

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ
UYGULAMALARI İÇİN
BİYOFONKSİYONEL DOKU İSKELESİ
ÜRETİMİ

Hilal YILMAZ

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Şubat, 2025

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI
İÇİN BİYOFONKSİYONEL DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ**

Hilal YILMAZ tarafından hazırlanan tez çalışması 04.02.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Esmâ ÖZEROL, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Azime ERARSLAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ, Üye
Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Sümeyye CESUR, Üye
Marmara Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Kırıkdak Doku Mühendisliği Uygulamaları için Biyofonksiyonel Doku İskelesi Üretimi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hilal YILMAZ

İmza



Bu çalışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün TSA-2022-5244” numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Anneme
ve
canım evlatlarıma

TEŞEKKÜR

Tecrübeleri, bilgi birikimi, üstün anlayış ve hoşgörüsüyle akademik hayatıma en değerli katkıları sunan kıymetli danışmanım Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ'a gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması süresince, YÖK 100/2000 Doktora Programı bursu ve TÜBİTAK BİDEB 2211-A 2020/2 Programı bursu ile destekleyen YÖK'e ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince beraber çalıştığım ekip arkadaşım Sevda GÜRSOY'a, tecrübelerinden faydalandığım değerli arkadaşlarım Tuba BEDİR'e, Gülşah TORKAY'a, Büşra OKTAY'a, Ayşe Betül BİNGÖL'e, Rabia Betül SULUTAŞ'a, Yağmur KAZANCIOĞLU'na, Shhd SARAJ'a, Louna KARZOUN'a, Israa ABDULAZEZ'e ve Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi (NBUAM)'da bu çalışmanın tamamlanmasında bana yardımcı olan hocalarıma ve arkadaşlarıma tek tek teşekkür ederim.

Sonsuz anlayış, hoşgörü ve özverisiyle maddi manevi bir dağ gibi arkamda olan en zor zamanlarda yoluma ışık tutan, bu zorlu süreçte en büyük destekçim annem Zeliha TOPTAŞ'a, babam Mehmet Ali TOPTAŞ'a, eşim Şerif YILMAZ'a, bana ikinci aile olan annem Lütfüye YILMAZ'a ve ablam Emine YILMAZ'a, ufacık yüreklerinde kocaman anlayışları ile annelerine destek olan biricik evlatlarım Fatıma Erva'ma, Halime Esma'ma, Ömer Faruk'uma, Asım Hayri'me ve beni tüm samimiyetiyle destekleyen canım aile bireylerimin her birine tek tek en içten teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hilal YILMAZ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xv
TABLO LİSTESİ	xx
ÖZET	xxi
ABSTRACT	xxiii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	5
1.3 Hipotez	7
2 NAZAL KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ	9
2.1 Kıkırdak Doku Mühendisliği	9
2.2 Burun (Nazal).....	10
2.2.1 Burun Anatomisi ve Fizyolojisi.....	11
2.2.2 Burun Patolojileri	16
2.2.3 Burun Patolojilerinin Tedavisi (Rekonstrüksiyonu) için Mevcut Yaklaşımlar.....	17
2.3 Doku Mühendisliği	22
2.3.1 Cilt Doku Mühendisliği	25
2.3.2 Nazal Kıkırdak Doku Mühendisliği	26
2.4 Doku Mühendisliği Paradigması.....	28

2.4.1 Hücreler	28
2.4.2 Biyoaktif Bileşenler	29
2.4.3 Doku İskelesi	33
2.5 Biyopolimerik Nanopartiküller	58
2.5.1 Elektrosprey	59
2.6 Burun Kıkırdığı Doku Mühendisliğinde Güncel Uygulamalar	61
3 MATERYAL VE METOT	67
3.1 Kullanılan Materyaller ve Cihazlar	67
3.1.1 Kullanılan Materyaller	67
3.1.2 Kullanılan Cihazlar	68
3.2 GelMA Sentezi	69
3.2.1 GelMA'nın Metakrilatlanma Derecesinin Belirlenmesi	70
3.3 GelMA-CIP Çözeltisinin Hazırlanması	71
3.4 GelMA-CIP Hidrojelinin Tasarımı ve 3B DLP Basımı	71
3.5 PCL-COL Çözeltilerinin Hazırlanması ve Elektro-eğirme İşlemi	72
3.6 Elektrosprey Yöntemi ile Hidrojel ve Nanofiberlerin Nanopartikül Kaplamaı	73
3.7 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	74
3.8 Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	75
3.9 Doku İskelelerinin Morfolojik Özellikleri	75
3.10 Doku İskelelerinin Mekanik Özellikleri	75
3.11 Doku İskelelerinin Şişme Davranışı	76
3.12 Doku İskelelerinin Şişme Kinetiği	76
3.13 Doku İskelelerinin Bozunma Davranışı	77
3.14 <i>In vitro</i> CIP Salınım Çalışması	77
3.15 <i>In vitro</i> EGF ve TGFβ3 Salınım Çalışması	78

