

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**4B BİYOBASKI İLE SICAKLIK DUYARLI HİDROJEL
PLATFORMU ÜRETİMİ VE KATLANMA KONTROLÜ: KAS
DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK UYGULAMALAR**

Barış Burak ALTUNAY

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Pınar YILGÖR HURİ

ANKARA

2025

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "4B BİYOBASKI İLE SICAKLIK DUYARLI HİDROJEL PLATFORMU ÜRETİMİ VE KATLANMA KONTROLÜ: KAS DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK UYGULAMALAR" başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Barış Burak ALTUNAY

Tarih: 14/01/2025

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalında
Barış Burak ALTUNAY tarafından hazırlanan
“4B Biyobaskı ile Sıcaklık Duyarlı Hidrojel Platformu Üretimi ve Katlanma Kontrolü: Kas
Doku Mühendisliğine Yönelik Uygulamalar” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından
YÜKSEK LİSANS olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/01/2025

İmza

Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Pınar YILGÖR HURİ

Ankara Üniversitesi

İmza

Doç. Dr. Cem BAYRAM

Hacettepe Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

4B Biyobaskı ile Sıcaklık Duyarlı Hidrojel Platformu Üretimi ve Katlanma Kontrolü: Kas Doku Mühendisliğine Yönelik Uygulamalar

İskelet kası dokusu, insan vücudunda hareketin sağlanması gibi temel işlevlerde görev almaktadır. Ancak, dokunun doğal rejenerasyon yeteneğinin sınırlılığı ve fonksiyonel kayıpları telafi edebilecek etkili tedavi yöntemlerinin eksikliği, bu dokunun yenilenmesini hedefleyen yenilikçi çalışmaların önüne yeni bir araştırma alanı açmıştır. Geleneksel tedavi yöntemlerinin çoğu, dokunun mekanik ve biyokimyasal özelliklerini tam olarak taklit edememekte ve bu da rejeneratif tıpta alternatif yaklaşımların ön plana çıkmasına neden olmaktadır. Doku mühendisliği, biyomalzemeler, hücreler ve biyokimyasal ajanlar kullanarak fonksiyonel dokuları yeniden oluşturmayı hedefleyen disiplinler arası bir yaklaşımdır. Bu alanda taşıyıcı iskelelerin geliştirilmesi, doku yenilenmesi sürecinde hücrelerin tutunması, çoğalması ve organize olması için gerekli mikro çevreyi sağlayan temel bir unsurdur. Ancak, kas dokusunun kompleks yapısı ve dinamik fonksiyonları nedeniyle bu dokunun rejenerasyonunda etkili olabilecek taşıyıcı iskelelerin tasarımı büyük bir zorluk oluşturmaktadır. Son yıllarda, 3 boyutlu (3B) baskılama teknolojisinin bu alanda sunduğu çözümler, 4 boyutlu (4B) baskılama gibi yenilikçi yaklaşımların gelişmesiyle daha da ileri bir noktaya taşınmıştır. 4B baskılama, biyomalzemelere şekil hafızası, kendiliğinden harekete geçme gibi akıllı davranış özellikleri kazandırırken, bu yapıların dış uyaranlara duyarlı bir şekilde şekil değişikliği yapabilmesini sağlamaktadır. Bu teknoloji, karmaşık doku mimarilerini oluşturmak için yeni kapılar açmış, aynı zamanda biyomalzeme bilimi ile doku mühendisliğini entegre eden önemli bir yenilik sunmuştur. Geleneksel doku iskelesi tasarımlarının ötesinde, 4B baskılama sayesinde dinamik, uyarlanabilir ve dış etkenlere duyarlı doku iskeleleri üretmek mümkün hale gelmiştir. Bu tez çalışması, kas doku mühendisliği alanında 4B baskılama teknolojisinin kullanımını ve bu teknoloji ile biyomalzeme sentezi, hücre etkileşimleri ve fonksiyonel doku oluşturma potansiyelini araştırmaktadır. Çalışmada 4B baskılama ile şekil değişikliklerinin optimize edilmesi ele alınmış olup bu materyallerin hücre tutunma ve çoğalma üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında 4B baskılama teknolojisinin kas doku rejenerasyonu için yenilikçi bir yaklaşım sunduğunu ortaya koymayı hedeflemektedir.

Anahtar Sözcükler: Biyobaskı, 4B Baskı, Doku Mühendisliği, İskelet Kası, Sıcaklık Duyarlı Malzemeler

SUMMARY

Production of Temperature-Sensitive Hydrogel Platform with 4D Bioprinting and Folding Control: Applications to Muscle Tissue Engineering

Skeletal muscle tissue plays a role in basic functions such as providing movement in the human body. However, the limited natural regeneration capacity of this tissue and the lack of effective treatment methods to compensate for functional losses have opened a new research avenue aimed at its regeneration. Traditional treatment approaches often fail to fully replicate the mechanical and biochemical properties of the tissue, which has led to the prominence of alternative strategies in regenerative medicine. Tissue engineering is an interdisciplinary approach that aims to reconstruct functional tissues by utilizing biomaterials, cells, and biochemical agents. The development of scaffolds in this field serves as a fundamental element, providing the necessary microenvironment for cell adhesion, proliferation, and organization during the tissue regeneration process. Nevertheless, the complex structure and dynamic functions of muscle tissue present significant challenges in designing scaffolds that can effectively support its regeneration. In recent years, solutions offered by three-dimensional (3D) printing technology have advanced further with the emergence of innovative approaches such as four-dimensional (4D) printing. 4D printing endows biomaterials with smart properties such as shape memory and self-actuation, enabling these structures to undergo shape transformations in response to external stimuli. This technology has opened new opportunities for creating complex tissue architectures and provides a significant innovation by integrating biomaterial science with tissue engineering. Beyond traditional scaffold designs, 4D printing allows for the production of dynamic, adaptable, and stimulus-responsive scaffolds. This thesis investigates the use of 4D printing technology in muscle tissue engineering and explores its potential for biomaterial synthesis, cell interactions, and functional tissue formation. The study focuses on optimizing shape transformations achieved through 4D printing and evaluates the effects of these materials on cell adhesion and proliferation. In this context, the thesis aims to demonstrate that 4D printing technology offers an innovative approach to muscle tissue regeneration.

Keywords: 4D Printing, Bioprinting, Skeletal Muscle, Temperature-Sensitive Materials , Tissue Engineering

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. İskelet Kası	1
1.1.1.İskelet Kasının Yapısı	1
1.1.2. Ekstraselüler Matrisin Kompozisyonu	3
1.1.3 Matris Sertliği	3
1.1.4. Kas Dokusunda Yaralanma	3
1.2.Doku Mühendisliği	4
1.3. Doku İskeleleri ve Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler	6
1.3.1. Doğal Polimerler	7
1.3.2. Sentetik Polimerler	8
1.4. Doku İskelesi Üretim Metotları	9
1.5. Akıllı Malzemeler ve 4B Basım	16
1.6. Gerekçe ve Amaç	16
2. GEREÇ ve YÖNTEM	18
2.1. Gereç	18
2.2. Yöntem	19
2.2.1. Sıcaklık Duyarlı Hidrojel Üretimi	19
2.2.1.1. P(NIPAm) Temelli Sıcaklık Duyarlı Hidrojel Hazırlanması	19
2.2.1.2. Jelatin Metakrilat (GelMA) Sentezi	20
2.2.2. 4B Baskı Optimizasyonu	20
2.2.3. Sitotoksosite Testi	24
2.2.4. Hücre Kültürü	26
2.2.4.1. Hücre Morfolojisi ve Yayılımı	27
2.2.4.2. İmmünfloresan Boyama ve Taramalı Elektron Mikroskobu	29
3. BULGULAR	30
3.1. 4B Basım Optimizasyon Bulguları	30
3.2. Sitotoksosite Bulguları	37
3.3. Hücre Kültürü Bulguları	40
4. TARTIŞMA	46
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50
EKLER	59
Ek-1. C2C12 Alamar Blue Testi Kalibrasyon Eğrisi	59
ÖZGEÇMİŞ	60

ÖNSÖZ

4B baskı, 3B baskıya zaman parametresi eklenmesi ile ortaya çıkan bir teknolojidir. 3B baskı ile üretilen bir yapının farklı uyaranlar doğrultusunda zaman içinde kendi kendine form veya özellik değiştirmesine dayanmaktadır. 4B baskı yaklaşımı mimari ve optik gibi farklı alanlarda kullanılabildiği gibi rejeneratif tıp uygulamalarında da giderek artan bir öneme sahiptir. 4B baskı kavramı, 3B baskıyı uyaranlara duyarlı materyaller veya "akıllı materyaller" ile bütünleştirir. Geleneksel 3B baskıdan farklı olarak 4B baskı, sıcaklık, manyetik alanlar, ışık, pH ve elektrik gibi dış uyaranlara yanıt olarak başlangıçtaki baskı durumunda kasıtlı değişikliklere izin verir. "4B baskı" terimi, bu dış etkenler nedeniyle zaman içinde meydana gelen dinamik dönüşümleri tanımlamak için türetilmiştir. Son yıllarda 4B biyobaskı, özellikle doku mühendisliği alanında önem kazanmıştır. Doku mühendisliğinde önceden programlanmış şekil değişiklikleriyle damar, kas ve kemik gibi boru şeklindeki yapıları oluşturmak için kullanılır. Bu çalışmada, sıcaklık duyarlı bir malzeme olan poli(n-izopropilakrilamid) (P(NIPAm)) ve farklı biyomalzemenin bir arada kullanımıyla katlanması kontrol edilebilen yapıların 4B biyobaskı yaklaşımı ile üretimi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, tez sürecimde bana her türlü desteği sağlayan danışmanım Prof. Dr. Pınar YILGÖR HURİ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bütün süreç boyunca her türlü yardımda bulunan Emre ERGENE, Şeyda GÖKYER, Utku Serhat DERİCİ, Osama Ali ALHINDY, Begüm PINARBAŞI, Işıl YAZGAN, Ayşe YALÇINER ve Meriç GÖKER' e teşekkür ederim. Eğitimim boyunca yanımda bulunan başta babam Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY, annem Dr. Kerime ALTUNAY ve ablam Başak ALTUNAY olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim. Tez sürecimde yanımda olan Aybüke MARAŞ ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

3B	3 Boyut
4B	4 Boyut
Alg	Aljinat
APS	Amonyum Persülfat
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovin Serum Albumin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
ECM	Ekstraselüler Matris
GelMA	Jelatin Metakrilat
M	Molar
MA	Metakrilik Asit
MAA	Metakrilik Anhidrit
MBAm	Metilenbis(akrilamid)
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mm	Milimetre
NIPAm	N-izopropilakrilamid
LAP	Lithium phenyl-2 4 6-trimethylbenzoylphosphinate
P(NIPAm)	Poli(n-izopropilakrilamid)
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PGA	Poliglikolik Asit
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-etansülfonik asit)
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
sn	Saniye
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletildiamin
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. İskelet kası yapısı	2
Şekil 2.1. Desen180 ve Desen 90 tasarımı	22
Şekil 2.2. Baskı görüntüleri kolajı	23
Şekil 3.1. Baskı sonrası a) açık örnek b) katlanmış örnek	30
Şekil 3.2. Farklı baskı parametreleri ile örneklerin katlanma davranışı	31
Şekil 3.3. Farklı baskı parametreleri ile örneklerin katlanma davranışının mikroskop görüntüsü	33
Şekil 3.4. Desen180 ve Desen 90 arasındaki katlanma davranış farkının gözlemlenmesi	33
Şekil 3.5. Desen180 ve Desen 90 arasındaki katlanma davranışının farkının zamana bağlı olarak gözlemlenmesi	34
Şekil 3.6. Örneğin sıcaklık uyarısına bağlı olarak zaman içinde şekil değiştirme davranışı	35
Şekil 3.7. Örneklerin zamana, sıcaklığa ve desene bağlı olarak katlanma davranışları	36
Şekil 3.8. Desensiz örneğin sıcaklık uyarısına bağlı olarak zaman içinde şekil değiştirme davranışı	36
Şekil 3.9. Örneğin desenli ve desensiz farklılığına bağlı olarak şekil değiştirme davranışının şematik gösterimi	36
Şekil 3.10. Örneğin sıcaklık uyarısı ve desen farklılığına bağlı olarak şekil değiştirme davranışının şematik gösterimi	37
Şekil 3.11. Örneğin sıcaklık uyarısı ve malzeme içeriğine bağlı olarak şekil değiştirme davranışının şematik gösterimi	37
Şekil 3.12. Ekstraksiyon sıvısı uygulamasından sonra, deney gruplarında 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde hücre tabakası yayılımındaki değişim (10x büyütme)	38
Şekil 3.13. Ekstraksiyon sıvısı uygulamasından sonra, deney gruplarında 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde hücre tabakası yayılımındaki değişim (40x büyütme)	38
Şekil 3.14. Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 72 saat sonra, deney gruplarına göre (a) canlı hücre sayısındaki değişim ve (b) hücre büyümesindeki % inhibisyon oranı, pozitif kontrol grubuna göre bağlı olarak değerlendirilmiştir	39
Şekil 3.15. Katlanmış örnek 3. gün hücre dağılımı (100 µm)	41
Şekil 3.16. Katlanmış örneklerde 3, 7 ve 14. günlerde hücre yayılımı, morfolojisi ve miyojenik farklılaşmanın gözlemlenmesi. DAPI mavi renk, Phalloidin yeşil renk ve Desmin kırmızı renk ile gösterilmektedir. (100 µm)	42

Şekil 3.17. Açık örneklerde 3, 7 ve 14. günlerde hücre yayılımı, morfolojisi ve miyojenik farklılaşmanın gözlemlenmesi. DAPI mavi renk, Phalloidin yeşil renk ve Desmin kırmızı renk ile gösterilmektedir. (100 µm)	43
Şekil 3.18. Desmin boyamasının görüntülerdeki renk yoğunluğu (*p>0,05)	44
Şekil 3.19. Katlanmış ve açık örneklerde 7 ve 14. günlerde hücre yayılımı SEM görüntüleri	44
Şekil 3.20. Alamar Blue analiz sonuçları (**p<0,005)	45
Şekil 4.1. Sitotoksiste hücre sayısı sonuçları (***p<0,0001)	47



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. AlgP(NIPAm)GelMa_y3 baskı parametreleri	21
Çizelge 2.2. Sitotoksisite testi değerlendirme kriterleri	25
Çizelge 2.3. Sitotoksik tepki indeksi ve sitotoksisite analizi	26
Çizelge 3.1. Sitotoksisite testi değerlendirme kriterlerine ait sonuçlar	40
Çizelge 3.2. Üretilen filmler için sitotoksisite değerlendirme sonuçları	40



1. GİRİŞ

1.1. İskelet Kası

İskelet kası, vücudun en esnek ve uyum sağlayabilen dokularından biri olarak öne çıkar. İnsan vücudundaki toplam ağırlığın yaklaşık %40'ını oluşturur ve vücut proteinlerinin büyük bir kısmını (%50-75) bünyesinde barındırır. Ayrıca, protein dönüşümünün %30-50'sini gerçekleştirerek metabolik denge açısından önemli bir rol oynar. Temel bileşenleri arasında su (%75), protein (%20) ve inorganik tuzlar, mineraller, karbonhidratlar ve yağlar (%5) yer alır. Kas kütlelerinin miktarı, protein sentezi ve yıkımı arasındaki hassas dengeye bağlıdır. Bu süreçler, fiziksel aktivite, beslenme, hormonal durum ve hastalık gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Kasın yapısal, kasılabilir ve düzenleyici proteinlerinin fonksiyonel katkıları, hareket kabiliyeti ve genel sağlık açısından önemli olduğu için bilimsel çalışmalarda geniş yer bulmaktadır (Frontera ve Ochala, 2015).

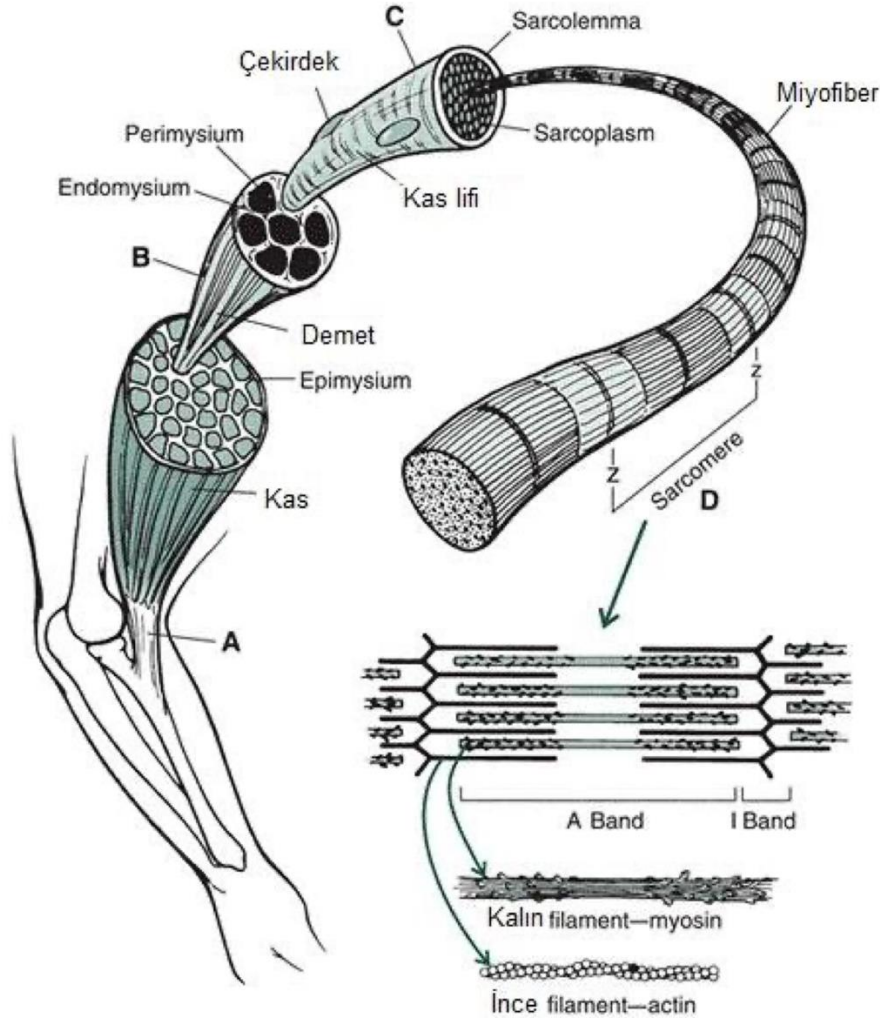
İskelet kası, hem mekanik hem de metabolik açıdan vücudun birçok işlevine destek verir. Mekanik olarak, kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye çevirerek hareket sağlar, güç ve kuvvet üretir, duruşu destekler ve günlük aktivitelerin gerçekleşmesine olanak tanır. Bu fonksiyonlar, bireyin sağlığını ve bağımsızlığını sürdürmesine önemli katkılar sunar. Metabolik açıdan bakıldığında ise kas dokusu, enerji metabolizmasının temel bir parçasıdır; amino asitler ve karbonhidratlar gibi enerji kaynaklarını depolar, vücut sıcaklığının korunması için ısı üretir ve fiziksel aktiviteler sırasında yakıt tüketiminde aktif bir rol oynar. Kas, ayrıca diğer dokuların ihtiyacı olan amino asitler için bir depo görevi görür. Açlık durumunda bu amino asitler, kan şekeri seviyesini sabit tutmaya yardımcı olur. Kas kütlelerinin azalması, stres ve kronik hastalıklara karşı vücudun savunma mekanizmasını zayıflatabilir, bu da kasın genel sağlık üzerindeki kritik rolünü ortaya koyar (Wolfe, 2006).

1.1.1. İskelet Kasının Yapısı

İskelet kası, birbirine paralel hizalanmış miyofiberlerden oluşan ve oldukça dinamik bir yapıya sahip bir dokudur. Anatomik olarak son derece düzenli bir organizasyon sergiler. İskelet kası, çok çekirdekli miyofiberlerin yanı sıra kan damarları, sinir ağı ve bu yapıları çevreleyen bağ dokularından meydana gelir. Miyofiber grupları, perimisyum adı verilen bağ dokusu ile kaplanırken, bu grupların dış kısmı epimisyum adı verilen bir başka bağ doku tabakası ile sarılır. Her bir miyofiber, uydu hücrelerini içeren bazal bir lamina ile

çevrenmiştir. Bu miyofiberler, miyoblastların bir araya gelerek oluşturduğu miyofibrillerden meydana gelir (Qazi vd., 2015).

Miyofibriller, sarkomerlerin tekrar eden birimlerinden oluşur ve bu yapı, kasın işlevsel organizasyonunun temelini oluşturur. Bu yapı Şekil 1.1.' de gösterilmiştir. Sarkomerler, aktin adı verilen ince filamentler ile miyozin adı verilen kalın filamentlerden meydana gelir ve bu düzenleme, iskelet kasının en küçük fonksiyonel birimini temsil eder. Kas dokusundaki hücresel organizasyon, dokunun fonksiyonlarıyla doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, kasın hiyerarşik yapısını geometrik olarak taklit etmek, hücre hizalamasını indüklemek ve miyojenik süreçte kritik bir adımı temsil etmek için önem taşır (Zhuang vd., 2020).



Şekil 1.1. İskelet kası yapısı (Serbest ve Eldoğan, 2014)

1.1.2. Ekstraselüler Matrisin Kompozisyonu

Ekstraselüler matris (ECM), hücre bileşenlerine yalnızca mekanik bir destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre davranışlarını yönlendiren önemli bir rol oynar. Bu nedenle, matrisin bileşiminin incelenmesi, hücre iskelesi üretiminde doğru malzeme seçiminde büyük önem taşır. İskelet kası, bazal lamina ve kas içi bağ dokularından oluşan kompleks bir yapıya sahiptir. Bazal lamina, sarkomer, miyofibril, miyofiber ve uydu hücrelerini bağ dokudan ayıran bir bariyer işlevi görür (Ahlstrom, 2019). Hücrelerin adhezyon, migrasyon, kaynaşma ve farklılaşma gibi aktiviteleri genellikle bu tabakanın altında gerçekleşir. Bu tabaka laminin, kollajen tip IV, nidojen ve perlekan gibi bileşenlerden oluşur.

Bağ dokunun düzenli yapısı üç temel katmandan meydana gelir. Endomisyum, bazal laminanın kapladığı her bir miyofiberi çevreler ve kolajen liflerden oluşur. Bir araya gelen miyofiber grupları, kolajen tip I bakımından zengin perimisyum ile sarılır. Bu yapının dış kısmı ise epimisyum adı verilen, kolajen bazlı bir lif tabakası ile kaplanır. Literatürde de görüldüğü gibi, iskelet kaslarının yapısal bütünlüğü, farklı tiplerde kolajen tarafından sağlanmaktadır. Bu bileşenlerin organizasyonu, kasın fonksiyonel yapısını ve onarım kapasitesini önemli ölçüde etkiler (Thorsteinsdóttir vd., 2011). Özellikle, ECM' nin yapısal bütünlüğü ve biyoaktif moleküllerinin varlığı, kasın rejenerasyon potansiyelini doğrudan etkiler.

