, 1200.
44. Bart, J., et al., 2009. Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. **Lab on a Chip**, **9**(24): 3481-3488.
45. Zanon, M., et al., 2022. Microwave-assisted methacrylation of chitosan for 3D printable hydrogels in tissue engineering. **Materials Advances**, **3**(1): 514-525.
46. Kappe, C.O., 2004. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, **43**(46): 6250-6284.
47. Ewis, D., Hameed, B., 2021. A review on microwave-assisted synthesis of adsorbents and its application in the removal of water pollutants. **Journal of Water Process Engineering**, **41**: 102006.
48. Irmak, G.I., Demirtaş, T.T., Gümüşderelioğlu, M.e., 2018. Highly methacrylated gelatin bioink for bone tissue engineering. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, **5**(2): 831-845.
49. Larraneta, E., et al., 2015. Microwave-assisted preparation of hydrogel-forming microneedle arrays for transdermal drug delivery applications. **Macromolecular materials and engineering**, **300**(6): 586-595.
50. Wiesbrock, F., Hoogenboom, R., Schubert, U.S., 2004. Microwave-assisted polymer synthesis: state-of-the-art and future perspectives. **Macromolecular Rapid Communications**, **25**(20): 1739-1764.
51. Shirahama, H., et al., 2016. Precise tuning of facile one-pot gelatin methacryloyl (GelMA) synthesis. **Scientific reports**, **6**(1): 1-11.
52. Araiza-Verduzco, F., et al., 2020. Photocrosslinked alginate-methacrylate hydrogels with modifiable mechanical properties: effect of the molecular conformation and electron density of the methacrylate reactive group. **Materials**, **13**(3): 534.
53. Poldervaart, M.T., et al., 2017. 3D bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity. **Plos One**, **12**(6): 0177628.
54. Melilli, G., et al., 2020. DLP 3D printing meets lignocellulosic biopolymers: Carboxymethyl cellulose inks for 3D biocompatible hydrogels. **Polymers**, **12**(8): 1655.
55. Osi, A.R., et al., 2021. Three-dimensional-printable thermo/photo-cross-linked methacrylated chitosan–gelatin hydrogel composites for tissue engineering. **ACS Applied Materials & Interfaces**, **13**(19): 22902-22913.

56. Mihaila, S.M., et al., 2013. Photocrosslinkable kappa-carrageenan hydrogels for tissue engineering applications. **Advanced Healthcare Materials**, **2**(6): 895-907.
57. İlhan, G.T., Irmak, G., Gümüşderelioğlu, M., 2020. Microwave assisted methacrylation of kappa carrageenan: a bioink for cartilage tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, **164**: 3523-3534.
58. Van Den Bulcke, A.I., et al., 2000. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. **Biomacromolecules**, **1**(1): 31-38.
59. Hoch, E., et al., 2012. Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, **23**(11): 2607-2617.
60. Hasany, M., et al., 2021. Synthesis, properties, and biomedical applications of alginate methacrylate (ALMA)-based hydrogels: current advances and challenges. **Applied Materials Today**, **24**: 101150.
61. Gao, Y., Jin, X., 2019. Dual crosslinked methacrylated alginate hydrogel micron fibers and tissue constructs for cell biology. **Marine Drugs**, **17**(10): 557.
62. Goh, K.K.T., et al., 2016. The physico-chemical properties of chia seed polysaccharide and its microgel dispersion rheology. **Carbohydrate Polymers**, **149**: 297-307.
63. Muñoz, L.A., et al., 2012. Chia seeds: microstructure, mucilage extraction and hydration. **Journal of Food Engineering**, **108**(1): 216-224.
64. de la Paz Salgado-Cruz, M., et al., 2013. Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage release characterisation. A microstructural and image analysis study. **Industrial Crops and Products**, **51**: 453-462.
65. García-Salcedo, Á.J., et al., 2018. Pasting, viscoelastic, and physicochemical properties of chia (*salvia hispanica* L.) flour and mucilage. **Food Structure**, **16**: 59-66.
66. De Falco, B., Amato, M., Lanzotti, V., 2017. Chia seeds products: an overview. **Phytochemistry Reviews**, **16**(4): 745-760.
67. Kulczyński, B., et al., 2019. The chemical composition and nutritional value of chia seeds—current state of knowledge. **Nutrients**, **11**(6): 1242.