3.16 <i>In vitro</i> Salım Kinetikleri	78
3.17 Performans Ölçümleri	79
3.18 <i>In vitro</i> Antimikrobiyal Aktivite	79
3.19 Sitouyumluluk Çalışmaları	80
3.19.1 Hücre Canlılığı	80
3.19.2 3B Hücre Kültüründe Floresan Mikroskopu Analizleri.....	80
3.19.3 3B Hücre Kültüründe SEM Analizi	81
3.19.4 Histolojik Analiz	81
3.20 İstatiksel Analiz.....	82
4 BULGULAR VE TARTIŞMA	83
4.1 Kimyasal Özellikler	83
4.1.1 GelMA'nın Metakrilatlanma Derecesinin Belirlenmesi.....	83
4.1.2 FTIR Analizi.....	84
4.2 Termal Özellikler	86
4.3 Morfolojik Özellikler	89
4.4 Mekanik Özellikleri	92
4.5 Şişme Özellikleri.....	95
4.6 Şişme Kinetikleri.....	98
4.7 Bozunma Özellikleri	100
4.8 <i>In vitro</i> CIP ve Büyüme Faktörleri Salınım Çalışması	102
4.9 Salım Kinetikleri	107
4.10 <i>In vitro</i> Antibakteriyel Analiz	110
4.11 Sitouyumluluk.....	111
4.12 Histolojik Analiz	115
5 SONUÇ	116
KAYNAKÇA	119



SİMGE LİSTESİ

w/v	Ağırlık/hacim
W_0	Başlangıç ağırlık
W_e	Dengedeki doku iskelesinin ağırlığı
Se	Dengedeki şişme
Tm	Erime sıcaklığı
g	Gram
v/v	Hacim/hacim
RMSE	Hataların karesinin ortalamasının karekökü
$k'_s - k_s$	Hız sabitleri
W_w	Islak ağırlık
Q_0	İlk ilaç salınımı
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopaskal
kV	Kilovoltaj
W_d	Kuru ağırlık
Q	Kümülatif ilaç salınımı (%)
MHz	Megahertz
MPa	Megapaskal
DS	Metakrilatlanma Derecesi
μg	Mikrogram
$\mu g/mL$	Mikrogram/mililitre
μm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mL/sa	Mililitre/saat
mm	Milimetre
mW	Miliwatt
ng/mL	Nanogram/mililitre

nm	Nanometre
R	Regresyon katsayısı
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
S	Şişme oranı
V	Vol



KISALTMA LİSTESİ

0B	0 Boyutlu
¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
3B	3 Boyutlu
ABS	Akrilonitril Bütadien Stiren
ADMKH	Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücre
Alg-Sul	Aljinat Sülfat
ALK	Eşleştirilmiş Alt Lateral Kıkırdak veya Alar Kıkırdak
AM	Eklemeli Üretim
AMP	Antimikrobiyal Peptit
AP	Alkalın Fosfataz
ASTM	Amerikan Test ve Malzeme Topluluğu
BC	Bakteriyel Selüloz
BG	Biyocam
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
CAD	Bilgisayar Destekli Tasarım
CChons	Sıçan Kondrositleri
CD-RAP	Kıkırdaktan Türetilen Retinoik Asit Duyarlı Protein
CIP	Siprofloksasin
CLIP	Sürekli Sıvı Arayüz Üretimi
COL	Kolajen
COMP	Kıkırdak Oligomerik Protein
dECM	Hücreleştirilmiş Ekstraselüler Matriks
DLP	Dijital Işık İşleme
DM	Doku Mühendisliği
DMD	Dijital Mikro Ayna Aygıtı
DNSK	Domuz Nazal Septum Kıkırdağı
dNSK	Hücreleştirilmiş Nazal Septum Kıkırdağı
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri

EBM	Elektron Işını Üretimi
ECM	Ekstraselüler Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktör
EGH	Elastin-Jelatin-Hiyaluronik Asit
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FDM	Eriyik Biriktirme Modellemesi
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GDF	Büyüme Farklılaşma Faktör
GelMA	Jelatin Metakriloil
GM-CSF	Epidermal Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HA	Hyaluronik Asit
HAMA	Hyaluronik Asit Metakrilat
HAP	Hidroksiapatit
HB-EGF	Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktör
HEC	Hidroksietil Selüloz
hNK	İnsan Burun Septum Kondrosit
IGF	İnsülin Büyüme Faktör
IHKG	Işınlanmış Homolog Kaburga Greftleri
IHKK	Işınlanmış Homolog Kostal Kıkırdak
KİMKH	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
KPH	Kondroprogenitör Hücre
LAP	Lityum fenil-2,4,6-trimetil-benzoil fosfinat
LOM	Lamine Nesne Üretimi
MMP	Matris Metalloproteaz
MPH	Mezodermal Progenitör Hücre
MSC	Tıbbi Sinyal Hücre
NGF	Sinir Büyüme Faktör
NHAC	Normal İnsan Diz Eklem Kondrosit
NIH	Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü
OST	Osteogenon
PAM	Poliakrilamid
PBT	Poli bütilen tereftalat
PCL	Polikaprolakton
PDFG-BB	Trombosit Türevi Büyüme Faktörü-BB

PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktör
PECMA	Pektin Metakrilat
PEG	Polietilen Glikol
PEGT	Poli Etilen Glikol-Tereftalat
PEO	Polietilen Oksit
PGA	Poliglikolik Asit
PHA	Polihidroksialkanoat
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli Laktik asit-ko-Glikolik Asit
PRP	Trombositten Zengin Plazma
PVA	Polivinil Alkol
PVC	Polivinil Kaprolaktam
RGD	Arginin-Glisin-Aspartik Asit
SD	Sprague-Dawley
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
sGAG	Sülfatlanmış Glikozaminoglikan
SilMA	İpek Fibroin Metakrilat
SLA	Stereolitografi
SLS	Seçici Lazer Sinterleme
TCP	Tri-kalsiyum Fosfat
TGFβ	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzen-Sülfonik Asit
ULK	Eşleştirilmiş Üst Lateral Kıkırdak
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 çift katmanlı doku iskelesinin üretiminin şematik gösterimi	6
Şekil 2.1	İnsan burnunun anatomik yapısı: (A) burun kısımları yandan görünümü, (B) burun kısımları önden görünümü	11
Şekil 2.2	Eklem ve burun kırıkdağı: (A) eklem kırıkdağının subkondral kemiği üzerindeki dört katmanlı yapısı, (B) burun kırıkdağının üç katmanlı yapısı	14
Şekil 2.3	Burun anatomisini oluşturan farklı dokular: (A) burun önden görünüm, (B) açılı önden görünüm	16
Şekil 2.4	L-strut tekniği kullanılarak NSK'nın rekonstrüksiyonu: (A) NSK değiştirmek için L-strut konumlandırması (yeşil), (B) L-strut'u oluşturan kırıkdağ parçaları, (C) birleştirilmiş L-strut'un lateral görünümü, (D) birleştirilmiş L-strut'un üst görünümü	19
Şekil 2.5	Doku yeniden yapılanmasına yönelik geleneksel yukarıdan aşağıya doku mühendisliği (sol) ve aşağıdan yukarıya gelişimsel mühendislik (sağ) yaklaşımlarının karşılaştırılması	24
Şekil 2.6	Cilt doku mühendisliği paradigması	26
Şekil 2.7	Nazal kırıkdağ doku mühendisliği paradigması.....	27
Şekil 2.8	MKH'ların keratinositlere farklılaşmasının temsili şeması	32
Şekil 2.9	MKH'leri kondrositlere dönüştürmede yer alan farklı aşamaların özeti, Kısaltmalar: alkalın fosfataz (AP), kırıkdağdan türetilen retinoik asit duyarlı protein (CD-RAP), COL, kırıkdağ oligomerik protein (COMP), matris metalloproteaz (MMP), VEGF	33
Şekil 2.10	Doku iskelelerinin üretiminde dikkat edilmesi gereken özellikleri ...	35
Şekil 2.11	Doku iskelelerin hazırlanma aşamasında kullanılan biyomalzemelerin kaynaklarına ve biyolojik olarak parçalanabilirliklerine göre sınıflandırılması	37
Şekil 2.12	GelMA'nın kimyasal yapısı	42
Şekil 2.13	PCL'in kimyasal yapısı.....	44
Şekil 2.14	PVA'nın kimyasal yapısı	44
Şekil 2.15	DLP sisteminin şematik gösterimi	52
Şekil 2.16	Hidrojel morfolojisi	52
Şekil 2.17	CIP'in kimyasal yapısı	55