1.1.3. Matris Sertliği

Hücrelerin davranışlarının, buldukları ortamın ve yüzeylerin mekanik özelliklerinden önemli ölçüde etkilendiği bilinmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma süreçleri, ortamın sertliği (stiffness) tarafından yönlendirilebilir. Örneğin, daha yumuşak yüzeylerde (0,1-1 kPa) nöronal fenotip geliştirme eğilimi gösterirken, sertliği 8-17 kPa arasında olan matrisler üzerinde miyojenik bir yönelim sergilerler (Engler vd., 2006). Sağlıklı kas dokusunun elastik modülü ortalama 12 kPa civarındayken, yaşlanmış, hasar görmüş veya dejenerasyona uğramış kas dokularının elastik modülü 18 kPa'nın üzerinde değerler alır (Gillies ve Lieber, 2011).

1.1.4. Kas Dokusunda Yaralanma

Kas dokusu yüksek yenilenme kapasitesine sahip dokulardan biridir. Ancak travma ve benzeri durumlar sonrası kas dokusunda kalıcı deformasyonlar oluşabilir. Mekanik travmalar, miyofiberlerin plazma membranında hasar oluşturarak hücrelerin ani nekrozuna yol açar. Bu

durum, sarkoplazmanın açığa çıkmasına ve yırtılmış miyofiberlerin tüm uzunluğu boyunca nekrozun yayılmasına neden olur. Bunun aksine, dolaylı yaralanmalar (örneğin, denervasyon, zorlanma veya iskemi) plazmalemmanın bozulmasına yol açar ve hücre dışı kalsiyumun miyofiberlere girişini tetikler. Sonuç olarak, çevredeki miyofiberler hiperkontraksiyona maruz kalır ve yoğun, düzensiz miyofilament kümelerine dönüşerek kasılma pıhtıları oluşturur. Bu süreç, hücre dışı ortamda düzenlenen bir protein kinaz kaskadını aktif hale getirir, lokal inflamasyonu tetikler ve kas dejenerasyonunu hızlandırır (Li vd., 2001).

İskelet kasının yüksek vaskülarizasyonu nedeniyle, yaralanan damarlardan kanama yaygındır ve hematoma oluşumu ile sonuçlanabilir. Hematom, kas dejenerasyon sürecinin erken aşamalarında ortaya çıkar ve inflamasyon ilerledikçe varlığını sürdürür. Lokal şişlik ve hematoma oluşumu, patolojik süreçlerin bir döngüye girmesine ve dejeneratif mekanizmaların aktive olmasına neden olur. Bu süreçler, yaralanan kasın iyileşme sürecini karmaşık hale getiren faktörler arasında yer alır ve fonksiyonelliğini azaltır (Crisco vd., 1994). Rejenerasyon sürecinde uygun mikro çevrenin sağlanması, ECM bileşenlerinin dengeli bir şekilde üretilmesi ve fibroblast-miyosit etkileşiminin optimize edilmesi kritik önem taşır (Grasman vd., 2015).

1.2. Doku Mühendisliği

Hasarlı veya işlevini yitirmiş dokuların yerine yeni ve fonksiyonel dokuların oluşturulması, modern tıpta büyük bir öneme sahiptir. Geleneksel yöntemler arasında hastanın kendisinden alınan dokunun (otogreftleme), başka bir bireyden alınan dokunun (allogreftleme) ve hayvan kaynaklı dokunun (zenogreftleme) kullanımı bulunmaktadır. Ancak, bu yaklaşımlar greft alınan bölgede komplikasyonlar, yeterli miktarda doku elde edilememesi, bağışıklık reddi ve hastalık bulaşma riski gibi sorunlarla karşı karşıya kalmaktadır. Bu bağlamda, sağlıklı ve uyumlu dokuların laboratuvar ortamında üretilmesi hedefiyle doku mühendisliği teknolojileri geliştirilmiştir.

Doku mühendisliği, mühendislik, tıp ve biyoloji disiplinlerinin prensiplerini birleştirerek, doku ve organların biyolojik işlevlerini destekleyen veya tamamen yerine geçen yapılar geliştiren çok disiplinli bir alandır. Bu yaklaşım, laboratuvar ortamında kişiye özgü dokuların üretilmesi yoluyla organ nakli bekleme listelerinin ortadan kaldırılmasını ve bağışıklık reddi riskinin azaltılmasını amaçlar (Khademhosseini ve Langer, 2016; Langer ve Vacanti, 1993).

Örnek çalışmalar arasında, 2006 yılında Anthony Atala ve ekibinin laboratuvar ortamında ürettikleri idrar kesesi yer almaktadır. Bu çalışmada, 4 ila 19 yaş aralığındaki hastalardan

alınan hücreler, kolajen ve poliglukolik asit (PGA) bazlı bir biyomalzeme üzerine ekilerek idrar kesesi geliştirilmiştir. Nakil işlemleri sonrası bu dokuların 7-8 hafta içinde mesane fonksiyonlarını desteklediği ve böbrek işlevlerinin stabil kaldığı gözlenmiştir (Atala vd., 2006). Benzer şekilde, 2008 yılında Macchiarini ve ekibi, hücreleştirilmiş kadavra kaynaklı bir soluk borusunu, hastadan alınan hücrelerle yeniden yapılandırarak nakletmiş ve hastanın bağışıklık sistemi baskılanmadan başarı elde edilmiştir. Bu tür gelişmeler, kişiselleştirilmiş doku mühendisliği yaklaşımlarının potansiyelini göstermektedir (Macchiarini vd., 2008).

Son yıllarda kas doku mühendisliği alanında da önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Örneğin, biyoyumlu polimerlerden oluşan iskelelerin kas hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını desteklediğini bildirmiştir (Zhang vd., 2023). Ayrıca, Li vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışma, hücre-matriks etkileşimlerinin optimize edilmesinin doku iskelelerinin performansını artırdığını göstermiştir (He ve Li, 2021).

Doku mühendisliği süreci, ana adımdan oluşur: (1) Hastadan alınan biyopsiler ile hücrelerin izole edilmesi, (2) bu hücrelerin laboratuvar ortamında çoğaltılması, (3) hücrelerin biyomalzemelerden üretilmiş bir doku iskelesi üzerine yerleştirilmesi, (4) biyoreaktörler ve büyüme faktörleri yardımıyla dokunun olgunlaştırılması ve (5) oluşturulan dokunun hastanın hasarlı bölgesine nakledilmesi. Bu süreç, doku mühendisliği teknolojilerinin multidisipliner yapısını açıkça ortaya koymaktadır.

Hücre kaynağı seçimi, doku mühendisliği uygulamalarının başarısı için kritik öneme sahiptir. Primer hücrelerin hedef dokudan elde edilmesi ideal bir yöntemdir, ancak izolasyon ve çoğaltma süreçlerindeki zorluklar bu yöntemi sınırlamaktadır. Bu nedenle, kök hücrelerin kullanımı önemli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Kök hücreler, kendini yenileme ve farklılaşma kapasiteleri sayesinde hem esnek hem de etkili bir çözüm sunmaktadır (Khademhosseini ve Langer, 2016).

Doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri de büyük bir öneme sahiptir. Doku iskeleleri, hücrelerin organize bir şekilde hedef dokuyu oluşturmasına olanak tanıyan üç boyutlu, biyoyumlu ve kontrollü bir yapı sağlar. İdeal bir doku iskelesi biyoyumlu olmalı, mekanik özellikleri hedef dokuya uygun olmalı ve hedef dokunun iyileşme hızına paralel olarak biyobozunur özellik göstermelidir. Doğal polimerler biyolojik uyum açısından avantaj sağlarken, sentetik polimerler ise mekanik dayanıklılık, kontrol edilebilirlik ve üretim kolaylığı gibi üstün özellikler sunmaktadır. Bu faktörler, kas doku mühendisliği alanında yenilikçi yaklaşımların temelini oluşturur.

1.3. Doku İskeleleri ve Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler

Doku mühendisliği uygulamalarında, doku iskeleleri hücrelerin organizasyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyen kritik yapılardır. Hedeflenen dokunun işlevselliğini yeniden kazandırmak veya iyileştirmek için tasarlanan doku iskeleleri, hücre dışı matrisin (ECM) doğal yapısını taklit etmeyi amaçlar. Bu yapılar hem mekanik destek sağlama hem de hücrelerin biyokimyasal sinyallerle etkileşimini yönlendirme açısından büyük bir öneme sahiptir.

Doku iskelelerinin tasarımında ve üretiminde dikkat edilmesi gereken temel kriterler vardır. Bir doku iskelesi, biyoyumlu olmalı, hedef doku ile mekanik uyum göstermeli ve biyobozunur özellikte olmalıdır. Bu özellikler, dokunun doğal rejenerasyon sürecini desteklemek için hayati önem taşır. Aynı zamanda, doku iskelesi gözenekli bir yapıya sahip olmalı ve hücrelerin tutunmasına, beslenmesine ve oksijen alımına olanak sağlamalıdır. Gözenek boyutu, hücre tipine ve hedeflenen dokuya bağlı olarak optimize edilmelidir. Özellikle kas doku mühendisliğinde, gözenekli yapıların hücrelerin hizalanmasını ve kasılma işlevlerini geliştirdiği gösterilmiştir (Khademhosseini ve Langer, 2016).

Doğal ve sentetik polimerler, doku iskelelerinin üretiminde en sık kullanılan malzeme gruplarını oluşturur. Doğal polimerler, biyolojik doku ile kimyasal ve biyolojik uyum sağlamaları nedeniyle avantajlıdır. Bununla birlikte, bu malzemeler genellikle mekanik dayanıklılık bakımından sınırlıdır ve üretim süreçlerinde standartlaşma zorlukları içerebilir. Sentetik polimerler ise, geniş bir üretim esnekliği ve mekanik dayanıklılık sunar. Ayrıca, sentetik polimerlerin kimyasal yapıları, hedeflenen dokuya uygun şekilde özelleştirilebilir (Pati vd., 2014).

Son yıllarda, doku mühendisliği uygulamalarında ileri üretim teknikleri, örneğin üç boyutlu (3B) biyoyazıcı teknolojileri, doku iskelelerinin daha karmaşık geometrilere ve biyomimetik özelliklerde üretilmesine olanak tanımıştır. Bu teknikler, doku iskelelerinin biyoyumluluğunu artırmanın yanı sıra, hücrelerin doğal ortamlarını taklit eden mikro yapılar oluşturarak rejeneratif süreci hızlandırmaktadır. Doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerin tasarımı, hem malzeme bilimi hem de biyoloji alanlarındaki multidisipliner çalışmaları gerektirmekte ve bu alanların birleşimi ile yenilikçi çözümler sunmaktadır.

Doku iskelesi teknolojileri, yalnızca doku rejenerasyonu için değil, aynı zamanda ilaç salım sistemlerinde ve hastalık modellerinin oluşturulmasında da kullanılmaktadır. Özellikle kas doku mühendisliğinde, kasılabilir yapılar ve biyomekanik özellikler sunan doku iskeleleri, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır.

1.3.1. Doğal Polimerler

Doğal polimerler, biyolojik kaynaklardan elde edilen ve biyoyumluluğu yüksek olan malzemelerdir. Hücre dışı matrisin yapısını ve işlevini taklit etme kapasiteleri nedeniyle, doku mühendisliği uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Kolajen, fibrin, jelatin, aljinat ve kitosan gibi doğal polimerler, hücrelerin tutunma, yayılma ve farklılaşma süreçlerini destekleyen özellikler sunar. Ancak bu malzemelerin kullanımı, bazı üretim ve uygulama sınırlamaları nedeniyle dikkatli bir şekilde optimize edilmelidir.

Kolajen ve Fibrin

Kolajen, vücutta en bol bulunan proteinlerden biridir ve birçok dokunun yapısal bütünlüğünü sağlayan temel bileşendir. Kolajen, fibroblast, kas hücreleri ve diğer hücre tipleri için ideal bir mikroçevre sunar. Hücrelerin fenotiplerini korumasına ve doğal işlevlerini sürdürmesine yardımcı olur (Chattopadhyay ve Raines, 2014). Fibrin ise, yara iyileşme süreçlerinde aktif rol oynayan bir polimerdir. Fibrin bazlı doku iskeleleri, hücrelerin hızlı proliferasyonunu ve doku bütünlüğünü destekleyen özelliklere sahiptir.

Aljinat

Aljinat, deniz yosunlarından elde edilen bir polisakkarit olup, biyolojik olarak inert ve toksik olmayan özellikleri ile öne çıkar. Aljinat bazlı doku iskeleleri, yüksek su tutma kapasitesi ve kolay şekillendirilebilirliği nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir (Ceccaldi vd., 2017; Chawla vd., 2020; Dutta vd., 2021; Wang vd., 2005). Doku mühendisliği alanında, aljinat bazlı iskelelerin kas hücrelerinin hizalanması ve fonksiyonel kasılma özelliklerini desteklediğine dair literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Bushkalova vd., 2019; De la Portilla vd., 2016). Örneğin, aljinat ve pektin bazlı jelleşme mekanizmalarını inceleyen bir derlemede, aljinatın biyoyumluluğu ve hücre etkileşimleri üzerindeki olumlu etkileri vurgulanmıştır (Cao vd., 2020; Davydova vd., 2024). Ayrıca, aljinatın iyonlarla indüklenen jelleşme süreçleri ve uygulamaları üzerine yapılan bir incelemede, aljinat iskelelerinin hücre hizalanması ve kasılma fonksiyonları üzerindeki etkileri ele alınmıştır (Hu vd., 2021; Kuo ve Ma, 2001).

Jelatin ve Kitosan

Jelatin, kolajenin hidrolizi ile elde edilen bir protein olup, biyobozunur ve biyoyumlu özellikleriyle dikkat çeker. Hücre tutunmasını ve çoğalmasını destekleyen yüzey özellikleri sayesinde, jelatin bazlı doku iskeleleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Jiang vd., 2017; Asadpour vd., 2020). Kitosan ise, kitin kaynaklı bir polisakkarit olup, antimikrobiyal özellikleri ve biyobozunurluğu ile dikkat çeker (Kong vd., 2010; Confederat vd., 2021). Kitosan bazlı iskeleler, özellikle kas hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyen özelliklere sahiptir (Zakhem vd., 2012).

Doğal polimerlerin avantajları arasında biyoyumluluk, biyobozunurluk ve hücre ile etkileşim potansiyelleri bulunurken, dezavantajları arasında immün reaksiyon riski, mekanik dayanıklılık eksikliği ve üretim süreçlerindeki değişkenlikler sayılabilir (Puertas-Bartolomé vd., 2021; Samadian vd., 2020). Ancak, bu malzemelerin sentetik polimerlerle kombinasyonu, doku mühendisliği uygulamalarında daha optimize ve etkili sonuçlar elde edilmesine olanak tanımaktadır.

1.3.2. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler, biyomühendislik uygulamalarında önemli bir yere sahiptir ve geniş üretim kapasitesi, mekanik dayanıklılık ve kontrol edilebilir özellikleri nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Sharma vd., 2021; Terzopoulou vd., 2022). Bu polimerler, kimyasal yapılarının kolayca değiştirilebilmesi ve fiziksel özelliklerinin hedeflenen dokuya uygun şekilde optimize edilebilmesi sayesinde, doku mühendisliği uygulamalarında esneklik sağlar (Asghari vd., 2017; Terzopoulou vd., 2022).

Poli(laktik asit) (PLA) ve Poli(glikolik asit) (PGA)

PLA ve PGA, biyobozunur özellikleri ile dikkat çeken iki önemli sentetik polimerdir. PLA, düşük bozunma hızına ve yüksek mekanik dayanıklılığa sahip bir polimerdir. Doku mühendisliği uygulamalarında genellikle hücresel destek yapıların oluşturulmasında kullanılır (Athanasίου vd., 1998). PGA ise daha hızlı bozunma özelliği ile özellikle geçici doku destek iskelelerinde kullanılır (Kundak ve Bilisik, 2023). PLA ve PGA'nın kopolimeri olan PLGA, her iki polimerin avantajlarını birleştirerek farklı uygulama alanları için optimize edilebilir (Samadi vd., 2019).

Poli(kaprolakton) (PCL)

PCL, uzun zincirli yapısı ve düşük erime sıcaklığı nedeniyle biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilen bir polimerdir (Malikmammadov vd., 2018). Yüksek esneklik ve mekanik dayanıklılık sunan bu malzeme, özellikle yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir. PCL'nin yavaş bozunma hızı, uzun süreli doku destek yapılarının oluşturulmasında avantaj sağlar (Backes vd., 2022; Dias vd., 2022).

Poliüretanlar (PU)

Poliüretanlar, elastomerik yapıları ve yüksek mekanik dayanıklılıkları ile öne çıkan sentetik polimerlerdir. Yumuşak ve sert segmentlerin ardışık olarak birleştirilmesi ile oluşturulan PU'lar, biyobozunur özellikler kazandırılarak çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Naureen vd., 2021; Singh vd., 2023). Özellikle kas doku mühendisliğinde, PU bazlı iskeleler hücre proliferasyonunu ve hizalanmasını destekleyen üstün özellikler göstermektedir (Farzan vd., 2020; Jia vd., 2013).

Hidrojel Bazlı Sentetik Polimerler

Hidrojeller, yüksek su tutma kapasiteleri ve biyoyumlu özellikleri nedeniyle dikkat çeker. Sentetik hidrojel polimerleri, kimyasal olarak modifiye edilerek hedef dokuya uygun özelliklerde üretilebilir (Choi vd., 2024; Farzan vd., 2020). Özellikle kas dokusunun elastikiyetini ve kasılma işlevlerini desteklemek amacıyla geliştirilen iletken hidrojeller, doku mühendisliği alanında önemli bir yenilik sunmaktadır (Tijore vd., 2018).

Sentetik polimerlerin avantajları arasında geniş üretim esnekliği, mekanik dayanıklılık ve biyobozunurluk yer alırken, dezavantajları arasında biyoyumluluk açısından doğal polimerlere kıyasla daha sınırlı bir etki göstermeleri sayılabilir. Bununla birlikte, doğal ve sentetik polimerlerin kombinasyonu, doku mühendisliği uygulamalarında daha optimize ve etkili sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır.

1.4. Doku İskelesi Üretim Metotları

Doku iskelelerinin üretiminde kullanılan yöntemler, iskeletin mimarisini ve hücrelerin bu yapı üzerindeki davranışlarını belirler. Hücre dışı matriksin (ECM) biyomimetik yapısını taklit etmek, doku mühendisliğinde kritik bir hedef olarak öne çıkmaktadır (Cengiz vd., 2018; Kumar ve Sharma, 2021). Özellikle kas hücrelerinin hizalanması ve fonksiyonel kasılma

kapasitelerinin artırılması için, iskelelerin üç boyutlu (3B) gözenekli yapılar şeklinde tasarlanması gereklidir. Gözenek boyutlarının ve yapısal düzenin kontrol edilmesi, hücrelerin tutunma, çoğalma ve organizasyon süreçlerini optimize etmek için temel öneme sahiptir (Frith vd., 2014; Garrison vd., 2021; Sarkar vd., 2006).

Farklı malzeme türleri ve üretim teknikleri, doku iskelelerinin özelliklerini optimize etmek için kullanılır. Polimer bazlı doku iskelelerinin üretimi, dondurarak kurutma, çözücü döküm, gaz köpükleştirme gibi yöntemlerle gerçekleştirilebileceği gibi, son yıllarda gelişen biyoyazıcı teknolojileri ile daha kompleks ve biyomimetik yapılar üretilebilmektedir (Hollister vd., 2002; Kumar ve Sharma, 2021; Russo vd., 2024).

Doku iskelelerinin üretiminde kullanılan geleneksel yöntemler arasında dondurarak kurutma, çözücü döküm ve gaz köpükleştirme yöntemleri yer almaktadır. Bu yöntemlerle oluşturulan iskeleler, gözenek yapısı ve mekanik dayanıklılık açısından optimize edilebilmektedir. Bununla birlikte, elektro-eğirme ve ıslak eğirme teknikleri gibi yöntemler, fiber tabanlı yapıların üretimi için yaygın bir şekilde tercih edilmektedir. Bu yöntemlerin her biri, kas hücreleri gibi spesifik hücre türleri için mikroçevreyi uyarlama yeteneğine sahiptir (Kumar ve Sharma, 2021; Loh ve Choong, 2013; Moroni vd., 2006).

Son yıllarda, 3B biyoyazıcı teknolojileri, doku mühendisliği alanında büyük bir yenilik olarak ortaya çıkmıştır. Bu teknoloji, katmanlı üretim prensibi ile çalışarak hücrelerin ve biyomalzemelerin hassas bir şekilde birleştirilmesine olanak tanır (Gu vd., 2016; Mandrycky vd., 2016). 3B biyoyazıcılar ile özelleştirilmiş doku iskeleleri tasarlanabilir, bu da hücrelerin organizasyonu ve doku rejenerasyonu süreçlerinde önemli avantajlar sağlar (Matai vd., 2020; Yazdanpanah vd., 2022). Gelecekte, bu yöntemle üretilen yapılar, organ yetmezliği ve doku kaybı gibi sorunlara karşı etkili çözümler sunabilir.

Dondurarak Kurutma

Dondurarak kurutma yöntemi, polimer çözeltilisinin düşük sıcaklıklarda hızlı bir şekilde dondurulmasını ve ardından yüksek vakum altında suyun buharlaştırılarak uzaklaştırılmasını temel alır. Bu işlem sırasında polimer çözeltilisindeki su molekülleri donarak kristaller oluşturur ve bu kristaller kurutma aşamasında buharlaşarak gözenekli bir yapı meydana getirir (Lee vd., 2020; Mokhova vd., 2024). Bu yöntemin en büyük avantajlarından biri, büyük gözenekler oluşturma kapasitesidir. Gözenek boyutları genellikle 500 µm civarında olmakla birlikte, homojen bir gözenek yapısının elde edilmesi zordur (Grenier vd., 2019; O'Brien vd., 2004).

Dondurarak kurutma yöntemiyle üretilen iskeleler, kas hücrelerinin uzunlamasına hizalanmasını destekleyen mikro yapılar oluşturabilir (Basurto vd., 2022). Ancak, bu yöntemin dezavantajları arasında gözenek boyutunun tam olarak kontrol edilememesi ve mekanik dayanıklılığın optimize edilmesindeki zorluklar yer alır. Bu nedenle, dondurarak kurutma işlemi genellikle diğer yöntemlerle birleştirilerek daha kompleks ve biyomimetik yapılar elde edilmeye çalışılır (Buttafoco vd., 2006).

Son yıllarda, dondurarak kurutma yönteminin farklı varyasyonları geliştirilmiştir. Örneğin, kriyojenik çözücü teknikleri ve donma hızı kontrol sistemleri, gözenek yapısının homojenliğini artırmada etkili olmuştur (da Silva vd., 2024; Demir, 2014; Van Vlierberghe vd., 2007; Yang ve Liu, 2020). Bu iyileştirmeler, kas doku mühendisliği gibi spesifik uygulamalarda hücrelerin daha etkili bir şekilde organize olmasını sağlamaktadır (Huang vd., 2003).

Sonuç olarak, dondurarak kurutma yöntemi, doku iskelelerinin üretiminde önemli bir yere sahip olmakla birlikte, biyomimetik özellikleri optimize etmek için ek tekniklerle birleştirilmesi gereken bir yöntemdir. Özellikle kas doku mühendisliği alanında, bu yöntemin uyarlanabilirliği ve gözenekli yapı oluşturma kapasitesi, hücre davranışlarını yönlendirmek için kritik bir rol oynar.