68. Jin, F., et al., 2012. Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. **Plant foods for human nutrition**, **67**: 105-110.
69. Darwish, A.M., Khalifa, R.E., El Sohaimy, S.A., 2018. Functional properties of chia seed mucilage supplemented in low fat yoghurt. **Alexandria Science Exchange Journal**, **39**: 450-459.
70. Martínez-Ibarra, D.M., et al., 2019. Hydrogel wound dressings based on chitosan and xyloglucan: development and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, **136**(12): 47342.
71. Samateh, M., et al., 2018. Unravelling the secret of seed-based gels in water: the nanoscale 3D network formation. **Scientific reports**, **8**(1): 1-8.
72. Lin, K.-Y., Daniel, J.R., Whistler, R.L., 1994. Structure of chia seed polysaccharide exudate. **Carbohydrate Polymers**, **23**(1): 13-18.
73. de Campo, C., et al., 2017. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*salvia hispanica* L.) as wall material: characterization and stability evaluation. **Food chemistry**, **234**: 1-9.
74. Câmara, A.K.F.I., et al., 2020. Chia (*salvia hispanica* L.) mucilage as a new fat substitute in emulsified meat products: technological, physicochemical, and rheological characterization. **Lwt**, **125**: 109193.
75. Jeddou, K.B., et al., 2016. Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. **Food Chemistry**, **205**: 97-105.
76. Yang, B., et al., 2020. *Hovenia dulcis* polysaccharides: Influence of multi-frequency ultrasonic extraction on structure, functional properties, and biological activities. **International journal of biological macromolecules**, **148**: 1010-1020.
77. Niu, L.-L., et al., 2021. Optimization of extraction process, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *leucopaxillus giganteus*. **Journal of Food Measurement and Characterization**, **15**(3): 2842-2853.
78. Solmaz, K.B., et al., 2018. Characterization and production of extracellular polysaccharides (EPS) by *Bacillus pseudomycoides* U10. **Environments**, **5**(6): 63.

79. Caceres-Alban, J., Sanchez, M., Casado, F.L., 2022. Bioprinting: a strategy to build informative models of exposure and disease. **IEEE Reviews in Biomedical Engineering**, **16**: 594-610
80. Murphy, S.V., Atala, A., 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature Biotechnology**, **32**(8): 773-785.
81. da Silveira Ramos, I.F., et al., 2021. New properties of chia seed mucilage (*salvia hispanica* l.) and potential application in cosmetic and pharmaceutical products. **Industrial Crops and Products**, **171**: 113981.
82. Masood, M.A.B., 2022. Chia seeds as potential nutritional and functional ingredients: a review of their applications for various food industries. **J Nut Food Sci Tech**, **4**(1): 1-14.
83. Goksen, G., et al., 2023. Mucilage polysaccharide as a plant secretion: potential trends in food and biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, **230**: 123146.
84. de Oliveira Filho, J.G., et al., 2021. Plant-based mucilage with healing and anti-inflammatory actions for topical application: a review. **Food Hydrocolloids for Health**, **1**: 100012.
85. Rosas-Ramírez, D.G., et al., 2017. Resistance-modifying activity in vinblastine-resistant human breast cancer cells by oligosaccharides obtained from mucilage of chia seeds (*Salvia hispanica*). **Phytotherapy Research**, **31**(6): 906-914.
86. Tomal, W., Ortyl, J., 2020. Water-soluble photoinitiators in biomedical applications. **Polymers**, **12**(5): 1073.
87. Xu, H., et al., 2020. Effects of irgacure 2959 and lithium phenyl-2, 4, 6-trimethylbenzoylphosphinate on cell viability, physical properties, and microstructure in 3D bioprinting of vascular-like constructs. **Biomedical Materials**, **15**(5): 055021.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Saime Nur KARASU
Uyruğu: Türkiye (T.C.)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği	2023
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği	2019
Lise	Mustafa Eminoglu Anadolu Lisesi, Kayseri	2014

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2018	ERKAM	Stajyer
2017	Develi Hatice Muammer Kocatürk Devlet Hastanesi	Stajyer

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Ertas, Y. N.; Ozpolat, D.; Karasu, S. N.; Ashammakhi, N. (2022). Recent Advances in Cochlear Implant Electrode Array Design Parameters. *Micromachines*, 13 (7), 1081.

BİLDİRİ

6th International Aegean Conferences on Innovation Technologies & Engineering