Şekil 2.18	Elektro-eğirme mekanizması: (A) tipik elektrospinning kurulumunun şematik gösterimi, (B) üç ardışık elektriksel bükülme kararsızlığı içeren bir elektrospinning jetinin yolunun prototipik anlık konumunun gösterimi	56
Şekil 2.19	Yüzey kaplamada kullanılan elektrosprey sisteminin şeması.....	60
Şekil 3.1	GelMA Sentez Aşamaları: (A) jelatin çözeltisinin hazırlanması, (B) çözeltinin MAA eklenmesi sonucunda pH'sının ayarlanması, (C) diyaliz aşaması, (D) liyofilize GelMA	70
Şekil 3.2	GelMA-CIP hidrojel DLP 3B yazıcı ile üretiminin şematik gösterimi.....	72
Şekil 3.3	PCL-COL nanofiberin elektro-eğirme ile üretiminin şematik gösterimi.....	73
Şekil 3.4	Katmanların üretimi ile ilgili görseller: (A) Chitubox görsel, (B) DLP 3B basımı, (C) elektro-eğirme ile nanofiber üretimi, (D) elektrosprey ile nanopartikül kaplama işlemi	74
Şekil 4.1	Jelatin ve GelMA örneklerinin ¹ H-NMR spektrumları. 5,7 ppm, 5,4 ppm ve 1,9 ppm'de gözlenen pikler proteinde metakrilasyonun varlığını gösterirken GelMA'daki 3,0 ppm'deki pikin jelatine göre yok olması lizin gruplarının yok olmasına işaret etmektedir	84
Şekil 4.2	FTIR spektrumları: (A) hidrojel katman, (B) nanofiber katman	86
Şekil 4.3	DSC Eğrileri: (A) hidrojeller/nanofiberler çift katmanlı iskelenin DSC eğrileri. (B) hidrojel katmanların nem kayıp sıcaklıkları, (C) çift katmanlı doku iskelelerinin T _m 'leri. Bildirilen veriler üç tekrarın ortalamalarıdır. Veriler, Tukey'nin çoklu karşılaştırma testi ve tek yönlü ANOVA ile <i>GraphPad Prism 9</i> yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel fark, * = $p \leq 0,05$ ile gösterilir.....	88
Şekil 4.4	Hidrojel, nanofiber ve çift katmanlı doku iskelesinin genel görünümü: (A) hidrojel katmanın boyutu ve kalınlığı, (B) nanofiber katmanın boyutu ve kalınlığı, (C) çift katmanlı doku iskelesinin boyutu ve kalınlığı	89
Şekil 4.5	Hidrojel, nanofiber ve çift katmanlı doku iskelesinin SEM görüntüleri: (A) GelMA hidrojel, (B) GelMA-CIP hidrojel, (C) PCL nanofiberler, (D) PCL-COL nanofiberler, (E) GelMA/PCL ve (F) GelMA-CIP/PCL-COL	91
Şekil 4.6	3B yazdırılmış hidrojel ve nanofiber yamadan oluşan çift katmanlı iskelelerin SEM görüntüleri: (A) GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA- TGFβ3 çift katmanlı doku iskelesi görünümü, (B) GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katman üzerinde nanopartiküllerin görünümü ve histogramı, (C) PVA- TGFβ3 nanofiber katman üzerinde nanopartiküllerin genel görünümü ve fiber çapının histogramı.....	92

- Şekil 4.7** GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojenlerinin basınç özellikleri: (A) hidrojenlere ait Stress -Strain grafiği (a,b,c,d) GelMA@PVA-EGF'ye ait pikler, (e,f,g,h) GelMA-CIP@PVA-EGF'ye ait pikler, (B) basınç dayanımı, (C) gerinim (%). Veriler Eşleştirilmemiş t testi ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 4).....93
- Şekil 4.8** Nanofiberlerin çekme özellikleri: (A) nanofiberlere ait Stress -Strain grafiği (a,b,c) PCL-COL@PVA-TGF β 3'e ait pikler, (d,e,f) PCL@PVA-TGF β 3'e ait pikler, (B) çekme dayanımı (MPa), (C) gerinim (%). Veriler Eşleştirilmemiş t testi ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, ** = $p \leq 0,01$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3).....94
- Şekil 4.9** Çift katlı doku iskelesinin çekme özellikleri: (A) çift katlı doku iskelesine ait Stress -Strain grafiği (a,b,c) GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGF β 3 ait pikler, (e,d) GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 ait pikler, (B) çekme dayanımı (MPa) ve (C) gerinim (%). Veriler Eşleştirilmemiş t testi ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3).....94
- Şekil 4.10** GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katmanların farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki şişme davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi çift yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3).....96
- Şekil 4.11** PCL@PVA-TGF β 3 ve PCL-COL@PVA-TGF β 3 nanofiber katmanların farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki şişme davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi çift yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3).....97
- Şekil 4.12** GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGF β 3 ve GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 çift katmanlı doku iskelesinin farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki şişme davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi çift yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3) 97
- Şekil 4.13** Şişme dengesine ulaştığında tüm doku iskelelerinin karşılaştırılması. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi tek yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (**** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3).....98
- Şekil 4.14** Deneysel veriler ile modellerin karşılaştırmalı şişme kinetikleri: (A-B) hidrojel grupların modeller ile oluşturulan farklı zaman aralıklarındaki şişme yetenekleri, (C-D) çift katmanlı doku iskele gruplarının modeller ile oluşturulan farklı zaman aralıklarındaki şişme yetenekleri 99