Çözücü Döküm ve Parçacık Uzaklaştırma

Çözücü döküm ve parçacık uzaklaştırma yöntemi, doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen bir üretim tekniğidir. Bu yöntem, polimer çözeltilisinin gözenek oluşturucu parçacıklarla karıştırılmasını ve ardından parçacıkların uygun bir çözücü yardımıyla uzaklaştırılmasını içerir (Duarte vd., 2013; Suh vd., 2002). Bu işlem sırasında, gözenek oluşturucu parçacıkların boyutu ve dağılımı, elde edilecek iskelelerin gözenek yapısını ve mekanik özelliklerini doğrudan etkiler. Gözenek boyutları genellikle 500 µm civarında olup, bu boyutlar hücrelerin tutunması, yayılması ve çoğalması için idealdir (Chia vd., 2019; Mao vd., 2018).

Bu yöntemin önemli avantajlarından biri, gözenek boyutunun kontrol edilebilir olması ve farklı doku tipleri için uyarlanabilir bir yapı sunmasıdır. Ayrıca, mekanik dayanıklılığı yüksek doku iskelelerinin üretimine olanak tanır (Prasad vd., 2017; Suh vd., 2002). Örneğin, kas doku mühendisliğinde, bu yöntemle üretilen iskelelerin hücre hizalanmasını ve kasılma özelliklerini desteklediği gösterilmiştir (Lee vd., 2008; Rogers, 2011). Özellikle, bu iskelelerin esneklik ve biyoyumumluluk gibi özelliklerinin optimize edilmesi, kas hücrelerinin fonksiyonel rejenerasyonunu artırabilir.

Ancak, çözücü döküm ve parçacık uzaklaştırma yönteminin bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Gözenek oluşturuç parçacıkların tamamen uzaklaştırılması, üretim sürecinde kimyasal saflık açısından zorluklar yaratabilir. Ayrıca, kullanılan çözücülerin toksik etkilerinden kaçınılması için biyouyumlu çözücüler tercih edilmelidir. Gözeneklerin homojen dağılımının sağlanması da bu yöntemin zorluklarından biridir. Bu zorluklara rağmen, bu yöntemle üretilen doku iskeleleri, biyomimetik yapılar oluşturma potansiyeli nedeniyle önemli bir üretim tekniği olarak değerlendirilmektedir.

Son yıllarda, bu yöntemin daha ileri versiyonları geliştirilmiştir. Çözücü oranlarının optimize edilmesi, düşük toksisiteye sahip çözücülerin kullanılması ve gözenek oluşturuç parçacıkların nano boyutlarda tercih edilmesi gibi yenilikler, daha homojen ve işlevsel doku iskelelerinin üretimini mümkün kılmaktadır (Mi vd., 2016; Wu vd., 2018). Ayrıca, nanoteknolojinin bu yöntemle entegrasyonu, doku mühendisliğinde ileriye dönük yeni uygulama alanları sunmaktadır.

Sonuç olarak, çözücü döküm ve parçacık uzaklaştırma yöntemi, gözenek yapısının kontrol edilebilmesi, yüksek mekanik dayanıklılık ve biyomimetik özellikler sunması nedeniyle kas doku mühendisliği gibi spesifik uygulamalar için ideal bir üretim yöntemidir. Bu teknik, mikroçevrenin hücresel ihtiyaçlara uygun hale getirilmesiyle hücre davranışlarını olumlu yönde etkileyerek rejenerasyon süreçlerine katkıda bulunmaktadır.

Gaz Köpükleştirme

Gaz köpükleştirme yöntemi, polimer çözeltilisine gaz kabarcıklarının dahil edilmesiyle gözenekli bir yapı oluşturulmasını sağlar. Gaz kabarcıkları, polimerin katılaşması sırasında çözeltiden uzaklaşarak, gözenekli bir iskele meydana getirir. Bu yöntemin en dikkat çeken özelliklerinden biri, 200 ila 500 µm arasında değişen gözenek boyutlarına sahip iskeleler üretebilmesidir. Gözeneklerin boyutu ve dağılımı, gaz köpükleştirme sürecinde kullanılan gazın türüne, basınca ve polimer çözeltilisinin özelliklerine bağlı olarak değiştirilebilir (Barbetta vd., 2009; Manavitehrani vd., 2019).

Gaz köpükleştirme yöntemiyle üretilen iskeleler, kas doku mühendisliği gibi uygulamalar için uygun bir mikroçevre sunar. Gözenekli yapı, hücrelerin tutunmasını ve organizasyonunu desteklerken, aynı zamanda besin ve oksijen difüzyonunu kolaylaştırır (Chen vd., 2021; Poursamar vd., 2015). Özellikle kas hücrelerinin uzunlamasına hizalanması ve kasılma fonksiyonlarının geliştirilmesi için optimize edilmiş gaz köpükleştirme protokolleri kullanılmaktadır (Ng vd., 2019).

Bu yöntemin avantajları arasında, üretim sürecinin basitliği ve geniş bir malzeme yelpazesıyla uygulanabilirliği bulunmaktadır. Ayrıca, gaz köpükleştirme yöntemi toksik olmayan gazlar kullanılarak biyouyumlu iskeleler üretmek için ideal bir seçenektir. Ancak, bu yöntemde gözenek boyutlarının ve homojenliğinin tam olarak kontrol edilmesi zor olabilir. Özellikle kas doku mühendisliği gibi hassas uygulamalar için, gaz kabarcıklarının düzenli bir şekilde dağılımını sağlamak üzere süreç parametrelerinin dikkatle optimize edilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda, gaz köpükleştirme yönteminin daha ileri tekniklerle birleştirilmesi, homojen gözenek yapılarının elde edilmesini sağlamıştır. Örneğin, polimer çözeltilisine manyetik alan uygulanarak gaz kabarcıklarının yönlendirilmesi, gözeneklerin düzenli bir şekilde oluşmasını destekler (Xu vd., 2011). Ayrıca, bu yöntem nanoteknolojik uygulamalarla birleştirilerek daha dayanıklı ve işlevsel doku iskeleleri üretmek için kullanılmaktadır (Chen vd., 2020).

Gaz köpükleştirme yöntemi, biyomimetik doku iskelelerinin üretiminde büyük bir potansiyel sunmaktadır. Bu yöntemle üretilen yapıların, kas hücrelerinin organizasyonu ve fonksiyonel rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkileri, bu tekniğin doku mühendisliğinde değerli bir araç olduğunu göstermektedir.

Islak Eğirme ve Elektro-Eğirme

Islak eğirme ve elektro-eğirme yöntemleri, fiber tabanlı 3B doku iskeleleri üretmek için sıklıkla kullanılan tekniklerdir. Bu yöntemler, polimer çözeltilisinden ince fiberlerin üretilmesini ve bu fiberlerin düzenlenerek doku iskelesi oluşturmasını sağlar. Özellikle kas hücreleri için, bu tekniklerin sunduğu mikroçevre, hücrelerin hizalanmasını ve fonksiyonel organizasyonunu destekler (Baker vd., 2006; Guo vd., 2019; Sonseca vd., 2020).

Islak eğirme yöntemi, bir polimer çözeltilisinin kapiler tüpten bir çöktürme banyosuna geçirilmesiyle fiberlerin oluşumunu içerir. Bu süreçte polimer çözeltisi, çöktürme banyosundaki çözücü ile temas ederek hızla katılaşır ve fiberler halinde toplanır (Cui vd., 2020; Tian vd., 2023). Islak eğirme yöntemi, genellikle büyük ölçekli üretim için uygundur ve biyouyumlu malzemeler kullanılarak doku mühendisliği uygulamaları için esnek çözümler sunar (Lüken vd., 2021). Bu teknikle üretilen fiberlerin kalınlığı, kullanılan polimerin konsantrasyonu ve çöktürme banyosunun koşullarına bağlı olarak kontrol edilebilir. Islak eğirme ile üretilen doku iskeleleri, kas hücrelerinin doğal uzunlamasına düzenini taklit eden yapılar oluşturmak için idealdir (Elsayed vd., 2016; Zhang vd., 2014).

Elektro-eğirme, bir polimer çözeltisinin yüksek voltajlı bir elektrik alan etkisiyle fiberlere dönüştürülmesini sağlar. Bu yöntem, nano ve mikrofiberlerin üretimi için son derece uygundur ve doku mühendisliği uygulamalarında geniş bir kullanım alanına sahiptir (Rahmati vd., 2021; Zulkifli vd., 2023). Elektro-eğirme işlemi sırasında, polimer çözeltisi bir iğne ucundan dışarı itilerek elektrik alan tarafından çekilir ve fiberler bir toplayıcı yüzeye biriktirilir. Bu fiberlerin çapı, polimerin viskozitesi, uygulanan voltaj ve toplayıcı yüzeyin özellikleri gibi çeşitli parametrelerle kontrol edilebilir (Cramariuc vd., 2013; Fridrih vd., 2003).

Elektro-eğirme ile üretilen fiberler, hücrelerin tutunmasını ve büyümesini destekleyen yüksek yüzey alanına sahiptir. Ayrıca, fiberlerin yönlendirilmesi, kas hücrelerinin hizalanmasını ve fonksiyonel kasılma kapasitelerinin artırılmasını sağlar (Yi vd., 2019; Zhou vd., 2015). Özellikle uzunlamasına hizalanmış elektro-eğirilmiş fiberler, kas doku mühendisliğinde hücrel organizasyonu teşvik etmek için ideal bir mikroçevre sunar.

Bu tekniklerin her ikisi de fiberlerin taşıyıcı yüzeylere sarılması ve çok katmanlı yapıların oluşturulması gibi ileri işlemlerle birleştirilebilir. Son yıllarda, elektro-eğirme ve ıslak eğirme yöntemlerinin nanoteknoloji ile birleştirilmesi, daha dayanıklı ve işlevsel doku iskeleleri üretmek için yeni fırsatlar sunmaktadır. Ayrıca, bu tekniklerin 3B biyoyazıcı teknolojileri ile entegrasyonu, kas doku mühendisliği için daha özelleştirilmiş çözümler geliştirilmesini sağlamaktadır.

3B Biyoyazıcılar

Üç boyutlu (3B) biyoyazıcılar, doku mühendisliği alanında yenilikçi bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu teknoloji, katmanlı üretim prensibi ile çalışır ve biyomalzemelerin, hücrelerin ve biyomoleküllerin kontrollü bir şekilde biriktirilmesini sağlayarak karmaşık biyolojik yapılar oluşturur. Biyoyazıcı teknolojisi, diğer doku iskelesi üretim yöntemlerine kıyasla daha fazla tasarım özgürlüğü ve hassasiyet sunar (Chae vd., 2023; Cui vd., 2017; Zhang vd., 2018).

3B biyoyazıcılar, farklı hücre türleri ve biyomalzemelerle çalışabilecek şekilde uyarlanabilir. Bu teknolojinin en büyük avantajlarından biri, birebir hastaya özel tasarlanmış iskelelerin üretilmesidir. Özellikle kas doku mühendisliğinde, bu teknoloji, hücrelerin doğal hizalanmasını sağlayan ve kasılma işlevlerini optimize eden yapılar oluşturmak için kullanılabilir (Dickman vd., 2020; Luo vd., 2024; Yipeng vd., 2017).

3B biyoyazıcıların farklı türleri bulunmaktadır. Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcılar, biyomalzemeleri bir iğne aracılığıyla tabaka tabaka biriktirerek çalışır. Bu yöntem, gözenekli yapılar ve karmaşık geometrik tasarımlar oluşturmak için idealdir (Mandrycky vd., 2016; Richard vd., 2020). Damlacık tabanlı biyoyazıcılar ise, biyomolekülleri ve hücreleri damlacıklar halinde substrat üzerine yerleştirir (Gudapati vd., 2016). Reçine tabanlı sistemler, ışığa duyarlı malzemeleri kullanarak yüksek çözünürlükte yapıların üretilmesine olanak tanır (Lim vd., 2018; Viray vd., 2022).

Kas doku mühendisliği uygulamalarında, 3B biyoyazıcılar hem mekanik hem de biyokimyasal olarak optimize edilmiş mikroçevreler oluşturabilir. Örneğin, hidrojel tabanlı malzemeler kullanılarak esnek ve biyouyumlu iskeleler üretilmiş, bu yapıların kas hücrelerinin proliferasyonunu ve hizalanmasını artırdığı gösterilmiştir (Dickman vd., 2020; Laternser vd., 2018). Ayrıca, bu teknoloji ile damar dokularının birebir geometrik modelleri üretilerek kan akışının simülasyonu yapılabilmektedir (Chae vd., 2023).

3B biyoyazıcıların gelecekteki potansiyelleri oldukça geniştir. Organ nakli bekleyen hastalar için tam fonksiyonel organların üretilmesi, ilaç testlerinde bireyselleştirilmiş modellerin kullanılması ve biyomimetik doku iskelelerinin seri üretimi gibi uygulamalar bu teknolojinin sunduğu imkanlardan sadece birkaçıdır. 3B biyoyazıcılar, doku mühendisliği alanında biyolojik işlevsellik, hassasiyet ve hastaya özgü çözümler sunarak devrim yaratma potansiyeline sahiptir.

Akıllı malzemelerden üretilen yapılar, çevredeki uyaranlara bağlı olarak kendiliğinden belirli bir şekil alabilme veya önceden tanımlanmış bir işlevi yerine getirebilme kapasitesine sahiptir (Tibbits, 2014). 4B baskılama, 3B baskı teknolojisine dayalı bir üretim süreci ile başlar, ancak basım sonrası malzemenin çevresel uyaranlar yoluyla şekil değiştirerek nihai yapısını oluşturmasını sağlar. Bu nedenle, 3B ve 4B baskı arasındaki temel fark, kullanılan malzemelerin statik (3B) veya dinamik (4B) özelliklere sahip olmasından kaynaklanır.

Bir yapının 4B baskı yöntemiyle üretilmiş sayılabilmesi için "şekil hafızası" ya da "kendiliğinden hareket" gibi en az bir akıllı davranış sergilemesi gerekmektedir (Raviv vd., 2014). 4B baskılama, 3B baskının ötesine geçerek, yapıların zamanla şekil değiştirmesini veya belirli bir işlevi gerçekleştirmesini mümkün kılar. Bu özellik, 3B baskı teknolojisinin en büyük sınırlamalarından birini ortadan kaldırarak, daha esnek ve dinamik yapılar üretme olanağı sunar.

1.5. Akıllı Malzemeler ve 4B Basım

Akıllı malzemeler, dışsal bir uyarana örneğin, sıcaklık, nem, ışık, manyetik alan veya pH seviyesindeki değişikliklere yanıt olarak fiziksel ya da kimyasal özelliklerinde kontrollü değişiklikler yapabilen malzemeler olarak tanımlanır (Khoo vd., 2015). Bu sayede, 4B baskılama ile üretilen yapılar, belirli uyaranlara maruz kaldığında şekil, renk, işlev veya diğer özelliklerini değiştirebilir. Bu teknoloji, üretim sonrası gerekli ek işlemleri veya özel cihazların kullanımını ortadan kaldırarak üretim süreçlerini basitleştirebilir ve hızlandırabilir. Örneğin, implantasyon öncesinde basit bir şekilde üretilen doku iskeleleri, vücuda yerleştirildikten sonra karmaşık bir yapıya kendiliğinden dönüşebilir. Böylece, biyomedikal mühendislik uygulamaları için karmaşık yapıların üretimi daha verimli hale gelir (Miao vd., 2016).

3B baskılama teknikleri, biyomalzeme üretimi ve doku mühendisliği gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hastaya özgü şekil ve organizasyona sahip yapıların gerekliliği, 4B baskılama teknolojisinin bu alanlara entegrasyonuna ilham vermiştir. Akıllı malzemelerin farklı uyaranlara nasıl tepki verdiği konusunda bilgi birikimi artmış olsa da bu malzeme ve uyaranların çeşitliliği hala sınırlıdır. Günümüzde, birden fazla uyarana yanıt verebilen yeni malzemelerin geliştirilmesi, popüler bir araştırma alanı olarak ön plana çıkmaktadır.

1.6. Gerekçe ve Amaç

Kas dokusu, yaralanmalar sonrasında kendini yenileyebilme potansiyeline sahip olsa da, büyük hacimli yaralanmalarda bu doğal yenilenme mekanizması yetersiz kalmaktadır. Özellikle ciddi travmalar veya cerrahi müdahaleler sonrası, kas kaybı bölgesinde genellikle işlevsel olmayan bir yara dokusu oluşur. Bu tür durumlarda, tedavi seçenekleri sınırlı olup, genellikle otolog kas transferine başvurulmaktadır. Bu yöntem, sağlıklı ve vaskülarize edilmiş bir kas dokusunun yaralı bölgeye nakledilmesi esasına dayanır. Ancak, donör bölgede olası komplikasyonlar, uzun rehabilitasyon süreçleri ve tam işlevselliğin sağlanamaması gibi faktörler, bu yöntemin verimliliğini kısıtlamaktadır. Alternatif yaklaşımlar geliştirme ihtiyacı, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında yeni stratejilerin önünü açmıştır.

Doku mühendisliği, biyoyumlu malzemeler ve canlı hücreler kullanılarak, hasar görmüş dokuların yerine geçebilecek yapılar üretmeyi hedefler. Bu bağlamda, 3B biyobaskı teknolojisi, hücreler ve biyomalzemelerin üç boyutlu bir düzende birleştirilmesiyle işlevsel dokular üretme potansiyeli sunmaktadır. Ancak, doğal dokuların sahip olduğu karmaşık yapılar günümüzdeki mevcut teknolojilerle birebir üretilmemektedir. Bu durum, 4B

biyobaskı teknolojisinin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır. 4B biyobaskı, çevresel uyaranlara (örneğin sıcaklık, nem, pH değişiklikleri) duyarlı akıllı malzemelerin kullanımıyla, basılan yapının zamanla şekil değiştirebilmesini sağlar. Bu yöntem hem tasarım hem de işlevsellik açısından daha ileri düzeyde dokuların üretilmesine olanak tanımaktadır.

Bu tez çalışmasının temel amacı, 4B biyobaskı teknolojisi kullanılarak, laboratuvar ortamında kompleks kas dokuları üretmektir. Bu hedef doğrultusunda, sıcaklık duyarlı poli N-akrilamid (P(NIPA)) içeren bir biyomürekkep geliştirilmiş ve bu mürekkep farklı biyomalzemelerle birleştirilmiştir. Hazırlanan biyomürekkep, 3B biyobaskı yöntemiyle basılmış ve sıcaklık uyarını aracılığıyla katlanma mekanizması kontrol edilmiştir. Daha sonra, üretilen doku iskeletine statik kültür uygulanarak hücresel olgunlaşma ve farklılaşma süreçleri incelenmiştir. Çalışmada, kullanılan biyomürekkep ve doku iskeletinin hem biyoyumlu hem de hücresel faaliyetleri destekleyici özelliklere sahip olması sağlanmıştır.

Doğal kas dokusunun embriyonik gelişim süreçlerinde elde ettiği kompleks yapıyı taklit etmek, bu çalışmanın ana odak noktalarından biridir. Bu bağlamda, kullanılan malzemelerin toksik olmayan çapraz bağlama ajanları içermesi, düşük sıcaklıklarla şekil değiştirme mekanizmalarına uygun olması ve hücrelerin tutunma, çoğalma ve yayılma süreçlerini desteklemesi hedeflenmiştir. Özellikle P(NIPA) gibi sıcaklık duyarlı hidrojel, bu çalışmada şekil değişim kontrolünde önemli bir rol oynamıştır. Yapılan deneyler, bu hidrojin düşük sıcaklıklarda güvenilir bir şekilde şekil değiştirme yeteneğine sahip olduğunu ve hücresel faaliyetler açısından da uygun bir ortam sunduğunu ortaya koymuştur.

4B biyobaskı teknolojisinin en önemli avantajlarından biri, karmaşık geometrik yapıların daha basit formlar üzerinden üretilip, çevresel uyaranlarla istenilen son şekle dönüştürülmesidir. Bu yaklaşım, yalnızca biyolojik uygulamalarla sınırlı kalmayıp, diğer mühendislik disiplinlerinde de geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Ancak, biyolojik uygulamalarda, akıllı malzemelerin ve biyomürekkeplerin hücrelerle uyumlu olması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma, bu gereklilikleri karşılayarak hem biyolojik uyumluluğu yüksek hem de işlevsel özelliklere sahip doku iskeletleri üretmeyi başarmıştır. Sonuç olarak, bu tez çalışması, 4B biyobaskı teknolojisinin kas doku mühendisliği alanındaki potansiyelini ortaya koymaktadır. Elde edilen sonuçlar, sıcaklık duyarlı hidrojel ve biyoyumlu malzemelerin kullanımıyla, işlevsel kas dokularının üretilebileceğini göstermektedir. Bu çalışma, gelecekte 4B biyobaskı yönteminin daha geniş çaplı biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmesine dair önemli bir temel sunmaktadır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu tez kapsamında C2C12 fare miyoblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı ATCC (ABD) şirketinden alınmıştır ve deneyde devam pasajları kullanılmıştır. Hücre tipleri ve besiyeri özellikleri aşağıda gösterilmiştir.

- Hücre hattı: C2C12- Fare Miyoblast
- Kullanılan besiyeri: Biological Industries
- Besiyeri özelliği: Çoğaltma
- Ortam içeriği: DMEM (yüksek glukoz) içinde %10 FBS %1 P/S

Bu tez çalışmasında iki farklı taşıyıcı iskele sistemi denenmiştir. İlk taşıyıcı iskele kapsamında, N-izopropilakrilamid (NIPAm) %97, N,N'-metilenbis(akrilamid) (MBA) %99, amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) %99,5 ve kalsiyum klorür (CaCl₂) %99 saflıkta olmak üzere Sigma Aldrich'ten (ABD) temin edilmiş ve herhangi bir işlem yapılmadan doğrudan kullanılmıştır. Ayrıca sodyum aljinat (çok düşük viskozite) ChemCruz' dan (ABD) temin edilerek doğrudan kullanılmıştır.

İkinci taşıyıcı iskele kapsamında ilk taşıyıcı iskeleye ek olarak, Tip A domuz derisi jelatini, metakrilik anhidrit (MAA) %94 Sigma Aldrich'ten (ABD) temin edilmiş ve herhangi bir işlem yapılmadan doğrudan kullanılmıştır. SnakeSkin™ diyaliz tüpü (10K MWCO, 22 mm) ThermoFisher (ABD)'den satın alınmıştır.

Hücreli basım ve sonrasında hücre farklılaşması için hücre tipi ve besiyeri özellikleri aşağıda gösterilmiştir.

- Hücre hattı: C2C12- Fare Miyoblast
- Kullanılan besiyeri: Biological Industries
- Besiyeri özelliği: Farklılaştırma
- Ortam içeriği: DMEM (düşük glukoz) içinde %10 HS, %1 P/S

3B basım çalışmalarında kullanılan plunger, iğne ucu ve diğer gerekli sarf malzemeleri, EnvisionTech (Almanya) firmasından temin edilmiş ve deneylerde kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında ihtiyaç duyulan DMEM (yüksek ve düşük glikoz içerikli) ve at serumu

(Horse Serum (HS)) Biological Industries (İsrail) şirketinden, fetal bovin serum (FBS), penisilin-streptomisin (P-S), at serumu (HS), bovin serum albümin (BSA) ve tripsin gibi sarf malzemeleri ise Sartorius (Almanya) şirketinden tedarik edilmiştir. Boyama için DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ve Phalloidin ThermoFisher (ABD)'den satın alınmıştır. Abcam (İngiltere) firmasından Anti-Desmin temin edilmiştir.

2.2. Yöntem

Tez kapsamında, sıcaklık duyarlı P(NIPAm) ve farklı biyomalzemelerin birleşimi kullanılarak 4B biyobaskı teknolojisi ile kendi katlanır doku iskelesi üretimi incelenmiştir. Hazırlanan iskelenin malzeme, tasarım ve baskı optimizasyonları sonrası hücreli biyomürekkebin baskısı gerçekleştirilmiştir. Sonrasında iskelelere statik kültür gerçekleştirilerek laboratuvar ortamında hücre çoğalması, canlılığı ve farklılaşması incelenmiştir.