- Şekil 4.15** GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katmanların farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki bozunma davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi iki yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3) **101**
- Şekil 4.16** PCL@PVA-TGF- β 3 ve PCL-COL@PVA-TGF- β 3 nanofiber katmanların farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki bozunma davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi iki yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3) **102**
- Şekil 4.17** GelMA-CIP hidrojellerinin *in vitro* ilaç salım profili: (A) farklı konsantrasyonlarda CIP'nin emilim spektrumları, (B) CIP'nin kalibrasyon eğrisi, (C) GelMA-CIP hidrojellerinden CIP salım davranışı **103**
- Şekil 4.18** GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojellerinde *in vitro* büyüme faktörlerinin salım profilleri: (A) EGF'in doğrusal kalibrasyon eğrisi, (B) GelMA@PVA-EGF hidrojellerinden kümülatif salım grafiği, (C) GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojellerinden kümülatif salım grafiği **105**
- Şekil 4.19** PCL@PVA-TGF β 3 ve PCL-COL@PVA-TGF β 3 nanofiberlerinde *in vitro* büyüme faktörlerinin salım profilleri: (A) TGF β 3'ün doğrusal kalibrasyon eğrisi, (B) PCL@PVA-TGF β 3 nanofiberlerinde kümülatif salım grafiği, (C) PCL-COL@PVA-TGF β 3 nanofiberlerinde kümülatif salım grafiği **106**
- Şekil 4.20** Deneysel veriler ile modellerin karşılaştırmalı salım kinetikleri: (A) GelMA-CIP için salım kinetiği (B-C) GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF için salınım kinetiği eğrileri, (D-E) PCL@PVA-TGF β 3 ve PCL-COL@PVA-TGF β 3 için salınım kinetiği eğrileri . **108**
- Şekil 4.21** GelMA ve GelMA-CIP'in (30, 100, 250 ve 500 μ l) *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi **111**
- Şekil 4.22** 1., 4. ve 7. günlerde MTT sonuçları. Veriler Tukey'nin çoklu karşılaştırma testi çift yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3) **112**
- Şekil 4.23** Hidrojeller ve nanofiberlerin KİMKH ile *in vitro* kültürün 7. gününde morfolojilerin SEM görüntüleri **113**
- Şekil 4.24** Floresan mikroskopi görüntüleri: (A) hidrojeller üzerindeki KİMKH hücre çekirdeğinin 7. günde DAPI boyama görüntüleri, (B) nanofiberler üzerindeki KİMKH hücre çekirdeğinin 7. günde DAPI boyama görüntüleri **114**

Şekil 4.25 KİMKH ile kültürlenmiş hidrojel ve nanofiberlerin farklılaşma yetenekleri: (A) KİMKH ile kültürlenmiş hidrojellerin 14. günde H&E boyama görüntüsü, (B) KİMKH ile kültürlenmiş nanofiberlerin 1., 14., ve 28. günde Alcian mavi boyama görüntüsü.....**115**



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan büyüme faktörleri .	30
Tablo 2.2	Doku iskelesi imalatında kullanılan biyomalzeme çeşitleri.....	39
Tablo 2.3	Doku mühendisliği uygulamaları için farklı doku iskelesi üretim tekniklerinin avantajları ve dezavantajları	46
Tablo 2.4	3B baskı teknolojileri ve kullanılan malzemeler.....	49
Tablo 2.5	NKDM de güncel çalışmalar	65
Tablo 3.1	Antibakteriyel deneylerde kullanılan bakteriler ve kodları.....	68
Tablo 4.1	Hidrojellerin, nanofiberlerin ve çift katmanlı doku iskelelerin mekanik özellikleri	95
Tablo 4.2	Şişme kinetiklerinin model parametreleri ve performans metrikleri .	99
Tablo 4.3	GelMA-CIP doku iskelelerinden antibiyotiğin, GelMA@PVA-EGF, GelMA-CIP@PVA-EGF, PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 doku iskelelerinden büyüme faktörlerinin salınımının matematiksel model sonuçları.....	109
Tablo 4.4	GelMA ve GelMA-CIP'in (30, 100, 250 ve 500 µl) <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> ve <i>E. coli</i> 'ye karşı inhibisyon zon çapları (mm).....	111

Kıkırdak Doku Mühendisliği Uygulamaları için Biyofonksiyonel Doku İskelesi Üretimi

Hilal YILMAZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Kemik ve kıkırdaktan oluşan çerçevenin dışını cilt, içini ise mukozal dokunun kapladığı kompozit bir organ olan burun da çeşitli nedenlerle meydana gelen birçok patolojik durum tanımlanmıştır. Burun rekonstrüktif cerrahisi hangi patolojik neden ile yapılmış olursa olsun ülkemizde birinci sıradadır. Burun rekonstrüksiyonu genellikle, iki katmanlı bir rekonstrüktif yaklaşım gerektirebilir bu yaklaşım doğal ya da sentetik greft desteği ve cilt fleplerinin kullanımını gerektirir. Hem greft hem de felp kullanımlarının birçok dezavantajları vardır ve bunların üstesinden gelebilen doku mühendisliği (DM) ürününe ihtiyaç çok açıktır. Burun rekonstrüksiyonunda DM kıkırdak greft ile DM cilt yaması burun patolojilerinin tedavisi için ideal olabilir.