2.2.1. Sıcaklık Duyarlı Hidrojel Üretimi

Bu tez çalışmasında, sıcaklığa duyarlı doku iskelesinin katlanma kabiliyetini gözlemlemek için kontrollü bir şekilde tasarlanmış ve üretilmiştir. Doku iskelesinin tasarımı ve iskele üzerindeki desenin tasarımları kontrol edilerek katlanma kontrolü sağlanmıştır.

2.2.1.1. P(NIPAm) Temelli Sıcaklık Duyarlı Hidrojel Hazırlanması

Sıcaklığa duyarlı doku iskelesinin üretimi için P(NIPAm) hidrojelini temel malzeme olarak belirlenmiştir. MBAm çapraz bağlayıcı olarak, APS başlatıcı olarak ve TEMED hızlandırıcı olarak kullanılmışlardır. Baskı optimizasyonu için aljinat ve aljinatın çapraz bağlayıcısı olarak kalsiyum klorür (CaCl_2) kullanılmıştır.

Kullanılan malzemeler belirli bir oranda çözeltiye dahil edilerek hazırlanmıştır. %4 oranında aljinat ve %2,5 oranında p(NIPA) içeren çözelti için öncelikle iki ayrı çözelti hazırlanmıştır.

200 mg NIPA ve 5 mg MBA(m) 2 mL saf su içinde çözdürülmüştür. 23,5 mg APS 1 mL saf su içinde çözülmüştür. Bu iki çözelti ayrı kaplarda 15 dk karıştırıldıktan sonra 2:1 oranında karıştırılarak toplamda 3 mL çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözelti içerisine %4 oranında aljinat (0,12 g) 1 saat karıştırılarak çözdürülmüştür.

Sonrasında elde edilen yapının stabilitesini ve hücre uyumunu artırmak amacıyla çözeltiye Jelatin Metakrilat (GelMA) eklenmesi gerekli görülmüştür. GelMA, aljinatın sağladığı yapı stabilitesine ek olarak hücre tutunumu ve çoğalması üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır.

Bu şartlar altında yeni çözelti formülü, %2,5 p(NIPA), %1,5 Alg, %3 GelMA şeklinde güncellenmiştir. GelMA'nın çapraz bağlanması 470 nm ışıkla gerçekleştirilmiştir. fotopolimerizasyon süreci için LAP seçilmiştir. GelMA 3mL saf su içerisinde 37°C sıcaklıkta yarım saat çözdürülmüştür. Sonrasında 3 ml çözelti 2 ml ve 1ml olmak üzere iki ayrı kaba alınmıştır. 200 mg NIPA ve 5 mg MBA(m) (metilenbisakrilamid) 2 mL saf su içinde çözdürülmüştür. 23,5 mg APS 1 mL saf su içinde çözülmüştür. Bu iki çözelti ayrı kaplarda 15 dk karıştırıldıktan sonra 2:1 oranında karıştırılarak toplamda 3 mL çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözelti içerisine %4 oranında aljinat (0,12 g) 1 saat karıştırılarak çözdürülmüştür. 3B baskı alınmadan önce ise %0,1 oranında LAP çözeltiye eklenmiştir.

2.2.1.2. Jelatin Metakrilat (GelMA) Sentezi

GelMA sentezi 0,25M'lik bikarbonat tampon içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bikarbonat tampon çözeltisi %0,795 w/v konsantrasyonunda sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Sigma-490768) ve %1,495 w/v konsantrasyonunda sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Sigma) saf suyun içerisinde çözüldükten sonra NaOH (Riedel-de-Haen-06203) ile çözeltisinin pH 9'a ayarlanmıştır. Jelatin (Serva-22151-02) %10 w/v konsantrasyonda karbon çözeltisi ile çözülmüştür. Sentez tepkimesi 9 pH'da gerçekleşmektedir. Bu sebeple Jelatin çözeltisinin pH'ı NaOH ve HCl (Sigma) ile 9 pH ayarlanmıştır. pH 9 ayarlanan Jelatin çözeltisinin için damla damla metakrilik anhidrit (Sigma-276625) (her 1 gram jelatin için 0,1mL MA konsantrasyonunda) eklenmiştir. 3 saat sonra reaksiyonun durmak için çözeltinin pH 7,4 ayarlanmıştır. Tepkimeye girmeyen MA'yı çözülden uzaklaştırmak için 3 gün çözelti SnakeSkin diyaliz tüpü (10,000 MWCO) (ThermoFisher 68100) ile diyaliz edilmiştir. Diyaliz tamamlandıktan sonra, 5 gün süreyle liyofilizasyon gerçekleştirilmiştir (ScanVac Cool Safe). Elde edilen GelMA -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. 4B Baskı Optimizasyonu

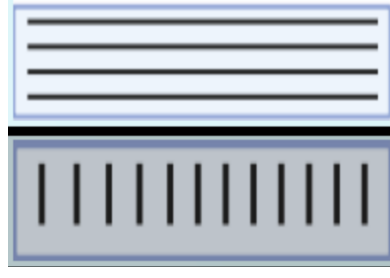
Bu tez çalışmasında, hazırlanışı anlatılan hidrojel karışımı için iki farklı doku iskelesi tasarımı kullanılmıştır. Bu tasarımlar genişlik açısından (y eksenini) farklılık göstermektedir. Genişliği 3 mm ve 5mm olarak iki farklı tasarım denenmiştir. Bu doku iskelelerindeki temel fark 3B baskı tasarımının y eksenindeki uzunluk farkıdır. İki farklı tasarım için de aynı baskı parametrelerini denenmiş ve en optimal baskı parametreleri elde edilmeye çalışılmıştır. Aynı

zamanda kontrollü katlanma için değişen çapraz bağlanma prosedürleri de incelenmiştir. Çapraz bağlama prosedürlerinde sıcaklık farkı incelenmiştir. Her iki tasarım için denenmiş olup kontrollü katlanma sağlanmaya çalışılmıştır. Bu parametreler izelge 2.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. AlgP(NIPAm)GelMA baskı parametreleri

Hız (mm/sn)	Basınç (bar)	Desen	apraz bağlanma prosedürü
10	2	90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)
20	2	90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)
15	2	90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)
15	1,8	90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)
15	2	180	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)
15	2	90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (33-37 derece)

Tüm hidrojel basım işlemleri, Envisiontech 3D Bioplotter (Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Basım işlemleri sırasında cihazın robotik kafası, minimum çalışma sıcaklığı olan 25°C’ye ayarlanmıştır. Farklı desenlerin katlanma davranışı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, hidrojellerin deseni Şekil 2.1’ de gösterildiği gibi desen90 ve desen180 olmak üzere iki farklı desen kullanılarak baskı alınmıştır.



Şekil 2.1. Desen180 ve Desen 90 kodlu desenlerin tasarımı

Hidrojel çözeltilerinin basımı öncesinde, sterilizasyon ve hazırlık süreçleri büyük bir özenle gerçekleştirilmiştir. Çözelti hazırlanma prosedürleri, daha önce ayrıntılı olarak açıklanan yöntemlere sadık kalınarak uygulanmıştır. İlk olarak, jelatin metakrilat (GelMA), NIPA, MBA(m), APS ve aljinat tozları, sterilizasyon amacıyla 30 dakika boyunca ultraviyole (UV) ışık altında bekletilmiştir. Bu süreç, toz halindeki malzemelerin mikrobiyal kontaminasyondan tamamen arındırılmasını sağlamak için kritik bir adımdır. Sıvı formdaki diğer bileşenler, distile su içinde çözündürülmüş ve 0,22 mikronluk filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Böylece, çözelti bileşenlerinin tamamı basım için uygun hale getirilmiştir.

Basımda kullanılacak ekipmanların sterilizasyon işlemi de benzer bir titizlikle gerçekleştirilmiştir. Plunger, iğne uçları, şırıngalar gibi tüm ekipmanlar, %70 etanol banyosunda bir saat süreyle bekletilmiş, ardından UV ışığı altında kurutulmuştur. Bu yöntem, ekipman yüzeyindeki olası patojenlerin tamamen uzaklaştırılmasını sağlamıştır. Ekipmanların doldurulması ve birleştirilmesi gibi hassas işlemler, laminar akış kabini içinde gerçekleştirilmiş ve böylece dış ortamdan gelebilecek kontaminasyon riski minimuma indirilmiştir. Hidrojel çözeltilisine hücreler homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra yazıcı şırıngasına doldurulmuştur. Şırınganın doldurma bölümleri ve iğne ucu parafilm ile dikkatlice sarılmıştır. Bu işlem, çözeltinin dış ortamla temasını tamamen kesmek için kritik bir adımdır.

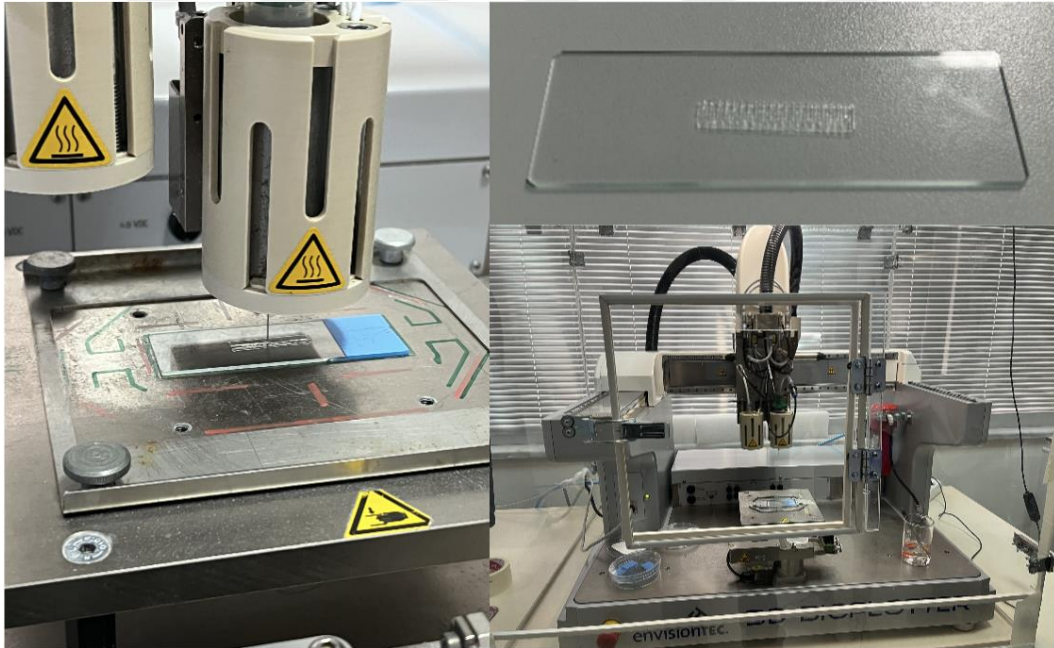
Sterilizasyonun bir diğer aşaması, 3B yazıcının hazırlanmasını içermektedir. Yazıcı, pleksiglas bir kapakla kapatılmış ve 1 saat boyunca UV ışığı altında bekletilmiştir. Ardından, hidrojel çözeltilisini içeren steril şırınga yazıcının robotik kafasına dikkatlice yerleştirilmiştir. Bu süreçte herhangi bir kontaminasyon oluşmasını engellemek için tüm adımlar titizlikle uygulanmıştır.

Baskı altlığı olarak kullanılacak cam lamlar da benzer bir sterilizasyon sürecinden geçirilmiştir. Lamlar, %70 etanol çözeltisi içinde bir saat bekletilmiş ve ardından UV ışığı altında tamamen kurutulmuştur. Steril hale getirilen cam lamlar, steril petri kaplarına

yerleştirilmiş ve 3B yazıcının baskı tablasına aktarılmadan önce dikkatlice steril yazıcı kabineye taşınmıştır. Cam lamların yerleştirilmesinin ardından yazıcı baskıya hazır hale getirilmiştir.

Sonuç olarak, tüm bu hazırlık ve sterilizasyon işlemleri, hidrojel basımı sırasında hem malzeme hem de ekipman düzeyinde tam hijyenin sağlanması ve potansiyel kontaminasyon kaynaklarının tamamen ortadan kaldırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu süreç hem basım kalitesini artırmak hem de biyolojik deneylerin güvenilirliğini garanti altına almak için kritik bir rol oynamaktadır. Böylece, basım işlemi başarıyla gerçekleştirilmiş ve tüm sterilizasyon standartlarına uygun hale getirilmiştir. Basım işlemi Şekil 2.2’ de gösterilmiştir.

Basım işlemi tamamlandıktan sonra örnekler steril petri kaplarının içinde laminar akış kabini içerisinde 10 dk süreyle TEMED’ e maruz bırakılmıştır. Ardından 0,25 M steril CaCl_2 çözeltisi 37°C ’ ye ısıtılarak kullanılmıştır. Bu aşamada örnekler 3 dk kadar CaCl_2 çözeltisi içinde bekletilmiş olup aljinat çapraz bağlaması ve katlanma kontrolü eşzamanlı olarak yapılmıştır. Katlanma kontrolü sağlanan örnekler 30 sn süreyle, 405 nm dalga boyuna sahip Ultraviyole (UV) ışığa maruz bırakılarak GelMA çapraz bağlanması sağlanmıştır.



Şekil 2.2. 3B basım uygulamasının gösterimi

Kültürlenecek örnekler açık ve katlanmış olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Bu durum katlanma davranışının hücreye etkisini incelemek için kültür bulguları ile gözlemlenmiştir.

Bunun yanında, örneğin katlanma davranışının P(NIPAm) temelli olduğunun daha iyi anlaşılabilmesi için yalnızca Aljinat ve GelMA içeren bir malzeme hazırlanmış ve baskı alınıp aynı prosedür uygulanmıştır.

2.2.3. Sitotoksite Testi

Biyomalzemenin biyoyumluluğunu değerlendirmek ve zararlı biyolojik ekstraktlar salıp salmadığını belirlemek amacıyla dolaylı sitotoksite testi yapılmıştır. Üretilen biyomalzemenin biyoyumluluğu, ISO 10993/EN 30993 standartlarına uygun olarak gerçekleştirilen MEM ekstraksiyon testi ile incelenmiştir. Kullanılan deneysel gruplar şu şekildedir;

1. Alg_P(NIPAm)_GelMA
2. Pozitif kontrol (+)
3. Negatif kontrol (Latex) (-)

Steril edilmiş örnekler hücre kültürü ortamı (%10 h/h fetal sıgır serumu ve %1 h/h penisilin-streptomisin içeren DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Eagles Medium)) içinde sabit çalkalama altında 24 saat inkübe edilerek ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra pasaj 28 L929 fare fibroblast (ATCC® CCL-1) hücreleri, 24 kuyulu hücre kültür kabına ekilerek 24 saat sonra ekstraksiyon sıvısı kuyucuklara eklenerek inkübe edilmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürecinin ardından, hücre tabakasının yayılım oranı (confluency), ölü hücre miktarı ve hücre morfolojisindeki değişiklikler mikroskopik olarak gözlemlenmiştir. 72 saat sonunda, canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimlerinin etkisiyle gerçekleşen renk değişimi esas alınarak Alamar Blue (rezasurin) boyama analizi yapılmış ve bu süreç spektrofotometrik yöntemle değerlendirilerek hücre canlılığı tespit edilmiştir. Deney gruplarından elde edilen ekstraksiyon sıvıları, her bir grup için üç tekrar olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. Ekstraksiyon sıvılarının eklenmesinin ardından, 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde hücre tabakasının yayılımı (confluency) ve morfolojideki değişiklikler mikroskopik olarak incelenmiştir.

Mikroskopik inceleme verileri, negatif kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Çizelge 2.2 'de belirtilen değerlendirme kriterleri doğrultusunda puanlanmıştır. Hücre tabakasının

yayılımı, ölü hücre oranı ve morfolojik değişikliklere ilişkin ilk üç kriterden alınan puanların ortalaması hesaplanmıştır. Bu ortalama puan, hücre büyümesinin inhibisyonuna ilişkin son kriterden alınan puanla birleştirilerek 0 ile 8 arasında değişen nihai sitotoksik cevap indeksi belirlenmiştir. Elde edilen bu değer, malzemenin sitotoksik özellik taşıyıp taşımadığını değerlendirmek için kullanılmıştır. Değerlendirme Çizelge 2.3' te verilmiştir.

Çizelge 2.2. Sitotoksikite testi değerlendirme kriterleri

	Değerlendirme kriteri	Not
Hücre tabakası yayılımı (confluency)	%100	0
	%90-100	1
	%60-90	2
	%30-60	3
	%0-30	4
Ölü hücre miktarı (yüzen hücreler)	Hiç görülmedi	0
	%0-5	1
	%5-10	2
	%10-20	3
	≥ %20	4
Hücre morfolojisindeki değişim	Değişim gözlenmedi	0
	Az değişim var, az sayıda hücre etkilendi	1
	Orta seviyede değişim var, bazı hücrelerin morfolojisinde değişim gözlendi	2
	Orta seviyede değişim var, birçok hücrenin morfolojisinde değişim gözlendi	3
	Yüksek seviyede değişim var, tüm hücrelerin morfolojisinde değişim gözlendi	4
Hücre büyümesi inhibisyonu	%0-10	0
	%10-30	1
	%30-50	2
	%50-70	3
	%70-100	4

Çizelge 2.3. Sitotoksik tepki indeksi ve sitotoksisite analizi

Sitotoksik cevap indeksi	Reaktivite	"Malzeme Sitotoksiktir"
0-1	Yok	Hayır
1-3	Az	Hayır
3-5	Orta	Yeniden değerlendirilmeli
5-7	Fazla	Evet
7-8	Çok	Evet

2.2.4. Hücre Kültürü

Hidrojel platformlarının hücrelerle olan etkileşimlerini incelemek amacıyla, malzemeye C2C12 hücreleri eklenmiştir, deneylerde kullanılan C2C12 fare miyoblast hücre hattı, ATCC (ABD) firmasından temin edilmiş olup, hücrelerin devam pasajları değerlendirilmiştir. Hücre kültürüne başlamadan önce, laminar akış kabini 15 dakika boyunca ultraviyole (UV) ışığı altında sterilize edilmiş ve sterilizasyon süreci tamamlanmıştır. Çalışma sırasında kullanılacak çoğaltma besiyeri, bir Falcon tüpe ayrılarak 37°C sıcaklığa kadar ısıtılmıştır. Sıvı azotta saklanan hücreler, 37°C'ye ısıtılmış besiyerinden 1 ml'lik miktarlarla dikkatlice alınmış ve dondurma tüpünün içine yavaş yavaş pipetlenerek çözündürülmüştür. Bu işlem sırasında toplamda 3 ml besiyeri kullanılmış ve çözünen hücre süspansiyonu santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüpün üst kısmındaki besiyeri uzaklaştırılmış ve kalan hücre peleti, taze 5 ml besiyeri ile yeniden süspanse edilmiştir.

Hücre süspansiyonundan 20 µL alınmış ve aynı hacimde tripan blue boyası ile karıştırılmıştır. Tripan blue boyası ölü hücreleri işaretleyerek yaşayan hücreleri mikroskop altında kolayca ayırt etmeyi sağlamıştır. Karışımdan 10 µl, hemositometreye yerleştirilmiş ve lamel ile kapatılmıştır. Işık mikroskobu altında yapılan incelemeler sonucunda canlı hücreler sayılmış ve 5 ml süspansiyondaki toplam hücre sayısı bu orana göre hesaplanmıştır. Santimetrekare başına 5.000 hücre olacak şekilde, T75 flask için yaklaşık 375.000 hücre içeren bir süspansiyon hazırlanmış ve 30 dakika önceden 11 ml çoğaltma besiyeri ile hazırlanan T75 flask içerisine dikkatlice eklenmiştir. Flasklar, hücrelerin çoğalmasını sağlamak amacıyla 37°C'de %5 CO₂ içeren bir inkübatöre kaldırılmıştır. İnkübasyon sürecinde, hücreler 36 saat içinde %70 konflüansa ulaşmıştır. Bu aşamada hücreler pasajlanarak, daha büyük hacimli T175 flasklara aktarılmış ve istenen hücre sayısına ulaşılmıştır. Besiyeri her iki günde bir tazelenerek hücrelerin büyüme ortamı optimize edilmiştir.

T175 flasklarda %70 konflüansa ulaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve flask yüzeyi steril PBS ile 10 ml hacminde yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra flask içerisine 1.5 ml tripsin eklenmiş ve yüzeyin tamamen kaplanması sağlanmıştır. Hücreler, 37°C'de 6 dakika süreyle inkübe edilmiş ve yüzeyden ayrılmaları ışık mikroskobu altında kontrol edilmiştir. Daha sonra flask içerisine 5 ml taze besiyeri eklenmiş ve hücreler yüzeyden ayrılarak süspansiyona geçirilmiştir. Bu karışım, bir Falcon tüpe alınarak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmındaki sıvı dökülmüş ve hücre peleti taze besiyeri içerisinde yeniden süspanse edilmiştir.

Steril olarak hazırlanan hidrojel çözeltisi laminar akış kabinine alınmış, sayılan hücreler tekrar santrifüj edilerek pelet hale getirilmiştir. Hücreler, mikrolitrede 5.000 hücre olacak şekilde hidrojel çözeltisine eklenmiştir. Daha sonra, bu karışım 3B yazıcı şırıngasına doldurularak basım için cihaza yerleştirilmiştir.

Basım ve katlama işlemleri tamamlanan hidrojeller, 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına alınmıştır. Her kuyucuğa 2 ml çoğaltma besiyeri eklenmiş ve örnekler 37°C, %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Hücre kültürü işlemi 14 gün boyunca sürdürülmüş, ikinci günden itibaren besiyeri her 48 saatte bir değiştirilerek yenilenmiştir.

2.2.4.1. Hücre Morfolojisi ve Yayılımı

Hidrojel içindeki hücrelerin morfolojisini gözlemlemek amacıyla katlanmış ve açık örneklere 3., 7. ve 14. günlerde Phalloidin/DAPI boyama yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde, hücrelerin aktin filamentleri Phalloidin ile, çekirdekleri ise DAPI ile boyanması hedeflenmiştir. Boyama yapılacak örnekler temiz kuyucuklara alınarak PBS ile yıkanmıştır.

Boyama sürecinin ilk aşamasında, hücrelerin fikse edilmesi için %3,7 (a/h) formaldehit çözeltisi eklenmiştir. Örnekler, oda sıcaklığında, hafif çalkalama altında 4 saat süreyle formaldehit içerisinde bekletilmiş ve ardından PBS ile yıkanmıştır. Hücre zarının geçirgenliğini artırmak ve boyanın etkisini güçlendirmek amacıyla örnekler, %0,1 (h/h) Triton X-100 çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Bu aşama, boyama işleminin etkinliğini artırmak için önemli bir adım olarak uygulanmıştır.

Sonraki aşamada, spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, örnekler %1 BSA çözeltisi ile 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, aktin filamentlerin boyanması için %0,1 BSA içinde 1:1000 oranında hazırlanmış Phalloidin çözeltisi örneklere eklenmiş ve 1 saat süreyle 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından,

hücre çekirdeklerini işaretlemek için, örnekler oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 1:1000 konsantrasyonda hazırlanmış DAPI çözeltisi ile muamele edilmiştir. Boyama işleminin tamamlanmasının ardından, örnekler tekrar PBS ile yıkanarak temizlenmiştir.