Bu tez çalışmasında; DLP yöntemi kullanılarak 3B basılmış antimikrobiyal özelliklere sahip jelatin metakrioil-siprofloksasin (GelMA-CIP) hidrojel ve elektro-eğirilmiş polikaprolakton-kolajen (PCL-COL) nanofiberler ile hidrojel/nanofiber kompozitlerden oluşan biyomimetik çift katmanlı doku iskelesi üretilmiştir. Bu çift katmanlı doku iskelesinin elektrosprey yöntemi kullanarak, hidrojel katmanına

epidermal büyüme faktörü (EGF) yüklü polivinil alkol (PVA) nanopartikülleriyle, nanofiber katmanına ise dönüştürücü büyüme faktörü (TGF β 3) yüklü PVA nanopartikülleriyle biyofonksiyonellik kazandırılmıştır. GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 çift katmanlı doku iskelesinin kimyasal karakterizasyonları, mekanik ve fiziksel analizleri, *in vitro* ilaç ve polimerik partikül yüklü büyüme faktörlerinin salım çalışması, 3B basılan GelMA-CIP hidrojel katmanının antibakteriyel analizi, kemik iliği mezenkimal kök hücreler (KİMKH) ile inkübasyonundan sonra *in vitro* hücre canlılık analizleri, büyüme faktörlerinin etkisi ile 3B hücre kültüründe farklılaşmasının histolojik takibi araştırılmıştır.

Sonuçlara göre de çift katmanlı doku iskelesinin, KİMKH farklılaşması için yeterli sürede salınım yapan hidrojel ve nanofiber katmanlara sahip, antibakteriyel özellikte, sitotoksik etkisi olmayan, KİMKH büyümesi ve çoğalması için uygun gözenek çapına sahip olduğu görülmüştür. Son olarak hidrojel ve nanofiber katmanların üzerindeki KİMKH'in farklılaştığı histolojik boyamalarla öngörülmektedir. Ayrıca üretilen doku iskelesinin mekanik özelliklerinin cilt ve kıkırdak ikamesi olarak kullanıma uygunluğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak geliştirilen GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 çift katmanlı doku iskelesi ile nazal DM alanında kullanım potansiyeli olduğu öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nazal doku mühendisliği, jelatin metakriol, DLP 3D baskı, elektro-eğirme, TGF β 3

Production of Biofunctional Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering Applications

Hilal YILMAZ

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Many pathological conditions have been described in the nose, which is a composite organ in which the skin covers the outside of the bone and cartilage framework and the mucous membrane covers the inside. Nasal reconstructive surgery is the most common procedure in our country, regardless of the pathological reason. Nasal reconstruction usually requires a two-stage reconstructive approach involving the use of natural or synthetic grafts and skin flaps. The use of both grafts and flaps has many disadvantages and the need for a tissue engineered (TE) product that can overcome them is clear. In nasal reconstruction, TE cartilage grafts and TE skin flaps may be ideal for the treatment of nasal pathologies.

In this work, a biomimetic bilayer tissue scaffold consisting of hydrogel/nanofibre composites with 3D-printed gelatin methacryl-ciprofloxacin (GelMA-CIP) hydrogel with antimicrobial properties and electrospun polycaprolactone-collagen (PCL-COL) nanofibers was fabricated using the DLP method. the hydrogel layer of this bilayer tissue scaffold was biofunctionalized with epidermal growth factor (EGF)-loaded polyvinyl alcohol (PVA) nanoparticles and the nanofibre layer was biofunctionalized with transforming growth factor (TGF β 3)-loaded PVA nanoparticles using the electrospray method. Chemical characterization,

mechanical and physical analyses of the GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 bilayer tissue scaffold, *in vitro* drug and polymer particle-loaded growth factor release study, antibacterial analysis of the 3D printed GelMA-CIP hydrogel layer, *in vitro* cell viability analyses after incubation with bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs), histological follow-up of differentiation in 3D cell culture with the effect of growth factors were investigated.

According to the results, it was observed that the double-layered tissue scaffold has hydrogel and nanofiber layers that are released in sufficient time for BMMSC differentiation, has antibacterial properties, has no cytotoxic effect and has a pore diameter suitable for BMMSC growth and proliferation. Finally, histological staining predicts that BMMSCs differentiate on hydrogel and nanofiber layers. In addition, the mechanical properties of the fabricated scaffolds were determined to be suitable for use as skin and cartilage substitutes.

As a result, the developed GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 bilayer scaffold is expected to give dynamic direction to very complex nasal reconstruction treatment methods in the field of nasal TE.