Bu yöntem, hidrojel içerisindeki hücrelerin çekirdek yapılarını ve aktin filamentleri görselleştirerek hücresel davranışların ve morfolojik özelliklerin detaylı bir şekilde incelenmesine olanak sağlamıştır. Elde edilen veriler, hücrelerin hidrojel içerisindeki yayılımı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler sunmuştur.

Bunun yanında, hücre kültürü sırasında hidrojellerde bulunan hücre canlılık durumu, Alamar Blue testi ile analiz edilmiştir. Test için, %5' lik Alamar Blue çözeltisi düşük glikozlu renksiz DMEM ile hazırlanmış ve 37°C'de ısıtılmıştır. Isıtılan çözelti, hidrojellerin bulunduğu besiyeri çekildikten sonra örnekler PBS tamponuyla yıkamanın ardından, örneklerin bulunduğu kuyucuklara 1 ml olacak şekilde eklenmiştir. Örnekler, 37°C ve %5 CO₂ koşullarında, karanlık bir ortamda 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından, her kuyucuktan 200 µl örnek alınarak 96 kuyucuklu mikropalakalara aktarılmıştır. Her bir test için üç tekrar yapılmıştır. Mikropalakalar, mikropalaka okuyucusuna yerleştirilerek 570 nm ve 595 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülmüştür. Testin ardından, hidrojellerin bulunduğu kuyucuklardaki Alamar Blue çözeltisi çıkarılmış, örnekler PBS ile tekrar yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklara taze farklılaştırma besiyeri eklenerek kültüre aynı örneklerle devam edilmiştir. Bu test yöntemi sayesinde, 3., 7. ve 14. günlerdeki Alamar Blue analizleri aynı örnekler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri, C2C12 hücre hattı için oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak yaklaşık hücre sayılarına dönüştürülmüştür.

Hücre yayılımının gözlemlenmesi için ise katlanmış 3. gün örneği histoloji laboratuvarında üçlü boyama tekniği ile analiz edilmiştir. Daha sonra örnek yıkanarak %2'lik agara gömülmüştür ve %70'lik alkolde bir gece bırakılmıştır. Ertesi gün uygun süreler gözetilerek sırasıyla %80 %90 %96 ve absol alkolden geçirilerek xylol'e alınmıştır. Xylol'den sonra %50 xylol, %50 Parafin karışımına aktarılmıştır ve en sonunda saf parafine gömülerek bloklanmıştır. Mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır ve alınan kesitler 37°C'de bir gece kurutulduktan sonra Crossman'ın modifiye üçlü boyaması ile boyanmıştır.

2.2.4.2. İmmünfloresan Boyama ve Taramalı Elektron Mikroskobu

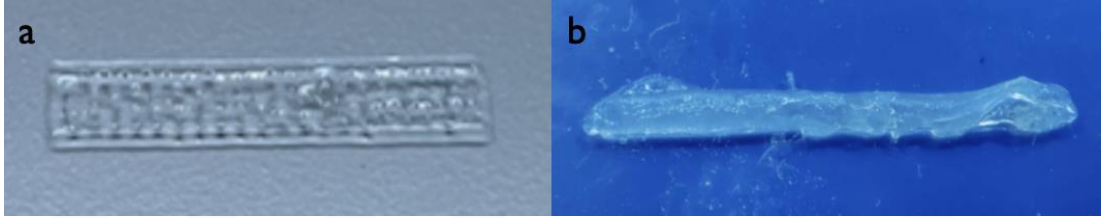
C2C12 hücrelerinin miyojenik farklılaşmasının belirlenmesi için kas spesifik belirteç olan Abcam (İngiltere) Anti-Desmin kullanılarak immünfloresan boyama gerçekleştirilmiştir. Phalloidin-DAPI boyama prosedürünün ardından tavşan Anti-Desmin (1:50) antikoru, %0,1 BSA içeren çözelti içerisinde uygulanmıştır. Primer antikor gece boyunca (18 saat) 4°C’de inkübasyon yapılarak bağlanmıştır. Bu işlemden sonra örnekler PBS ile yıkanmıştır. Primer antikor bağlandıktan sonra, sekonder antikor olarak 1:200 konsantrasyonda hazırlanmış Goat anti-Rabbit antikoru kullanılmış ve kesitler 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta sekonder antikor işlem görmüştür. Son olarak, hücrelerin morfolojisi, yayılımı ve miyojenik farklılaşması ters floresan mikroskop (Zeiss Axio Observer Z1) kullanılarak görüntülenmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, kültür sonrası katlanmış ve açık hidrojellerdeki 7. ve 14. gün hücre yayılımını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Örnekler, PIPES tamponuyla yıkandıktan sonra -20°C’de bir gece dondurularak FreezeDry yöntemiyle kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin yüzeyleri altınla kaplanmış ve SEM görüntüleme işlemi Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. 4B Basım Optimizasyon Bulguları

Başlangıç deneylerinde Alg ve P(NIPAm) malzemesi kullanılırken çözeltiye GelMA malzemesi eklenmesi uygun görülmüştür. GelMA, aljinatın sağladığı yapı stabilitesine ek olarak hücre tutunumu ve çoğalması üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Bunun yanında, çözeltiye GelMA eklenmesi sırasında, baskı özelliklerini ve hücre uyumluluğunu optimize etmek için aljinat yüzdesi %4'ten %1,5'e düşürülmüştür. Aljinat, yapısal dayanıklılık sağlaması açısından önemli olsa da yüksek konsantrasyonda hücre canlılığına olumsuz etki etmesinin yanı sıra, aljinatın çapraz bağlanma sonrası yüksek stabilite göstererek katlanma hareketini olumsuz etkileyebileceği öngörülmüştür. Yeni çözelti ile alınan örneklerin baskı sonrasında açık ve katlanmış halleri Şekil 3.1' de gösterilmiştir.









Şekil 3.1. Baskı sonrası a) açık örnek b) katlanmış örnek

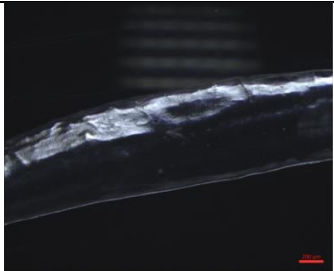
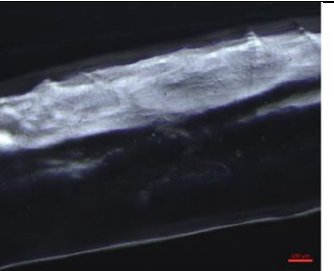


Farklı baskı parametrelerinin değerlendirilmesi sonucu, Alg_P(NIPAm)_GelMA malzemesinde tasarım farklılığı ile (örnek genişliği 3mm ve 5mm), 5mm genişliğe sahip olan tasarımın baskı sonrası katlanma davranışının daha doğrusal olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle 10 mm/sn hız ve 2 bar basınçla basılan örneklerin baskı stabilitesi ve katlanma performansı açısından öne çıktığı tespit edilmiştir. Bunun yanında 40-50 derece sıcaklık ve 33-37 derece sıcaklıkta katlanma davranışı benzer sonuçlar vermiştir. Bu durumda 32 °C sıcaklık üzerinde P(NIPAm) malzemesinin katlanma davranışı gözlemlenmiştir. Katlanma görüntüleri Şekil 3.2 ve Şekil 3.3' de gösterilmiştir.

Baskı Tasarım Genişliği (y eksenı)	Hız (mm/sn)	Basınç (bar)	Desen	Çapraz bağlanma prosedürü	
3 mm	10	2	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
3 mm	20	2	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
3 mm	15	2	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
3 mm	15	1,8	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
3 mm	15	2	Desen180	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
3 mm	15	2	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (33-37 derece)	

Şekil 3.2. Farklı baskı parametreleri ile örneklerin katlanma davranışı

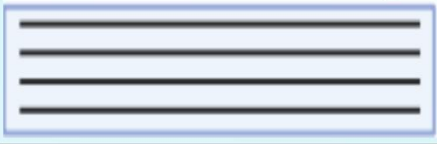



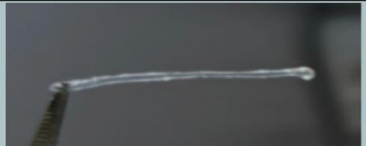

Baskı Tasarım Genişliği (y eksenli)	Hız (mm/sn)	Basınç (bar)	Desen	Çapraz bağlanma prosedürü	
5 mm	10	2	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
5 mm	20	2	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
5 mm	15	2	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
5 mm	15	1,8	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
5 mm	15	2	Desen180	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (40-50 derece)	
5 mm	15	2	Desen90	10 dk TEMED 3 dk CaCl ₂ (33-37 derece)	

Şekil 3.2. Devam. Farklı baskı parametreleri ile örneklerin katlanma davranışı

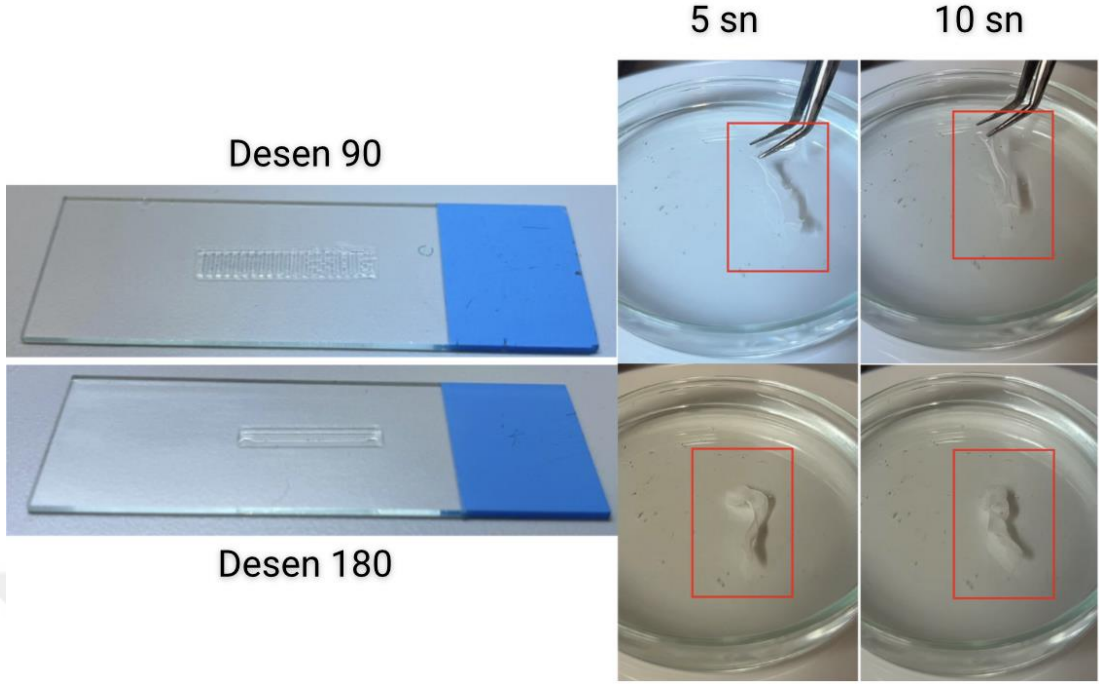
	5x	10x
15 mm/sn hız 2 bar basınç 40-50 °C		
15 mm/sn hız 2 bar basınç 33-37 °C		

Şekil 3.3. Farklı baskı parametreleri ile örneklerin katlanma davranışının mikroskop görüntüsü

Aynı zamanda, desen farklılığının katlanmaya direkt etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’ te gösterildiği gibi desen180 grubunda kıvrımlı katlanma gözlemlenirken, desen90 grubunda kısa kenardan daha stabil ve doğrusal bir katlanma gözlemlenmiştir.

		Kıvrımlı Katlanma 	✗
		Doğrusal Katlanma 	✓

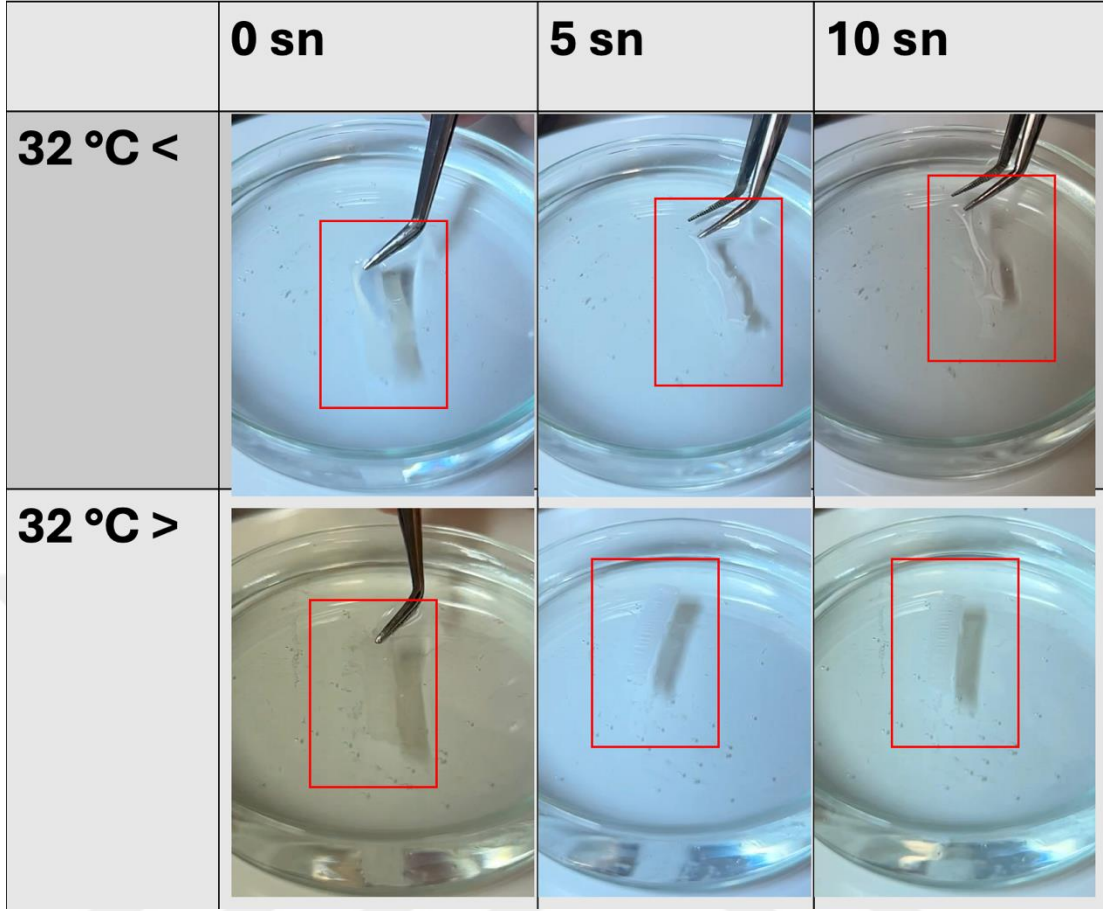
Şekil 3.4. Desen180 ve Desen 90 arasındaki katlanma davranışının farkının gözlemlenmesi



Şekil 3.5. Desen180 ve Desen 90 arasındaki katlanma davranışının farkının zamana bağlı olarak gözlemlenmesi

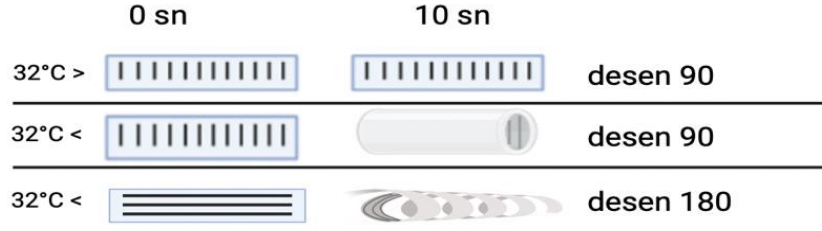
Bu sonuçlar hem desen geometrisinin hem de baskı parametrelerinin hidrojel doku iskelelerinin katlanma özelliklerinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu çalışmada elde edilen veriler, hidrojel tabanlı malzemelerin katlanma özelliklerinin, farklı platform tasarımları veya farklı baskı parametreleri kullanılarak manipüle edilebileceğini göstermektedir. Bunun yanında katlanma davranışının P(NIPAm) kaynaklı olduğunu gözlemlemek için Alg_GelMA malzemesi denenmiştir aynı koşullar altında P(NIPAm) olmayan baskı örneklerinin katlanmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada ana odak noktası, sıcaklık uyarımına bağlı şekil değişikliklerini incelemek olmuştur. Deneylede, 32°C'nin altı ve 32°C'nin üstü sıcaklıklar temel alınarak farklı koşullar değerlendirilmiştir. Yapılan gözlemler, 32°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda belirgin ve net bir katlanma meydana geldiğini göstermiştir. Buna karşılık, 32°C'nin altındaki sıcaklıklarda herhangi bir katlanma davranışı gözlemlenmemiştir. Bu bulgular, malzemenin sıcaklık duyarlılığını ve şekil değiştirme mekanizmasının, belirli bir eşik sıcaklığının üzerindeki uyarılara bağlı olarak çalıştığını ortaya koymaktadır. Bu durum, uygulama alanlarında sıcaklık kontrollü şekil değişikliklerinin kullanılabilirliğini destekleyen önemli bir veri sunmaktadır. Sıcaklığa bağlı olarak katlanma davranışı Şekil 3.6. ile gösterilmiştir. Katlanma davranışı sıcaklık uyarımı ile 10 sn içinde gözlemlenmiştir. Sıcaklığın düşük olduğu grupta ise herhangi bir form değişikliği gözlemlenmemiştir.



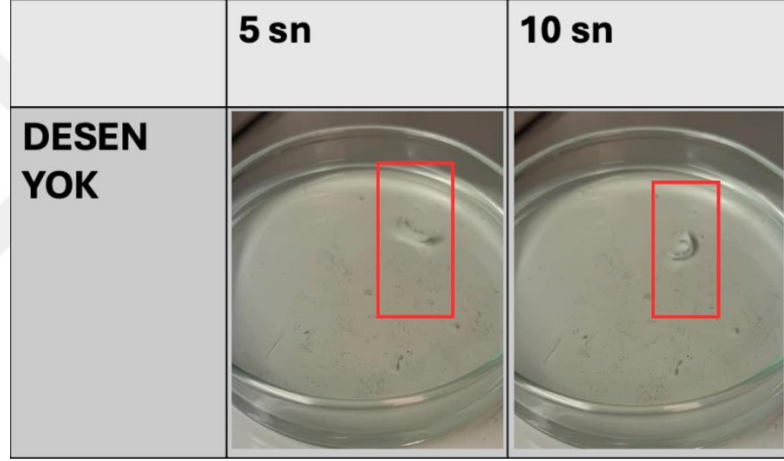
Şekil 3.6. Örneğin sıcaklık uyarana bağlı olarak zaman içinde şekil değiştirme davranışı

Katlanma kontrolüne etki eden başlıca değişkenlerin sıcaklık, desen ve malzeme olduğu görülmüştür. Bu değişkenler arasından uygun katlanma kontrolü Alg_P(NIPAm)_GelMA malzemesi ile desen90 tasarımı kullanılarak 32°C sıcaklık üstünde gerçekleşmiştir. Sıcaklığın 32°C altında olan denemelerde katlanma görülmezken, aynı zamanda P(NIPAm) içermeyen örneklerde de katlanma görülmemiştir. Deneyler sırasında kıvrımlı katlanma ve doğrusal katlanma olarak iki farklı katlanma gözlemlenirken, bazı örneklerde katlanma görülmemiştir (Şekil 3.7). Katlanma davranışının değişkenlere bağlı değişimin şematik gösterimi Şekil 3.10 ve Şekil 3.11' de gösterilmiştir.

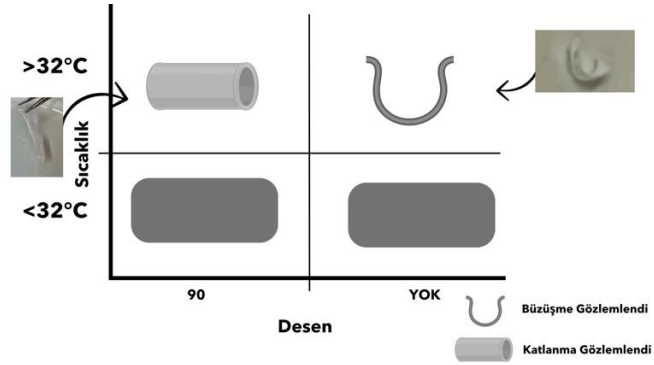


Şekil 3.7. Örneklerin zamana, sıcaklığa ve desene bağlı olarak katlanma davranışları

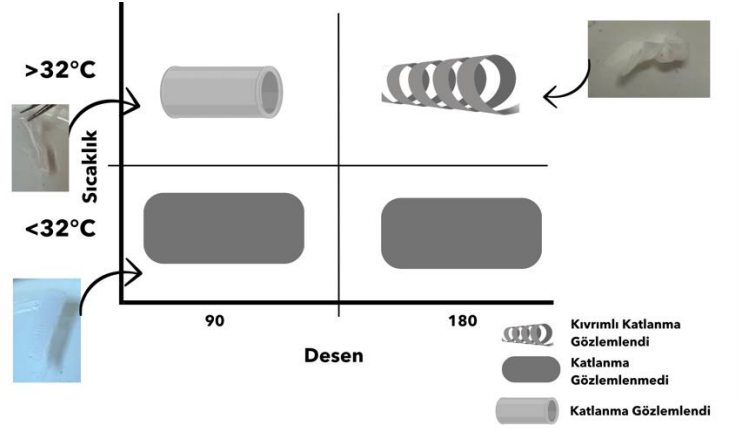
Örneğin desen farklılığının katlanmaya etkisinin gözlemlenmesinin ardından. Desen90 modeli ve desensiz bir modelin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda desensiz modelin bir katlanma davranışı sergilemek yerine, P(NIPAm) malzemesinin sıcaklık duyarlılığı sebebiyle, kontrolsüz bir büzüşme davranışı sergilediği görülmüştür. Karşılaştırma sonuçları Şekil 3.8. ve Şekil 3.9.' da gösterilmiştir.