Keywords: Nasal tissue engineering, gelatin methacryl, DLP 3D printing, electro-spinning, TGF β 3

1.1 Literatür Özeti

Kıkırdak doku mühendisliği (DM), ortopedi ve baş-boyun cerrahisi olmak üzere iki farklı alanda çalışılmaktadır [1]. Genellikle çalışmalarda ortopedik cerrahi için kıkırdak DM çalışmalarına yoğunlaşmış ve nazal kıkırdak DM çalışmaları oldukça sınırlı kalmıştır [2]. Nazal kıkırdak yeni bir araştırma alanı olsa da eklem kıkırdağına yönelik çalışmalar ışığında ilerleyebilir böylece daha hızlı yol alabilir [3]. Bu tez çalışmasında özellikle burun ile ilgili nazal kıkırdağa yoğunlaşmıştır.

Burun; solunum, koku alma ve savunmadan oluşan üç temel işlevi olan [4], kıkırdak ve kemikten bir çerçevenin dış tabakasının deri, iç astarını ise mukozanın kaplamış olduğu kompozit bir organdır [5]. Burnun yapısal bütünlüğü düzgün solunum fonksiyonu için çok önemlidir.

Temelde burun patolojilerine; kalıtsal faktörler, hamilelikte ya da doğum sırasında meydana gelen konjenital NSK deviasyonları veya edinilmiş NSK deviasyonları (%0,93 - %76,2), kanser (~%36), çeşitli travmalar sebep olabilir [6], [7], [8], [9], [10]. Yüzün en belirgin ve göze çarpan bölgesi olan burunda meydana gelen deformitelerin hem gizlenmesi zordur hem de bireyde solunum fonksiyonu kaybıyla birlikte psikolojik problemlere sebep olabilir [8]. Günümüzde burunda çeşitli nedenlerle meydana gelen patolojileri düzeltmek için rinoplasti ve septoplasti kullanılmaktadır [11]. Burada temel amaç hem fizyolojik hem de estetik restorasyon ile kaliteli hava yolu ve yara iyileşmesini sağlamak, güzel bir burunla özgüveni ve yaşam kalitesi artırmış bireyleri topluma kazandırmaktır [12]. ABD’de en sık yapılan estetik cerrahi işlemleri arasında hangi patolojik neden ile yapılmış olursa olsun yıllardır ilk 5 sıra içinde rinoplasti bulunmaktadır [13], [14]. Ülkemiz için yapılan güvenilir bir istatistik çalışması bulunmamakla beraber rinoplasti

işleminin estetik cerrahi işlemleri arasında birinci sırada olduğu bilinmektedir [13]. Doğal kıkırdak dokusu zayıf rejeneratif kapasiteye sahip olduğundan, rekonstrüktif burun cerrahisi genellikle orijinal doku yerine kıkırdak greftlerinin naklini gerektirir [15]. Nazal kıkırdağa yapısal destek olarak otogreftler, allogreftler ve sentetik greftler kullanılır [16]. Otolog greftler; burun, kulak veya kaburga kıkırdağından elde edilmektedir. Burun kıkırdakları arasında nazal septum kıkırdak (NSK), diğer bölgelerden daha fazla kolajen II içermesi [11] sebebiyle otolog greftlerde en sık kullanılan bölgelerinden biridir. Otolog greftleme yaklaşımları, immünojenik olmadıkları için tedavide altın standart olarak kabul edilirler, ancak kullanımları donör bölgesi morbiditesine neden olur, enfeksiyon riskleri taşır, doku miktarı ve kalitesiyle ilgili sınırlamalar vardır [17], [18]. Yeterli miktarda otolog greft dokusu bulunmadığında, canlı veya kadavra donörlerden elde edilen allogreftler kullanılabilir. Ama bu greftler teorik olarak immünojeniktir. Fakat hasta bireyde ikinci bir cerrahi operasyona sebep olmadığından otolog greftlere göre avantajlı kabul edilirler [18]. Toplanan greftlerin donör bölgesi morbiditesine ek olarak, yerleştirmeden önce kıkırdağın şekillendirilmesi karmaşık, oldukça beceriye bağlı ve zaman alıcıdır [19]. Doğal doku greftlerinin muadili olarak üretilmiş sentetik greftler ise düşük immünogeniteleri ve donör bölgesi morbiditesinin olmaması nedeniyle tercih edilebilir. Ayrıca istenilen forma kolayca getirilebilir, kolaylıkla temin edilebilir, maliyeti azdır ve birden fazla cerrahi operasyon gerektirmediği için cerrahi süreyi kısaltır [18], [20]. Bununla birlikte, sentetik greftlerin konak doku ile entegrasyon ve ekstrüzyon gibi sınırlamaları vardır [21].