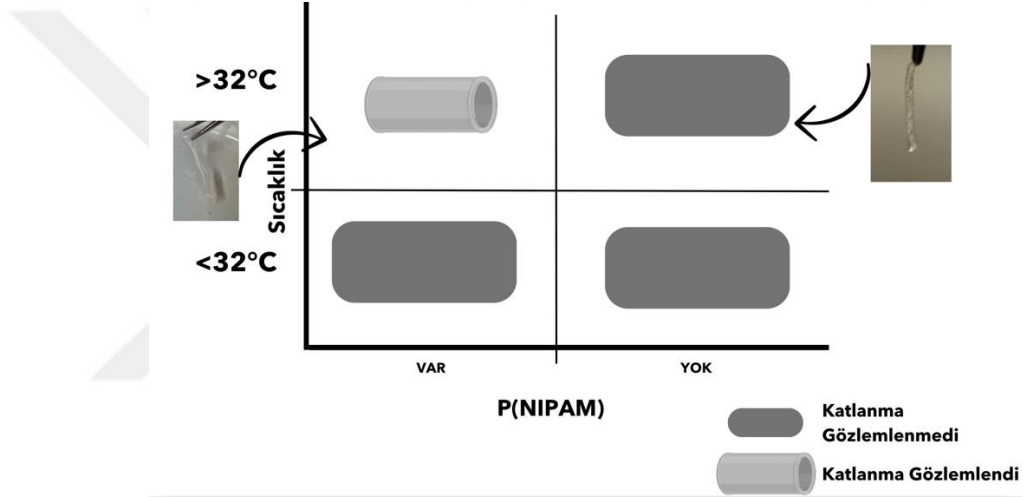
Şekil 3.8. Desensiz örneğin sıcaklık uyarımına bağlı olarak zaman içinde şekil değiştirme davranışı



Şekil 3.9. Örneğin desenli ve desensiz farklılığına bağlı olarak şekil değiştirme davranışının şematik gösterimi



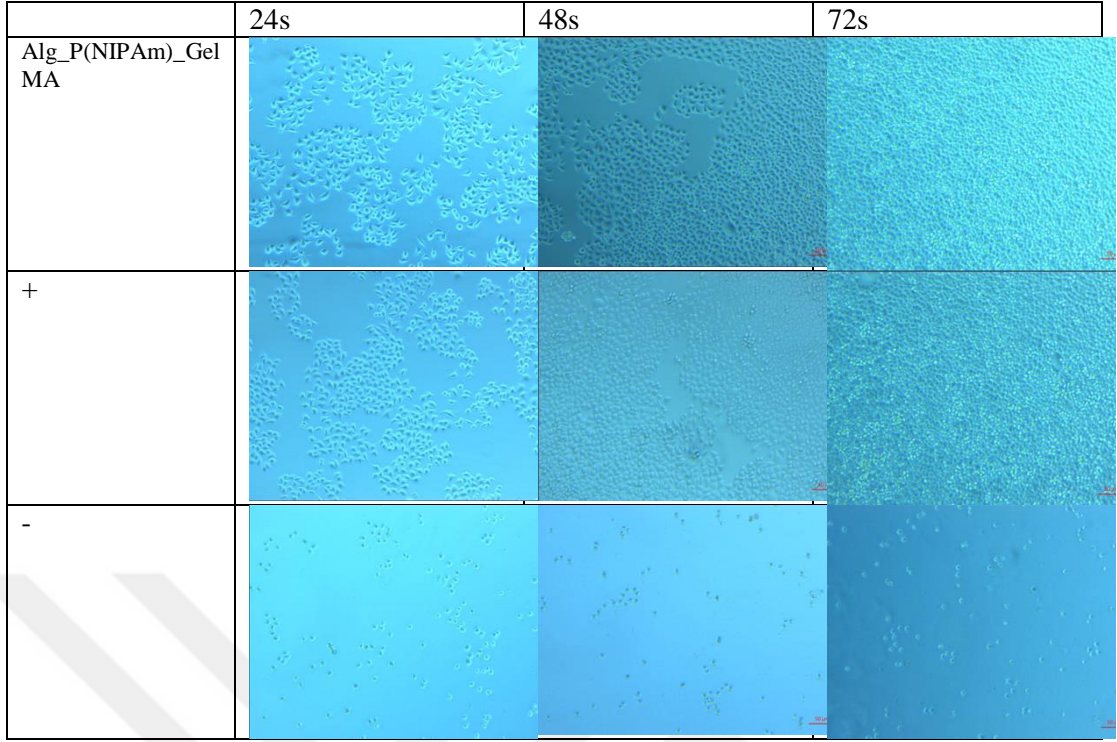
Şekil 3.10. Örneğin sıcaklık uyararı ve desen farklılığına bağlı olarak şekil değiştirme davranışının şematik gösterimi



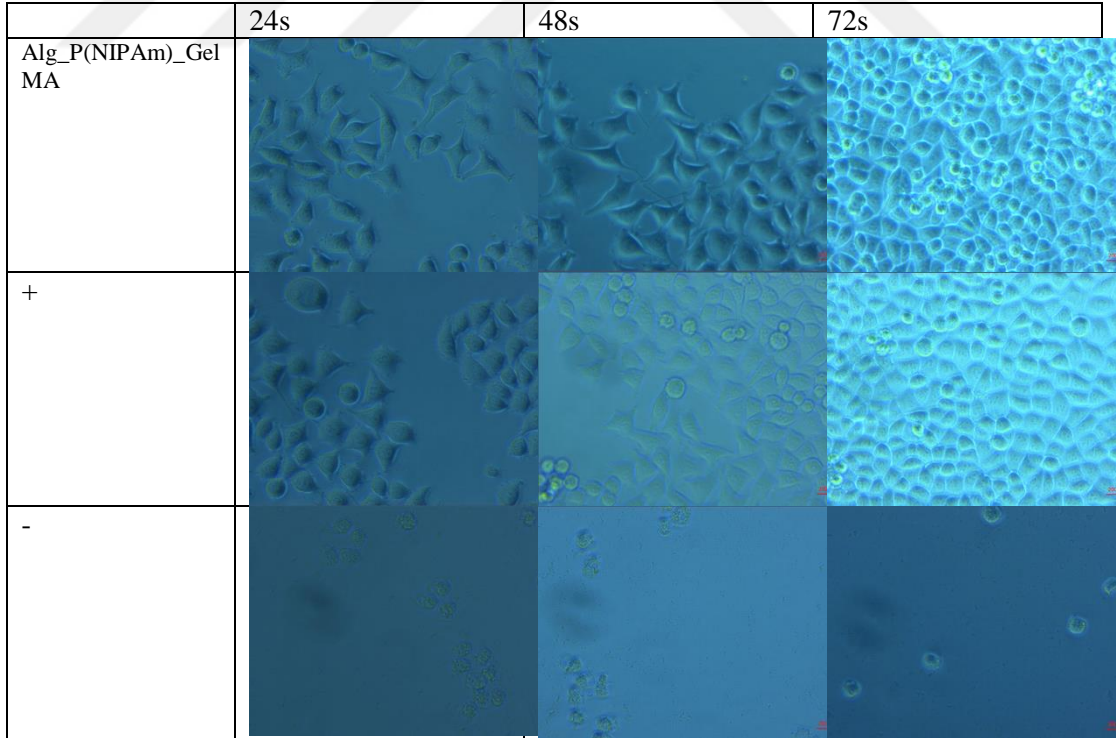
Şekil 3.11. Örneğin sıcaklık uyararı ve malzeme içeriğine bağlı olarak şekil değiştirme davranışının şematik gösterimi

3.2. Sitotoksite Bulguları

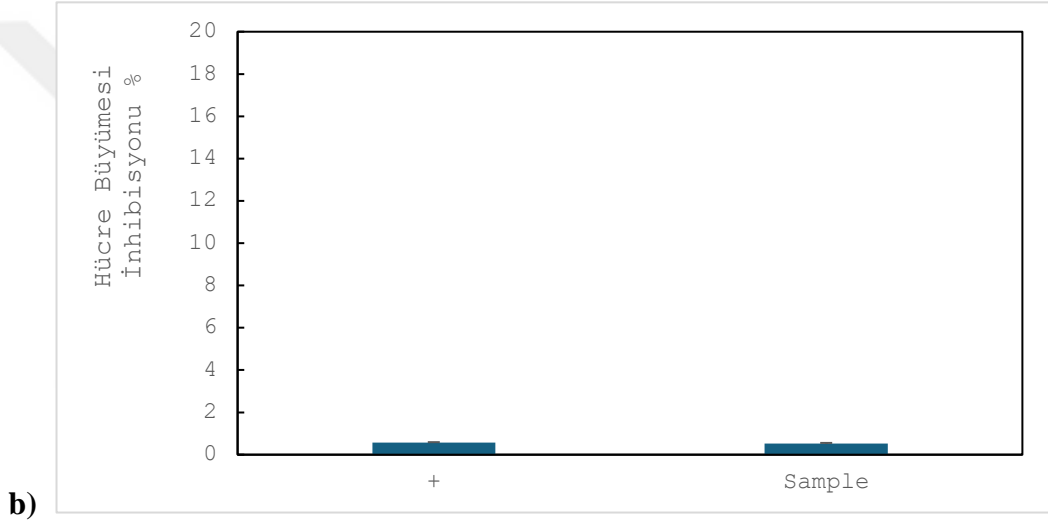
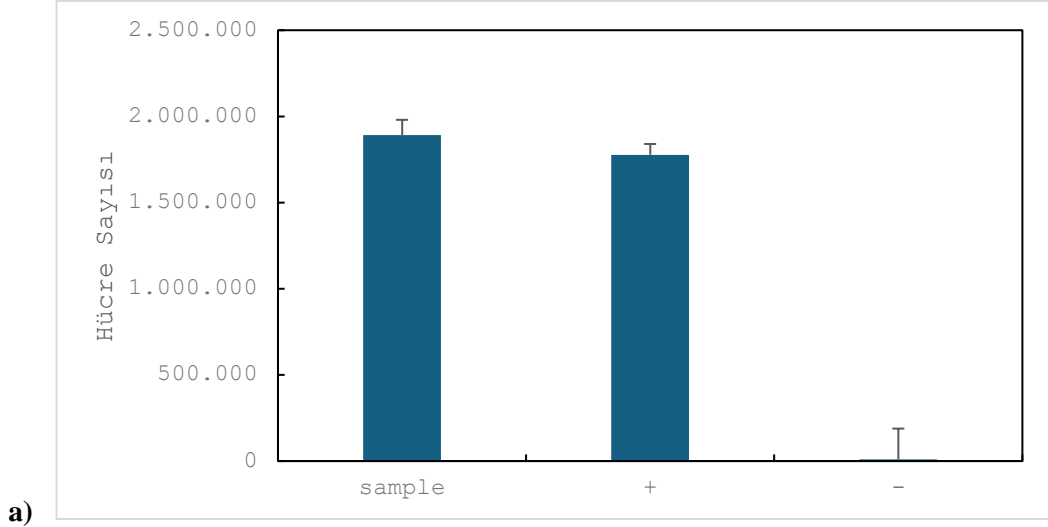
Ekstraksiyon sıvısı eklendikten sonra 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde, hücre tabakası yayılımı ve ölü hücre miktarı deney gruplarına göre faz kontrast mikroskopi kullanılarak 10x büyütmede değerlendirilmiştir. Bu zaman aralıklarında gözlemlenen hücre tabakası yayılımı Şekil 3.12’ de sunulmuştur. Hücre morfolojisindeki değişiklikler ise kültür süresi boyunca 40x büyütmede incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.13’ de gösterilmiştir. Hücre sayılarına dayalı olarak yapılan analiz sonuçları Şekil 3.14’ de yer almaktadır.



Şekil 3.12. Ekstraksiyon sıvısı uygulamasından sonra, deney gruplarında 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde hücre tabakası yayılımındaki değişim (10x büyütme)



Şekil 3.13. Ekstraksiyon sıvısı uygulamasından sonra, deney gruplarında 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde hücre tabakası yayılımındaki değişim (40x büyütme)



Şekil 3.14. Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 72 saat sonra, deney gruplarına göre (a) canlı hücre sayısındaki değişim ve (b) hücre büyümesindeki % inhibisyon oranı, pozitif kontrol grubuna göre bağlı olarak değerlendirilmiştir

Mikroskobik inceleme ve hücre sayımı sonuçlarına dayanarak, deney gruplarının sitotoksikite testi değerlendirme kriterleri doğrultusunda puanlama sonuçları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sitotoksisite testi değerlendirme kriterlerine ait sonuçlar

	Not		Not
Hücre tabakası yayılımı (Confluency)	0	Hücre morfolojisindeki değişim	0
Ölü hücre miktarı (Yüzen hücreler)	1	Hücre büyümesi inhibisyonu	0

Bu sonuçlar doğrultusunda, üretilen filmlere ait sitotoksik cevap indeksi ve sitotoksisite değerlendirme sonuçları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

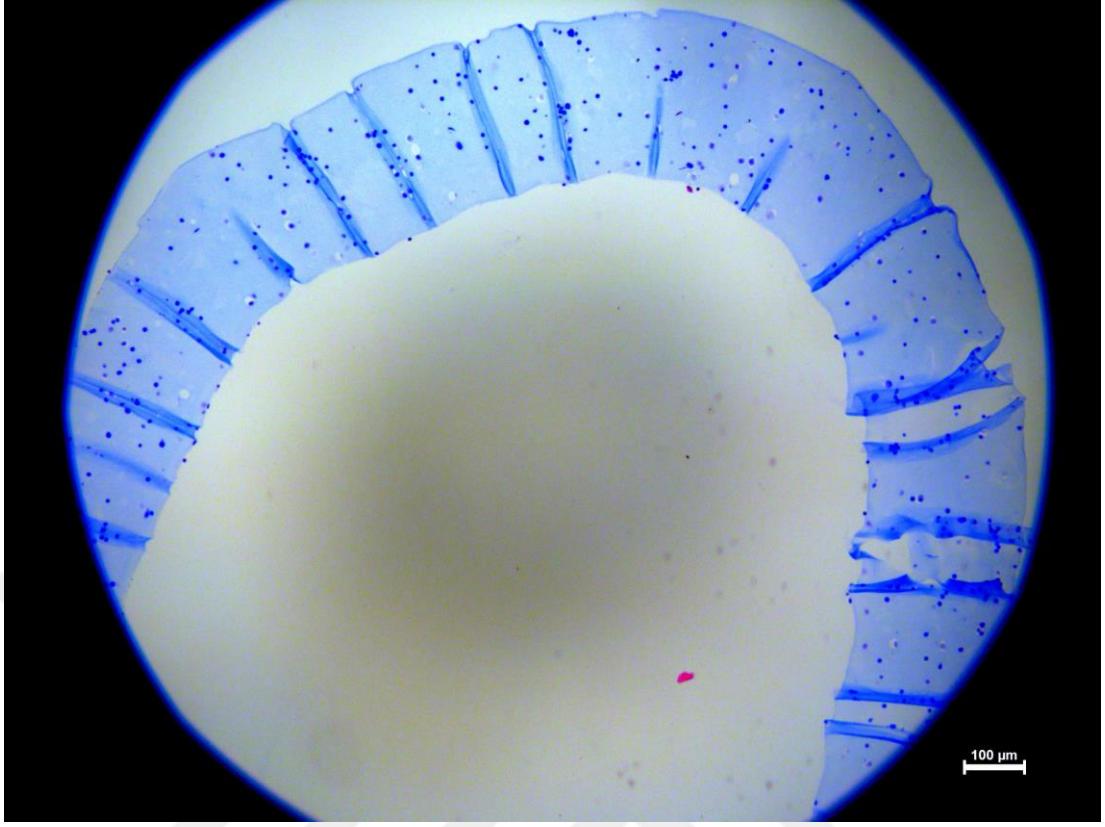
Çizelge 3.2. Üretilen filmler için sitotoksisite değerlendirme sonuçları

Sitotoksik cevap indeksi	“Malzeme Sitotoksiktir”
0,3	Hayır

3.3. Hücre Kültürü Bulguları

Hidrojel doku iskelesinin tüm yüzeyini kaplayacak şekilde eşit bir hücre dağılımı hedeflenmiştir. Bu dağılımın net gözlemlenmesi için kültürün 3. günü katlanmış örneğe Crossman’ın üçlü boyama tekniği uygulanmış ve kesit alınarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. Şekil 3.15’ te gösterilen mikroskop görüntüsünde hücrelerin katlanmış örnek içerisinde homojen dağılımı gözlemlenmiştir.

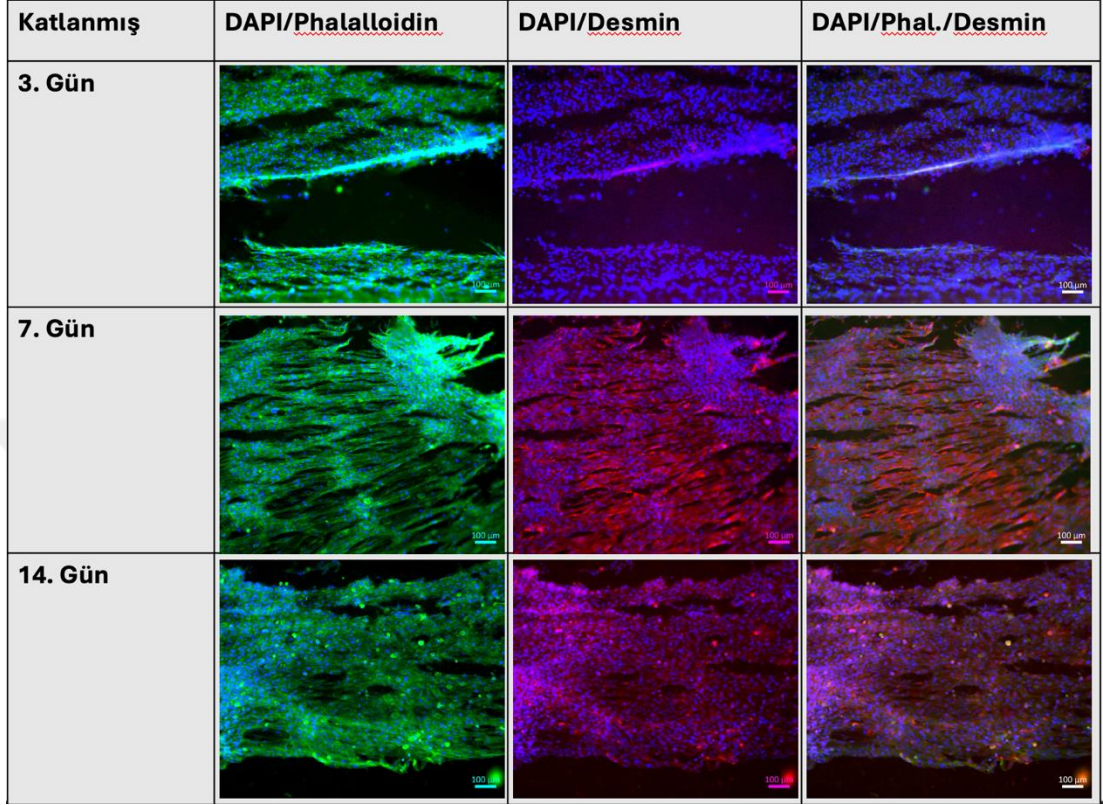
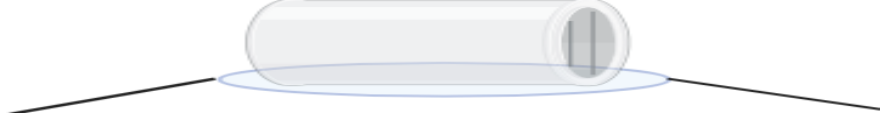
Hücreli hidrojel doku iskelelerinde hücrelerin morfolojik özelliklerini ve yüzey üzerindeki dağılımlarını değerlendirmek için kültür sürecinin 3. 7. ve 14. günlerinde DAPI/ Phalloidin boyama yöntemi uygulanmıştır. Bunun yanında miyojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi için Desmin antikoruna bağlanmıştır. Bu boyama aşamaları, hücrelerin hidrojeldeki morfolojilerini, dağılımlarını ve miyojenik farklılaşmayı detaylı bir şekilde inceleme imkânı sunmuştur.



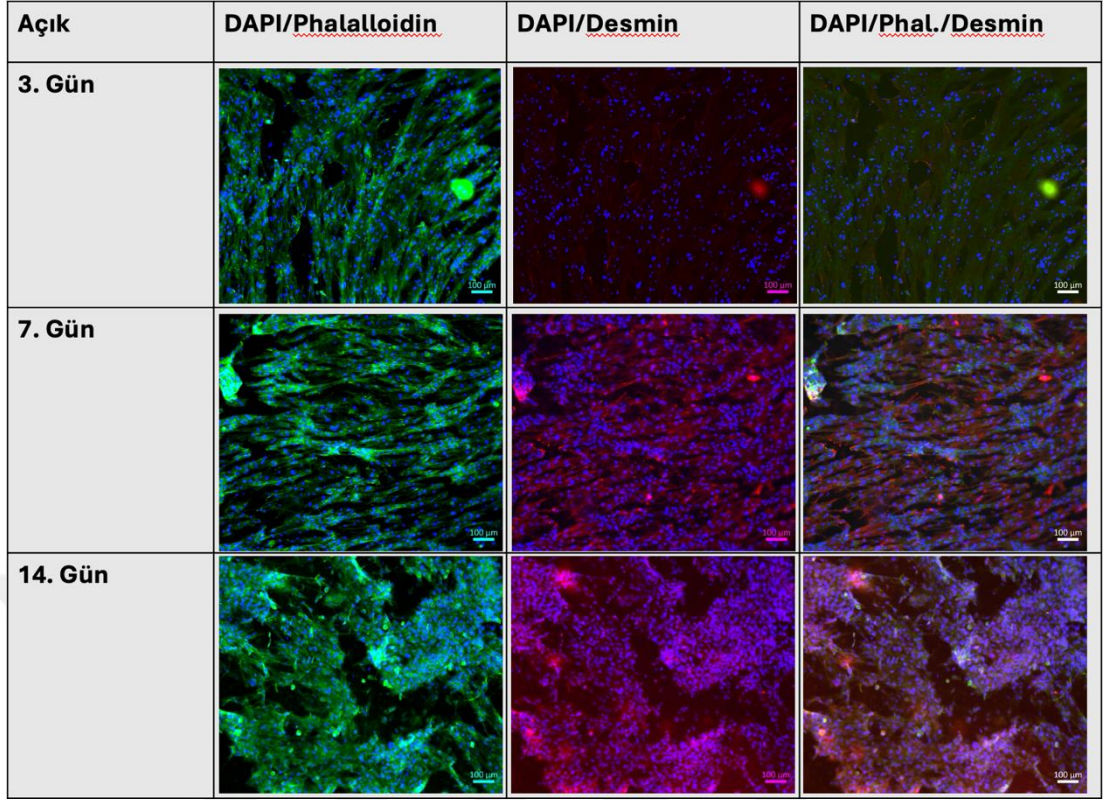
Şekil 3.15. Katlanmış örnek 3. gün hücre dağılımı (100 μm)

Şekil 3.16' da gösterilen katlanmış örneklerle uygulanan DAPI/Phalloidin/Desmin boyaması, hücrelerin iyi tutunabildiği, morfolojilerini koruyup çoğalabildikleri ve Desmin belirtecinin hücre yoğunluğuna uygunluğu gözlemlenmiştir.

Benzer şekilde, Şekil 3.17' de gösterilen açık örneklerle uygulanan DAPI/Phalloidin/Desmin boyaması, hücrelerin iyi tutunabildiği, morfolojilerini koruyup çoğalabildikleri ve Desmin belirtecinin hücre yoğunluğuna uygunluğu gözlemlenmiştir.



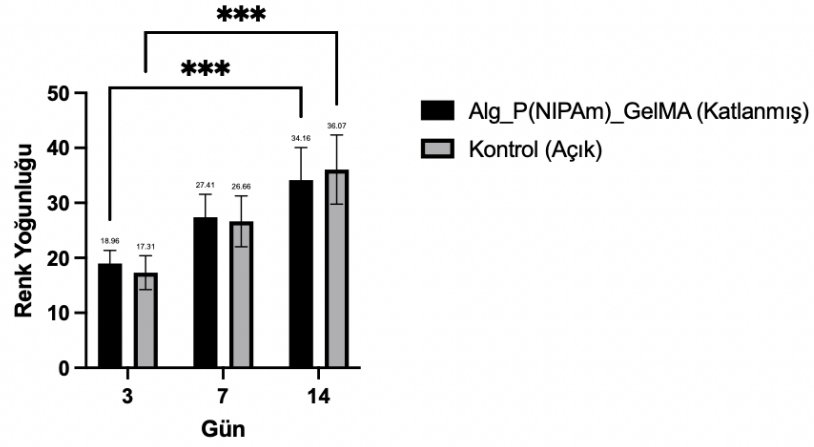
Şekil 3.16. Katlanmış örneklerde 3, 7 ve 14. günlerde hücre yayılımı, morfolojisi ve miyojenik farklılaşmanın gözlemlenmesi. DAPI mavi renk, Phalloidin yeşil renk ve Desmin kırmızı renk ile gösterilmektedir. (100 µm)



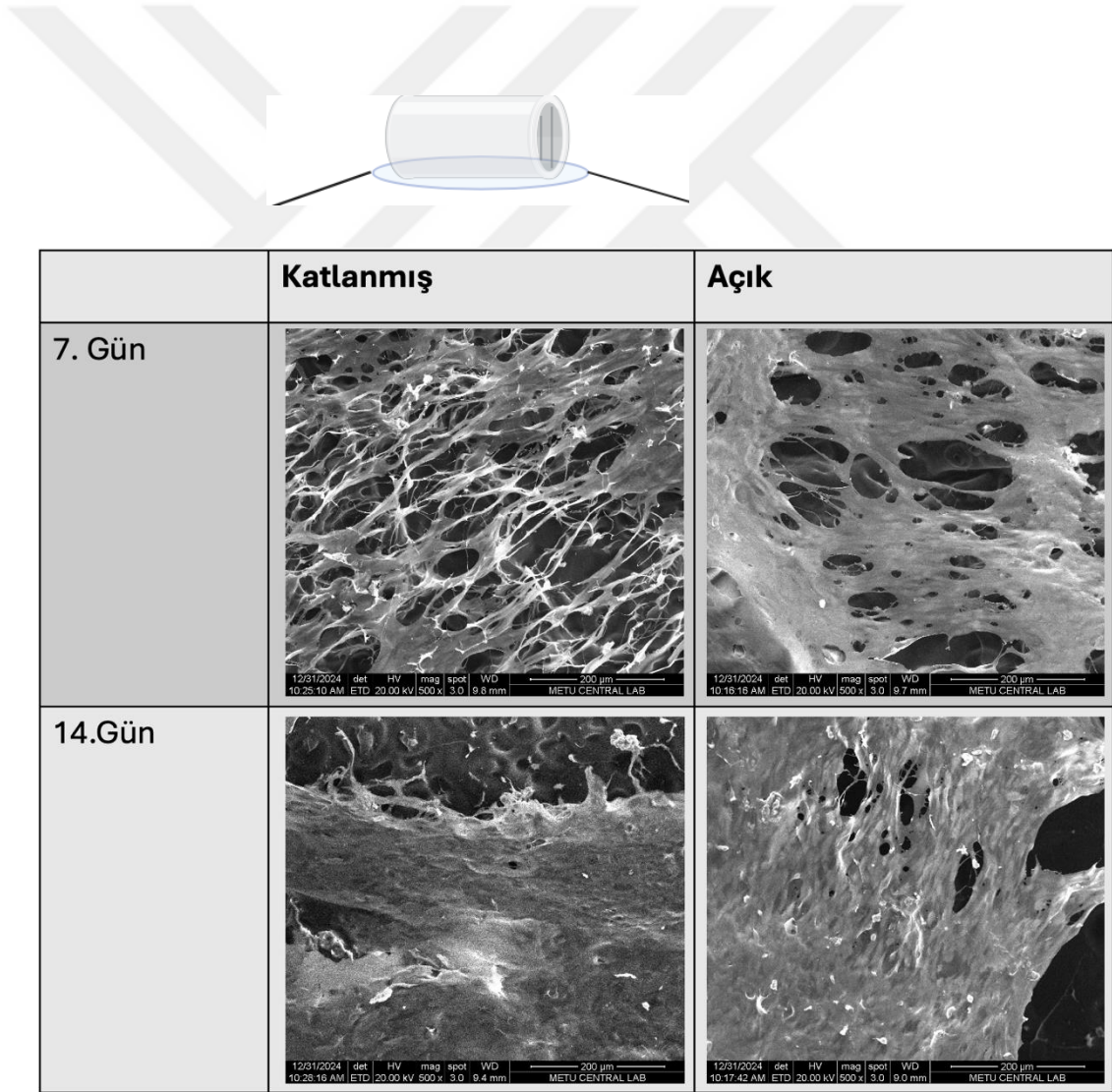
Şekil 3.17. Açık örneklerde 3, 7 ve 14. günlerde hücre yayılımı, morfolojisi ve miyojenik farklılaşmanın gözlemlenmesi. DAPI mavi renk, Phalloidin yeşil renk ve Desmin kırmızı renk ile gösterilmektedir. (100 µm)

Miyojenik farklılaşmanın gözlemlenmesi immünfloresan boyama yoluyla gerçekleştirilmiştir. Kırmızı renk ile gösterilen Desmin boyamasının görüntülerdeki renk yoğunluğu Şekil 3.18.' de verilmiştir. 3. ve 14. Günler arasında anlamlı ($*p>0,05$) artış gözlemlenmiştir.

Kültür sonrası katlanmış ve açık hidrojellerdeki 7. ve 14. gün hücre yayılımını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen SEM görüntüleri Şekil 3.19.' te gösterilmiştir. 7 ve 14. günler arasında hücre yayılımında artış gözlemlenmiştir.



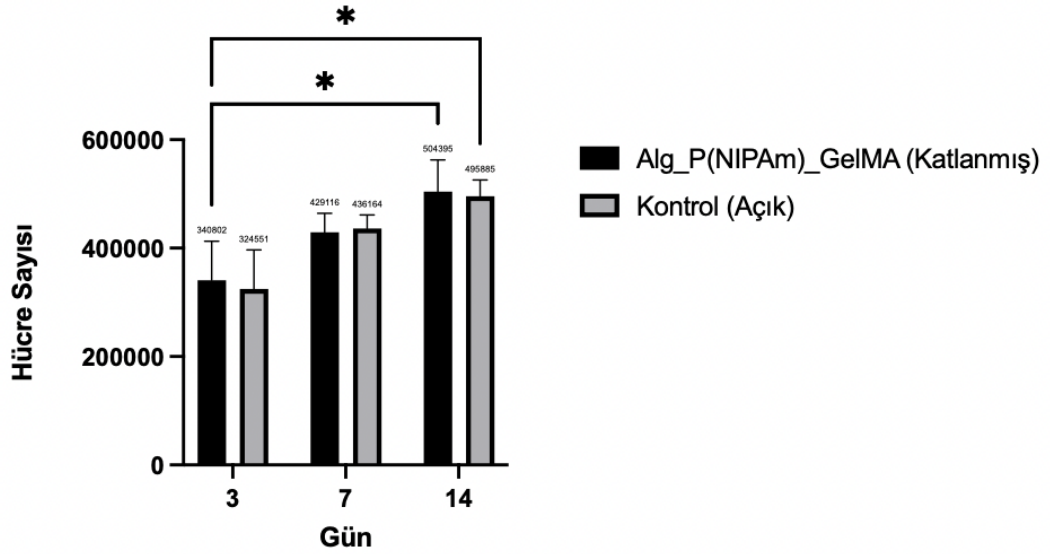
Şekil 3.18. Desmin boyamasının görüntülerdeki renk yoğunluğu (* $p>0,05$)



Şekil 3.19. Katlanmış ve açık örneklerde 7 ve 14. günlerde hücre yayılımı SEM görüntüleri

Hücre yüklü hidrojellerdeki hücre sayısının kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla, kültür süresi boyunca 3., 7. ve 14. günlerde Alamar Blue testi uygulanmıştır. Hidrojellerin hücre konsantrasyonu (5000 hücre/ μ l) baz alınarak, her bir örneğe yaklaşık 500.000 hücre eklendiği hesaplanmıştır. Şekil 3.1.'de sunulan Alamar Blue sonuçları itibarıyla, kültürlenmiş örneklerde, 3. gün itibarıyla, yaklaşık %70 hücre canlılık oranı ve sonraki günlerde çoğalma gözlemlenmiştir.

Tüm örneklerde 3. günden itibaren hücre sayısında bir artış gözlenmiştir. 14. gün itibarıyla, katlanmış örnekler (Alg_P(NIPAm)_GelMA) ve açık örnekler (kontrol) arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Açık ve katlanmış örneklerin kültür esnasındaki hücre sayıları karşılaştırıldığında, her iki grupta da 3. günden itibaren hücre çoğalma hızında artış gözlenmiş ve 14. gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı (**p<0,005) hücre artışları kaydedilmiştir. Hücre artış oranını gösteren Alamar Blue analiz sonuçları Şekil 3.20.' te gösterilmiştir.



Şekil 3.20. Alamar Blue analiz sonuçları (**p<0,005)

4. TARTIŞMA

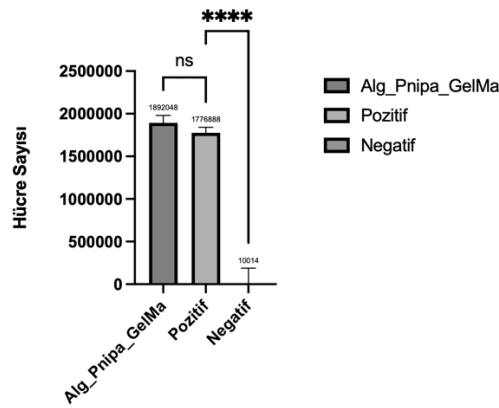
Sıcaklık duyarlı hidrojelin katlanması değerlendirildiğinde, P(NIPAm), akrilamid türevleri arasında en yaygın kullanılan sıcaklığa duyarlı polimerlerden biridir. Bu polimerin en dikkat çekici özelliklerinden biri, sıcaklık değişimlerine yanıt olarak hidrofilik ve hidrofobik grupları arasında faz geçişi gerçekleştirebilmesidir. Özellikle, belirli bir sıcaklık aralığında, ısıtma veya soğutma döngüleri uygulandığında, polimerin su emme (swelling) ve büzüşerek suyu bırakma (shrinking) kapasitesinde kayda değer değişiklikler meydana gelir. Bu dönüşüm, polimerin düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) olarak adlandırılan bir noktada gerçekleşir ve P(NIPAm)'ın termal yanıtılık özelliklerini tanımlayan en temel mekanizmalardan biridir. P(NIPAm)'ın LCST sıcaklığı 32°C civarında olup, bu sıcaklık fizyolojik koşullara (örneğin 37°C) oldukça yakın olduğu için polimerin biyolojik uygulamalar açısından uygun bir aday olarak değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Bu özellik, P(NIPAm)'ı hücre kültürü, ilaç salınım sistemleri ve doku mühendisliği gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanıma elverişli hale getirmektedir. Ancak, doğrudan ısıtma ve soğutma döngülerine dayalı yöntemler, P(NIPAm) tabanlı platformların katlanma mekanizmalarının kontrolünde bazı zorluklara yol açabilir. Sıcaklık değişimlerinin polimerin faz geçiş sürecinde düzensizliklere neden olması, bu kontrol sorunlarının başlıca kaynağıdır (Ohnsorg vd., 2019).

Bu tez çalışmasında örneğin direkt sıcaklıkla temas ettirilmesi yerine ısıtılmış CaCl_2 ile temas ettirilmesi ve aljinat çapraz bağlanması ile eş zamanlı olarak katlanma kontrolünün gerçekleştirilmesi anahtar nokta olarak gösterilebilir.

4B basım optimizasyon bulguları değerlendirildiğinde, ilk deneylerde P(NIPAm) ile aljinat malzemeleri beraber çalışılmıştır. Ancak bilinmektedir ki aljinat malzemesi hücre tutunması ve yayılımı açısından zayıf bir malzemedir (Ergene vd., 2020). Bu sebeple aljinat malzemesinin konsantrasyonunu belli bir sınırdan tutulması gerekmektedir. Ancak aljinat malzemesinin konsantrasyonunu düşük tutulması 3B baskı ve baskı sonrası örneğin fiziksel stabilitesine negatif etki edebilir. Baskı sonrası kültürde fiziksel stabiliteyi güçlendirmek ve hücre tutunumunu artırabilmek için GelMA eklenmesi gerekli görüldü. GelMA'nın Aljinatın sağladığı yapı stabilitesine ek olarak hücre tutunumu ve çoğalması üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Böylece, doku modelinde hem fiziksel dayanıklılık hem de hücre uyumluluğu artırıldı.

Bunun yanında elatin metakrilat (GelMA) çözeltileri, termal özellikleri nedeniyle belirli bir sıcaklık aralığında farklı fiziksel fazlarda bulunma özelliği göstermektedir. 21°C'nin altında, GelMA çözeltileri katı haldeyken, bu sıcaklığın üzerinde sıvı hale geçiş yapmaktadır. Bu faz değişimi, GelMA'nın biyomedikal uygulamalarda kullanımını etkileyen temel özelliklerden biridir ve özellikle doku mühendisliği, biyobaskı ve hücre kültürü gibi alanlarda büyük önem taşır (Yue vd., 2015). Termal geçiş davranışı, GelMA'nın çözünübilirlik, form verme ve işlenebilirlik gibi özelliklerini doğrudan etkileyerek biyolojik süreçlerde kullanımını kolaylaştırır. Ancak baskı esnasında GelMA malzemesinin sıvı formda olması baskıyı zorlaştırırken, iç desen dizaynının da kaybolmasına sebep olabilir. Bu sebeple ilerleyen çalışmalarda baskı tablasının sıcaklığının düşürülmesi gibi çözümler sunulabilir.

Sitotoksosite testi değerlendirildiğinde, Çizelge 3.2' de verilen sitotoksosite değerlendirme sonuçlarına ve Alamar Blue analizinde gözlemlenen hücre artışına dayanarak hazırlanan örneklerin sitotoksik olmadığı söylenebilmektedir. Sitotoksosite analizinde Alg_P(NIPAm)_GelMA (sample), pozitif (+) grupları ve negatif (-) grup arasında istatistiksel olarak anlamlı (****p<0,0001) fark gözlemlenmiştir. Hücre sayılarındaki fark Şekil 4.1.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Sitotoksosite hücre sayısı sonuçları (****p<0,0001)

Hücre canlılığı ve yayılımı değerlendirildiğinde, 3B biyobaskı sürecinde hücreler, inkübasyon aşamasına ulaşana kadar birçok fiziksel ve kimyasal stres faktörüne maruz kalmakta ve hayatta kalabilmek için bu zorluklarla başa çıkmak zorundadır. Hücreler, hidrojel çözeltilerine karıştırıldıkları andan itibaren karıştırma hareketi sırasında oluşan kesme kuvvetlerine, besiyerinin yetersizliğine, baskı sırasında süspansiyon içinde bekleme süresine, soğuk ortam koşullarına ve özellikle iğne ucundan geçerken karşılaştıkları yüksek kesme

kuvvetlerine maruz kalmaktadır. Tüm bu faktörler, hücrelerin canlılığını önemli ölçüde etkileyerek hayatta kalma oranlarını düşürmektedir (Xu vd., 2022).

Çalışmalarda, iğne ucu kesme kuvvetinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde incelenmiş ve baskı işlemi sırasında hücre canlılığında kayda değer bir azalma meydana geldiği rapor edilmiştir (Boularaoui vd., 2022). Bu nedenle, baskı işlemi tamamlandıktan sonra başlangıçtaki hücre konsantrasyonunun ne kadarının inkübasyon sürecinde hayatta kaldığını belirlemek büyük önem taşımaktadır.

Bu sonuçlar, 3B biyobaskı süreçlerinin hücre canlılığı üzerindeki olumsuz etkilerini net bir şekilde ortaya koymakta ve biyobaskı tekniklerinin daha hücre dostu hale getirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Hücrelerin hayatta kalma oranlarını artırmak için, iğne ucu tasarımının optimize edilmesi, karıştırma sürecindeki kesme kuvvetlerinin azaltılması ve besiyeri desteğinin artırılması gibi stratejilerin uygulanması gerekmektedir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, hücre canlılığı ve yayılımı gözlemlenmiştir. 14 günlük kültür süresince yapılan bütün analizlerde 3. ve 14. Günler arasında anlamlı fark gözlenmiştir. Bunun yanında 7. ve 14. Günler arasında beklenildiği kadar büyük farklar gözlemlenmemiştir. Bunun başlıca sebebi malzemenin düşük vizkozitesinden kaynaklı olarak baskı sonrası tasarımdaki desen yapısının kaybolması ve bu sebeple hücreler için çoğalacak alanın azalması olarak görülmektedir. Bu desen yapısını korumak ve hücrelere daha geniş yüzey alanına sahip doku iskeleleri üretmek gerekmektedir. Bu durumda hücrelerin büyüme oranının artacağı düşünülmektedir.

Farklılaşma bulgularında ise benzer sonuçlar elde edilmiştir. 3. ve 14. Günler arasında anlamlı fark gözlenmiştir. Bunun yanında 7. ve 14. Günler arasında beklenildiği kadar büyük farklar gözlemlenmemiştir. SEM görüntüleri ile birlikte değerlendirildiğinde hücrelerin malzeme yüzeyine yayıldığı ve bir süre sonra sığamadığı gözlemlenmiştir. 14 gün sonunda hücreler yüzeyi tamamen kaplamış durumdadır. Hücrelerin sıkışarak çoğalmaya çalışmasının farklılaşma hızını düşürmüş olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında katlanmış ve açık örneklerin hücre yayılımı ve farklılaşma değerlerine bakıldığında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Bu durum katlanmanın fiziksel etkilerinin hücrelere olumsuz bir durum oluşturmadığını göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Artan organ ihtiyacı, doku mühendisliği alanında yeni çözümler geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Özellikle organ nakline alternatif yöntemlerin oluşturulması için yapılan araştırmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Ancak laboratuvar ortamında işlevsel bir doku üretmek, pek çok bilimsel ve teknik zorluğu beraberinde getirmektedir. Bu zorlukların çözümüne yönelik olarak, farklı disiplinlerden bilim insanları dokuların gelişimi sırasında rol oynayan biyolojik, kimyasal ve fiziksel mekanizmaları anlamaya odaklanmaktadır. Bu tez çalışmasında, hücre taşıma iskelelerinin üretim süreçleri, malzeme-fabrikasyon uyumu ve hücre-malzeme etkileşimleri gibi temel konular üzerinde durulmuştur.

Çalışmada ilk olarak, üretim süreçlerinde karşılaşılan temel problemler tespit edilmiş ve bu problemlerin çözümüne yönelik ayrıntılı yöntemler geliştirilmiştir. Üretilen iskelelerin, sıcaklık uyarım özelliği kullanılarak zamana bağlı şekil değişim kabiliyetleri incelenmiştir. İskelet kası öncü hücreleri olan C2C12 hücrelerinin bu sistemler içerisindeki davranışları, çeşitli biyoteknolojik yöntemler yardımıyla analiz edilmiştir.

Bu amaçla P(NIPAm) gibi termal olarak duyarlı bir polimer kullanılmıştır. Bunun yanında, biyolojik süreçlere daha uygun olduğu bilinen doğal polimerler üzerinde durulmuştur. Jelatin, hücrelerin tutunma, çoğalma ve farklılaşma gibi süreçlerini destekleyen bir biyomalzeme olarak kullanılmıştır. Ancak jelatinin çapraz bağlanma zorlukları ve kullanılan reaktiflerin toksik etkileri nedeniyle, foto-çapraz bağlanabilir jelatin metakrilat (GelMA) tercih edilmiştir. Bunun yanında, aljinat malzemesi kullanılarak viskozite artırılmış ve 3B yazıcıya uygun bir biyomürekkep haline getirilmiştir. Bu biyomürekkep, hem hücre uyumu hem de baskı işlemi için gerekli teknik koşulları karşılamıştır. Aynı zamanda katlanmış ve açık örnekler arasında hücre yayılımı ve farklılaşmasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Bu tez çalışmasının sonuçları, hücre-malzeme etkileşimlerinin optimize edilmesiyle biyolojik süreçlerin etkin bir şekilde desteklenebileceğini göstermektedir. Kendiliğinden katlanabilir sistemler ve 4B biyobaskı yöntemleri, biyomedikal uygulamalarda geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir. Gelecekte, birden fazla hücre hattı kullanılarak iç içe olan dokuların taklit edilmesi mümkün olabilir. Bu sistemlerin daha da geliştirilmesiyle, dokuların kendi çevrelerini taklit eden yapılar üretilebilecektir.

KAYNAKLAR

- Ahlstrom, J.D. (2019). Molecular organization of cells. In Principles of Regenerative Medicine (pp. 1-13). Academic Press.
- Asadpour, S., Kargozar, S., Moradi, L., Ai, A., Nosrati, H. & Ai, J. (2020). Natural biomacromolecule based composite scaffolds from silk fibroin, gelatin and chitosan toward tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 1285-1294.
- Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A. & Davaran, S. (2017). Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(2), 185-192.
- Athanasίου, K.A., Agrawal, C.M., Barber, F.A. & Burkhart, S.S. (1998). Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 14(7), 726-737.
- Backes, E.H., Harb, S.V., Beatrice, C.A.G., Shimomura, K.M.B., Passador, F.R., Costa, L.C. & Pessan, L.A. (2022). Polycaprolactone usage in additive manufacturing strategies for tissue engineering applications: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110(6), 1479-1503.
- Baker, S.C., Atkin, N., Gunning, P.A., Granville, N., Wilson, K., Wilson, D. & Southgate, J. (2006). Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. *Biomaterials*, 27(16), 3136-3146.
- Barbetta, A., Gumiero, A., Pecci, R., Bedini, R. & Dentini, M. (2009). Gas-in-liquid foam templating as a method for the production of highly porous scaffolds. *Biomacromolecules*, 10(12), 3188-3192.
- Basurto, I.M., Muhammad, S.A., Gardner, G.M., Christ, G.J. & Caliarì, S.R. (2022). Controlling scaffold conductivity and pore size to direct myogenic cell alignment and differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(10), 1681-1694.
- Boulaoui, S., Shanti, A., Khan, K.A., Iacoponi, S., Christoforou, N. & Stefanini, C. (2022). Harnessing shear stress preconditioning to improve cell viability in 3D post-printed biostructures using extrusion bioprinting. *Bioprinting*, 25, e00184.
- Bushkalova, R., Farno, M., Tenailleau, C., Duployer, B., Cussac, D., Parini, A., Sallerin, B. & Fullana, S. G. (2019). Alginate-chitosan PEC scaffolds: A useful tool for soft tissues cell therapy. *International journal of pharmaceuticals*, 571, 118692.
- Buttafoco, L., Engbers-Buijtenhuijs, P., Poot, A.A., Dijkstra, P.J., Daamen, W., Van Kuppevelt, T., Vermes, I. & Feijen, J. (2006). First steps towards tissue engineering of small-diameter blood vessels: preparation of flat scaffolds of collagen and elastin by means of freeze drying. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 77(2), 357-368.
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K. & Fang, Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate polymers*, 242, 116389.

- Ceccaldi, C., Bushkalova, R., Cussac, D., Duployer, B., Tenailleau, C., Bourin, P., Parini, A., Sallerin, B. & Fullana, S.G. (2017). Elaboration and evaluation of alginate foam scaffolds for soft tissue engineering. *International journal of pharmaceutics*, 524(1-2), 433-442.
- Cengiz, I. F., Oliveira, J.M. & Reis, R.L. (2018). Micro-CT—a digital 3D microstructural voyage into scaffolds: a systematic review of the reported methods and results. *Biomaterials research*, 22(1), 26.
- Chae, S., Ha, D.H. & Lee, H. (2023). 3D bioprinting strategy for engineering vascularized tissue models. *International Journal of Bioprinting*, 9(5).
- Chattopadhyay, S. and Raines, R.T. (2014). Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, 101(8), 821-833.
- Chawla, D., Kaur, T., Joshi, A. & Singh, N. (2020). 3D bioprinted alginate-gelatin based scaffolds for soft tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 560-567.
- Chen, S., John, J.V., McCarthy, A., Carlson, M.A., Li, X. & Xie, J. (2020). Fast transformation of 2D nanofiber membranes into pre-molded 3D scaffolds with biomimetic and oriented porous structure for biomedical applications. *Applied Physics Reviews*, 7(2).
- Chen, Y., Jia, Z., Shafiq, M., Xie, X., Xiao, X., Castro, R., Rodrigues, J., Wu, J., Zhou, G. & Mo, X. (2021). Gas foaming of electrospun poly (L-lactide-co-caprolactone)/silk fibroin nanofiber scaffolds to promote cellular infiltration and tissue regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 201, 111637.
- Chia, O.C., Suhaimin, I.S., Kassim, S.A., Zubir, S.A. & Abdullah, T.K. (2019). Effect of modified solvent casting/particulate leaching (SCPL) technique on the properties of bioactive glass reinforced polyurethane scaffold for biomedical applications. *J. Phys. Sci*, 30, 115-126.
- Choi, H., Choi, W.S. & Jeong, J.O. (2024). A Review of Advanced Hydrogel Applications for Tissue Engineering and Drug Delivery Systems as Biomaterials. *Gels*, 10(11), 693.
- Confederat, L.G., Tuchilus, C.G., Dragan, M., Sha'at, M. & Dragostin, O.M. (2021). Preparation and antimicrobial activity of chitosan and its derivatives: A concise review. *Molecules*, 26(12), 3694.
- Cramariuc, B., Cramariuc, R., Scarlet, R., Manea, L.R., Lupu, I.G. & Cramariuc, O. (2013). Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*, 71(3), 189-198.
- Crisco, J.J., Jokl, P., Heinen, G.T., Connell, M.D. & Panjabi, M.M. (1994). A muscle contusion injury model: biomechanics, physiology, and histology. *The American journal of sports medicine*, 22(5), 702-710.
- Cui, H., Nowicki, M., Fisher, J.P. & Zhang, L.G. (2017). 3D bioprinting for organ regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 6(1), 1601118.
- Cui, Q., Bell, D.J., Rauer, S.B. & Wessling, M. (2020). Wet-spinning of biocompatible core-shell polyelectrolyte complex fibers for tissue engineering. *Advanced Materials Interfaces*, 7(23), 2000849.
- da Silva, S.L.P., de Faria, A.C.B., dos Santos, G.M., de Lima Ribeiro, C., Aiube, C.M., de Souza, R.N., de Assis Silva, J.P.S., Athayde, D.D., de Sousa Lima, L.F. & Mohallem, N.D.S. (2024). Role of solvent composition and sintering time on the porosity of α -alumina monoliths produced by freeze casting. *Journal of the American Ceramic Society*.

- Davydova, G.A., Chaikov, L.L., Melnik, N.N., Gainutdinov, R.V., Selezneva, I.I., Perevedentseva, E.V., Mahamadiev, M.T., Proskurin, V.A., Yakovsky, D.S. & Mohan, A.G. (2024). Polysaccharide Composite Alginate–Pectin Hydrogels as a Basis for Developing Wound Healing Materials. *Polymers*, 16(2), 287.
- De la Portilla, F., Pereira, S., Molero, M., De Marco, F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A. & Romero, A. (2016). Microstructural, mechanical, and histological evaluation of modified alginate-based scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(12), 3107-3114.
- Demir, D. (2014). *Küre formunda kriyojel doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu* Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin Üniversitesi.
- Dias, J.R., Sousa, A., Augusto, A., Bártolo, P.J. & Granja, P.L. (2022). Electrospun polycaprolactone (PCL) degradation: An in vitro and in vivo study. *Polymers*, 14(16), 3397.
- Dickman, C.T., Russo, V., Thain, K., Pan, S., Beyer, S.T., Walus, K., Getsios, S., Mohamed, T. & Wadsworth, S.J. (2020). Functional characterization of 3D contractile smooth muscle tissues generated using a unique microfluidic 3D bioprinting technology. *The FASEB Journal*, 34(1), 1652-1664.
- Duarte, A.R.C., Santo, V.E., Alves, A., Silva, S.S., Moreira-Silva, J., Silva, T.H., Marques, A.P., Sousa, R.A., Gomes, M.E. & Mano, J.F. (2013). Unleashing the potential of supercritical fluids for polymer processing in tissue engineering and regenerative medicine. *The Journal of Supercritical Fluids*, 79, 177-185.
- Dutta, S.D., Hexiu, J., Patel, D.K., Ganguly, K. & Lim, K.T. (2021). 3D-printed bioactive and biodegradable hydrogel scaffolds of alginate/gelatin/cellulose nanocrystals for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 644-658.
- Frontera, W.R. and Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96, 183-195.
- Elsayed, Y., Lekakou, C., Labeed, F. & Tomlins, P. (2016). Smooth muscle tissue engineering in crosslinked electrospun gelatin scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(1), 313-321.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L. & Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677-689.
- Ergene, E., Bilecen, D.S., Kaya, B., Huri, P.Y. & Hasirci, V. (2020). 3D cellular alignment and biomimetic mechanical stimulation enhance human adipose-derived stem cell myogenesis. *Biomedical Materials*, 15(5), 055017.
- Farzan, A., Borandeh, S., Ezazi, N.Z., Lipponen, S., Santos, H.A. & Seppälä, J. (2020). 3D scaffolding of fast photocurable polyurethane for soft tissue engineering by stereolithography: Influence of materials and geometry on growth of fibroblast cells. *European Polymer Journal*, 139, 109988.
- Fridrikh, S.V., Yu, J.H., Brenner, M.P. & Rutledge, G.C. (2003). Controlling the fiber diameter during electrospinning. *Physical review letters*, 90(14), 144502.
- Frith, J.E., Menzies, D.J., Cameron, A.R., Ghosh, P., Whitehead, D.L., Gronthos, S., Zannettino, A.C. & Cooper-White, J.J. (2014). Effects of bound versus soluble pentosan polysulphate in PEG/HA-based hydrogels tailored for intervertebral disc regeneration. *Biomaterials*, 35(4), 1150-1162.

- Garrison, C.M., Singh-Varma, A., Pastino, A.K., Steele, J.A., Kohn, J., Murthy, N.S. & Schwarzbauer, J.E. (2021). A multilayered scaffold for regeneration of smooth muscle and connective tissue layers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(5), 733-744.
- Gillies, A.R. and Lieber, R.L. (2011). Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & nerve*, 44(3), 318-331.
- Grasman, J.M., Zayas, M.J., Page, R.L. & Pins, G.D. (2015). Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta biomaterialia*, 25, 2-15.
- Grenier, J., Duval, H., Barou, F., Lv, P., David, B. & Letourneur, D. (2019). Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying. *Acta Biomaterialia*, 94, 195-203.
- Gu, B.K., Choi, D.J., Park, S.J., Kim, M.S., Kang, C.M. & Kim, C.H. (2016). 3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications. *Biomaterials research*, 20(1), 12.
- Gudapati, H., Dey, M. & Ozbolat, I. (2016). A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials*, 102, 20-42.
- Guo, Y., Gilbert-Honick, J., Somers, S.M., Mao, H.Q. & Grayson, W.L. (2019). Modified cell-electrospinning for 3D myogenesis of C2C12s in aligned fibrin microfibril bundles. *Biochemical and biophysical research communications*, 516(2), 558-564.
- He, D. and Li, H. (2021). Biomaterials affect cell-cell interactions in vitro in tissue engineering. *Journal of Materials Science & Technology*, 63, 62-72.
- Hollister, S.J., Maddox, R. & Taboas, J.M. (2002). Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials*, 23(20), 4095-4103.
- Hu, C., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K. & Fang, Y. (2021). Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 578-588.
- Jia, L., Prabhakaran, M. P., Qin, X., Kai, D. & Ramakrishna, S. (2013). Biocompatibility evaluation of protein-incorporated electrospun polyurethane-based scaffolds with smooth muscle cells for vascular tissue engineering. *Journal of Materials Science*, 48, 5113-5124.
- Jiang, Y.C., Jiang, L., Huang, A., Wang, X.F., Li, Q. & Turng, L.S. (2017). Electrospun polycaprolactone/gelatin composites with enhanced cell-matrix interactions as blood vessel endothelial layer scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 901-908.
- Khademhosseini, A. and Langer, R. (2016). A decade of progress in tissue engineering. *Nature protocols*, 11(10), 1775-1781.
- Khoo, Z.X., Teoh, J.E.M., Liu, Y., Chua, C.K., Yang, S., An, J. & Yeong, W.Y. (2015). 3D printing of smart materials: A review on recent progresses in 4D printing. *Virtual and Physical Prototyping*, 10(3), 103-122.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.
- Kumar, M. and Sharma, V. (2021). Additive manufacturing techniques for the fabrication of tissue engineering scaffolds: a review. *Rapid Prototyping Journal*, 27(6), 1230-1272.
- Kundak, H. and Bilisik, K. (2023). Development of three-dimensional (3D) biodegradable polyglycolic acid fiber (PGA) preforms for scaffold applications: experimental patterning and fiber volume fraction-porosity modeling study. *Polymers*, 15(9), 2083.

- Kuo, C.K., and Ma, P.X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22(6), 511-521.
- Langer, R., and Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926.
- Laternser, S., Keller, H., Leupin, O., Rausch, M., Graf-Hausner, U. & Rimann, M. (2018). A novel microplate 3D bioprinting platform for the engineering of muscle and tendon tissues. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation*, 23(6), 599-613.
- Lee, M., Wu, B.M. & Dunn, J.C. (2008). Effect of scaffold architecture and pore size on smooth muscle cell growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 87(4), 1010-1016.
- Lee, S. W., Kim, G. H. & Seo, M. H. (2020). Polymer nanoparticle freeze-dried product, and preparation method therefor. In: Google Patents.
- Li, Y., Cummins, J. & Huard, J. (2001). Muscle injury and repair. *Current opinion in orthopaedics*, 12(5), 409-415.
- Lim, K.S., Levato, R., Costa, P.F., Castilho, M.D., Alcalá-Orozco, C.R., Van Dorenmalen, K.M., Melchels, F.P., Gawlitta, D., Hooper, G.J. & Malda, J. (2018). Bio-resin for high resolution lithography-based biofabrication of complex cell-laden constructs. *Biofabrication*, 10(3), 034101.
- Loh, Q.L. and Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size.
- Luo, Y., Hu, Z., Ni, R., Xu, R., Zhao, J., Feng, P., Zhu, T., Chen, Y., Yao, J. & Yao, Y. (2024). Fabrication of 3D Biomimetic Smooth Muscle Using Magnetic Induction and Bioprinting for Tissue Regeneration. *Biomaterials research*, 28, 0076.
- Lüken, A., Geiger, M., Steinbeck, L., Joel, A.C., Lampert, A., Linkhorst, J. & Wessling, M. (2021). Biocompatible Micron-Scale Silk Fibers Fabricated by Microfluidic Wet Spinning. *Advanced Healthcare Materials*, 10(20), 2100898.
- Macchiarini, P., Jungebluth, P., Go, T., Asnaghi, M.A., Rees, L.E., Cogan, T.A., Dodson, A., Martorell, J., Bellini, S. & Parnigotto, P.P. (2008). RETRACTED: clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet*, 372(9655), 2023-2030.
- Malikmammadov, E., Tanir, T.E., Kiziltay, A., Hasirci, V. & Hasirci, N. (2018). PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 29(7-9), 863-893.
- Manavitehrani, I., Le, T.Y., Daly, S., Wang, Y., Maitz, P.K., Schindeler, A. & Dehghani, F. (2019). Formation of porous biodegradable scaffolds based on poly (propylene carbonate) using gas foaming technology. *Materials Science and Engineering: C*, 96, 824-830.
- Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K. & Kim, D.H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, 34(4), 422-434.
- Mao, D., Li, Q., Bai, N., Dong, H. & Li, D. (2018). Porous stable poly (lactic acid)/ethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffolds prepared by a combined method for bone regeneration. *Carbohydrate polymers*, 180, 104-111.

- Matai, I., Kaur, G., Seyedsalehi, A., McClinton, A. & Laurencin, C.T. (2020). Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*, 226, 119536.
- Mi, H.Y., Jing, X., Salick, M.R., Cordie, T.M. & Turng, L.S. (2016). Carbon nanotube (CNT) and nanofibrillated cellulose (NFC) reinforcement effect on thermoplastic polyurethane (TPU) scaffolds fabricated via phase separation using dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvent. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 62, 417-427.
- Miao, S., Zhu, W., Castro, N.J., Leng, J. & Zhang, L.G. (2016). Four-dimensional printing hierarchy scaffolds with highly biocompatible smart polymers for tissue engineering applications. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 22(10), 952-963.
- Mokhova, E., Gordienko, M. & Menshutina, N. (2024). Investigation of the effect of infrared and ultrasonic exposure on the kinetics of vacuum freeze-drying of polymeric materials. Part 1: Development of device and process control system. *Drying Technology*, 42(4), 748-761.
- Moroni, L., De Wijn, J. & Van Blitterswijk, C. (2006). 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials*, 27(7), 974-985.
- Naureen, B., Haseeb, A., Basirun, W.J. & Muhamad, F. (2021). Recent advances in tissue engineering scaffolds based on polyurethane and modified polyurethane. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111228.
- Ng, F.L., Ong, Y.O., Chen, H.Z., Cao, Y., Tay, B.Y. & Tan, L.P. (2019). A facile method for fabricating a three-dimensional aligned fibrous scaffold for vascular application. *RSC advances*, 9(23), 13054-13064.
- O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V. & Gibson, L. (2004). Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 25(6), 1077-1086.
- Ohnsorg, M.L., Ting, J.M., Jones, S.D., Jung, S., Bates, F.S. & Reineke, T.M. (2019). Tuning PNIPAm self-assembly and thermoresponse: Roles of hydrophobic end-groups and hydrophilic comonomer. *Polymer Chemistry*, 10(25), 3469-3479.
- Pati, F., Jang, J., Ha, D.H., Won Kim, S., Rhie, J.W., Shim, J.H., Kim, D.H. & Cho, D.W. (2014). Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nature communications*, 5(1), 3935.
- Poursamar, S.A., Hatami, J., Lehner, A.N., da Silva, C.L., Ferreira, F.C. & Antunes, A.P.M. (2015). Gelatin porous scaffolds fabricated using a modified gas foaming technique: Characterisation and cytotoxicity assessment. *Materials Science and Engineering: C*, 48, 63-70.
- Prasad, A., Sankar, M.R. & Katiyar, V. (2017). State of art on solvent casting particulate leaching method for orthopedic scaffolds fabrication. *Materials Today: Proceedings*, 4(2), 898-907.
- Puertas-Bartolomé, M., Mora-Boza, A. & García-Fernández, L. (2021). Emerging biofabrication techniques: A review on natural polymers for biomedical applications. *Polymers*, 13(8), 1209.
- Qazi, T.H., Mooney, D.J., Pumberger, M., Geissler, S. & Duda, G.N. (2015). Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends. *Biomaterials*, 53, 502-521.
- Rahmati, M., Mills, D.K., Urbanska, A.M., Saeb, M.R., Venugopal, J.R., Ramakrishna, S. & Mozafari, M. (2021). Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*, 117, 100721.

- Raviv, D., Zhao, W., McKnelly, C., Papadopoulou, A., Kadambi, A., Shi, B. & Tibbits, S. (2014). Active printed materials for complex self-evolving deformations. *Scientific reports*, 4(1), 7422.
- Richard, C., Neild, A. & Cadarso, V.J. (2020). The emerging role of microfluidics in multi-material 3D bioprinting. *Lab on a Chip*, 20(12), 2044-2056.
- Rogers, L. (2011). Comparative Study of 3D Tissue Engineering Scaffold Fabrication Methods.
- Russo, T., Peluso, V., Gloria, A., Gargiulo, V., Alfe, M. & Ausanio, G. (2024). An integrated design strategy coupling additive manufacturing and matrix-assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) towards the development of a new concept 3D scaffold with improved properties for tissue regeneration. *Nanoscale Advances*, 6(12), 3064-3072.
- Samadi, K., Francisco, M., Hegde, S., Diaz, C.A., Trabold, T.A., Dell, E.M. & Lewis, C.L. (2019). Mechanical, rheological and anaerobic biodegradation behavior of a Poly (lactic acid) blend containing a Poly (lactic acid)-co-poly (glycolic acid) copolymer. *Polymer Degradation and Stability*, 170, 109018.
- Samadian, H., Maleki, H., Allahyari, Z. & Jaymand, M. (2020). Natural polymers-based light-induced hydrogels: Promising biomaterials for biomedical applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 420, 213432.
- Sarkar, S., Lee, G.Y., Wong, J.Y. & Desai, T.A. (2006). Development and characterization of a porous micro-patterned scaffold for vascular tissue engineering applications. *Biomaterials*, 27(27), 4775-4782.
- Serbest, K. and Eldoğan, O. (2014). İskelet kaslarının yapısı ve biyomekaniği. *Academic Platform-Journal of Engineering and Science*, 2(3), 41-51.
- Sharma, S., Sudhakara, P., Singh, J., Ilyas, R., Asyraf, M. & Razman, M. (2021). Critical review of biodegradable and bioactive polymer composites for bone tissue engineering and drug delivery applications. *Polymers*, 13(16), 2623.
- Singh, S., Kumar Paswan, K., Kumar, A., Gupta, V., Sonker, M., Ashhar Khan, M., Kumar, A. & Shreyash, N. (2023). Recent advancements in polyurethane-based tissue engineering. *ACS Applied Bio Materials*, 6(2), 327-348.
- Sonseca, A., Sahay, R., Stepien, K., Bukala, J., Wcislek, A., McClain, A., Sobolewski, P., Sui, X., Puskas, J. E. & Kohn, J. (2020). Architected helically coiled scaffolds from elastomeric poly (butylene succinate)(PBS) copolyester via wet electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110505.
- Suh, S.W., Shin, J.Y., Kim, J., Kim, J., Beak, C.H., Kim, D.I., Kim, H., Jeon, S.S. & Choo, I.W. (2002). Effect of different particles on cell proliferation in polymer scaffolds using a solvent-casting and particulate leaching technique. *ASAIO journal*, 48(5), 460-464.
- Terzopoulou, Z., Zamboulis, A., Koumentakou, I., Michailidou, G., Noordam, M.J. & Bikiaris, D.N. (2022). Biocompatible synthetic polymers for tissue engineering purposes. *Biomacromolecules*, 23(5), 1841-1863.
- Thorsteinsdóttir, S., Deries, M., Cachaço, A.S. & Bajanca, F. (2011). The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Developmental biology*, 354(2), 191-207.
- Tian, L., Ma, J., Li, W., Zhang, X. & Gao, X. (2023). Microfiber fabricated via microfluidic spinning toward tissue engineering applications. *Macromolecular Bioscience*, 23(3), 2200429.
- Tibbits, S. (2014). 4D printing: multi-material shape change. *Architectural design*, 84(1), 116-121.

- Tijore, A., Behr, J.M., Irvine, S.A., Baisane, V. & Venkatraman, S. (2018). Bioprinted gelatin hydrogel platform promotes smooth muscle cell contractile phenotype maintenance. *Biomedical microdevices*, 20, 1-10.
- Van Vlierberghe, S., Cnudde, V., Dubruel, P., Masschaele, B., Cosijns, A., De Paepe, I., Jacobs, P.J., Van Hoorebeke, L., Remon, J.P. & Schacht, E. (2007). Porous gelatin hydrogels: 1. Cryogenic formation and structure analysis. *Biomacromolecules*, 8(2), 331-337.
- Viray, C.M., van Magill, B., Zreiqat, H. & Ramaswamy, Y. (2022). Stereolithographic visible-light printing of poly (l-glutamic acid) hydrogel scaffolds. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8(3), 1115-1131.
- Wang, S., Shen, L., Tong, Y., Chen, L., Phang, I., Lim, P. & Liu, T. (2005). Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. *Polymer Degradation and Stability*, 90(1), 123-131.
- Wolfe, R.R. (2006). The underappreciated role of muscle in health and disease. *The American journal of clinical nutrition*, 84(3), 475-482.
- Wu, W., Liu, X., Zhou, Z., Miller, A.L. & Lu, L. (2018). Three-dimensional porous poly (propylene fumarate)-co-poly (lactic-co-glycolic acid) scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(9), 2507-2517.
- Xu, H.Q., Liu, J.C., Zhang, Z.Y. & Xu, C.X. (2022). A review on cell damage, viability, and functionality during 3D bioprinting. *Military Medical Research*, 9(1), 70.
- Xu, Y.J., Su, Y.Q., Luo, L.S., Li, X.Z., Liu, J.P., Guo, J.J., Chen, R.R. & Fu, H.Z. (2011). Effect of traveling magnetic field on gas porosity during solidification. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 21(9), 1981-1985.
- Yang, Y. and Liu, S. (2020). Laboratory study of cryogenic treatment induced pore-scale structural alterations of Illinois coal and their implications on gas sorption and diffusion behaviors. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 194, 107507.
- Yazdanpanah, Z., Johnston, J.D., Cooper, D.M. & Chen, X. (2022). 3D bioprinted scaffolds for bone tissue engineering: State-of-the-art and emerging technologies. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 824156.
- Yi, B., Shen, Y., Tang, H., Wang, X., Li, B. & Zhang, Y. (2019). Stiffness of aligned fibers regulates the phenotypic expression of vascular smooth muscle cells. *ACS applied materials & interfaces*, 11(7), 6867-6880.
- Yipeng, J., Yongde, X., Yuanyi, W., Jilei, S., Jiexiang, G., Jiangping, G. & Yong, Y. (2017). Microtissues enhance smooth muscle differentiation and cell viability of hADSCs for three dimensional bioprinting. *Frontiers in Physiology*, 8, 534.
- Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M. M., Tamayol, A., Annabi, N. & Khademhosseini, A. (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, 73, 254-271.
- Zakhem, E., Raghavan, S., Gilmont, R.R. & Bitar, K.N. (2012). Chitosan-based scaffolds for the support of smooth muscle constructs in intestinal tissue engineering. *Biomaterials*, 33(19), 4810-4817.
- Zhang, J., Wang, L., Zhu, M., Wang, L., Xiao, N. & Kong, D. (2014). Wet-spun poly (ϵ -caprolactone) microfiber scaffolds for oriented growth and infiltration of smooth muscle cells. *Materials Letters*, 132, 59-62.

- Zhang, Y., Zhang, C., Li, Y., Zhou, L., Dan, N., Min, J., Chen, Y. & Wang, Y. (2023). Evolution of biomimetic ECM scaffolds from decellularized tissue matrix for tissue engineering: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125672.
- Zhang, Y.S., Oklu, R., Dokmeci, M.R. & Khademhosseini, A. (2018). Three-dimensional bioprinting strategies for tissue engineering. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(2), a025718.
- Zhou, Q., Xie, J., Bao, M., Yuan, H., Ye, Z., Lou, X. & Zhang, Y. (2015). Engineering aligned electrospun PLLA microfibers with nano-porous surface nanotopography for modulating the responses of vascular smooth muscle cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(21), 4439-4450.
- Zhuang, P., An, J., Chua, C.K. & Tan, L.P. (2020). Bioprinting of 3D in vitro skeletal muscle models: A review. *Materials & Design*, 193, 108794.
- Zulkifli, M.Z.A., Nordin, D., Shaari, N. & Kamarudin, S.K. (2023). Overview of electrospinning for tissue engineering applications. *Polymers*, 15(11), 2418.



EKLER

Ek-1. C2C12 Alamar Blue Testi Kalibrasyon Eğrisi