Tedavide ne çeşit greft kullanırsa kullanılsın kıkırdak greftinin üstü bir cilt flepi ile kaplanır [22]. Günümüzde alından alınan yumuşak doku parçası, renk uyumu ve deri altı kalınlığı nedeniyle altın standarttır. Ama cilt fleplerinde de hastanın birden fazla cerrahi operasyon geçirmesi, enfeksiyon, implant ekstrüzyonu ve öngörülemeyen komplikasyonlar gibi dezavantajları mevcuttur [23].

Sonuçta, burun rekonstrüksiyonu, iki katmanlı bir rekonstrüktif yaklaşım gerektirir, bu yaklaşım genellikle yapısal bir desteği (greftler) ve o desteği kaplayan bir cilt flepinin kullanımına dayanır. Hem greft kullanımlarının hem de felp kullanımlarının dezavantajlarının üstesinden gelebilen DM ürününe ihtiyaç çok açıktır. Burun rekonstrüksiyonunda doğal kıkırdak greftlere muadil bir nazal

kıkırdak doku mühendisliği (NKDM) ürünü doku iskelesi ve cilt fleplerine muadil Cilt DM ürünü yama/doku iskelesi üretmek ideal bir yaklaşım olabilir.

Bu nedenle nazal DM perspektifi ile nazal kıkırdak doku iskelesi geliştiren araştırmacıların greftleri örtmek için kullanılacak cilt örtüsüne muadil ürünleri de dikkate alarak çift katmanlı doku iskelesi üretmeleri önemli olacaktır. Bu çift katmanlı doku iskelesinde aynı anda kıkırdak bölge hedeflenirken kıkırdak bölgenin üstündeki epitel bölgenin iyileşmesine yardımcı olabilecek bir yama/doku iskelesi üretimine yönelik çalışmalar yok denecek kadar azdır [18], [24], [25]. Ayrıca üretilecek nazal DM greftlerinin, çevresindeki dokularla benzer mekanik özelliklere sahip olmalı, kayma gerilimini, mikro hareketi, enfeksiyon riskini önleyerek uygun boyutlarda geliştirmelidir. Nazal DM greftleri hem statik kuvvetlere hem de dinamik kuvvetlere direnmek için mekanik olarak sağlam olmalıdır.

Nazal DM’de tıpkı DM’nin diğer alanları gibi hücresel uygulamalar, doğal veya sentetik biyomalzemelerle hazırlanan doku iskeleleri ve uygun biyoaktif bileşenlerin kombinasyonunu kullanan çalışmaları içerir [25]. Burun için geliştirilecek greft için osteokondral dokuda olduğu gibi arayüz geçişlerine ihtiyaç yoktur [18], [26]. Biyomimetik ve mekanik olarak nazal kıkırdağa yakın ikameler ve üzerine cilt rejenerasyonunu destekleyici yamalar üretmek yeterli olabilir. Doğru biyomalzeme, biyokimyasal faktörler ve mekanik uyarılarla, bağışıklık tepkisi olmadan implante edilebilir bir nazal DM greftini elde etmek mümkündür.

Yapılan araştırmalar, malzeme ve üretim yöntemlerinin birleşimi ile biyomalzemelerin performansını iyileştirmenin etkili bir yolu olabileceğini ortaya koymuştur. Bunun en iyi örnekleri, ekstraselüler matrisi (ECM) simüle eden hidrojel/nanofiber kompozit doku iskeleleridir [27], [28]. Böylece biyomimetik tasarıma ulaşmak daha kolay olabilir ve hücre-malzeme etkileşimi hedeflenirken en uygun biyomalzeme seçimi de gerçekleşebilir. 3 boyutlu (3B) baskı ve elektro-eğirme tekniklerini birleştirerek hidrojel/nanofiber kompozitleri üretilir [28]. Bu kompozit yapıdaki hidrojel katman, istenilen şekilde ve sertlikte 3B basılabilir, genişleme özelliklerini koruyarak güçlü su emme özelliği sağlayabilir. Ayrıca; elektro-eğirme ile yüksek yüzey-hacim oranına sahip nanofiberler besin alışverişini sağlayabilir, mekanik özellikleri iyileştirebilir ve hücre penetrasyonunu destekleyebilir [29], [30]. 3B baskı ile karmaşık şekilli, bireye özgü modelleme,

biyoaktif bileşenlerle, ilaçlarla ya da hücrelerle hazırlanan biyomürekkep ile basım avantajı sağlanabilir. DLP (Dijital ışık işleme) temelli 3B baskı ile üretimde biyomimetik doku iskelesi tasarlama imkânı elde edilebilir. Böylece DLP yöntemi ile kısa sürede yüksek çözünürlükte fabrikasyona ile doğal dokuları taklit eden mükemmel geometrilerde yapılar üretilebilir [31], [32], [33]. DLP basımında bir çok fotopolimer farklı kombinasyonlar ile kullanılmıştır [33]. Fakat bunlardan en yaygın kullanılanı GelMA'dır. GelMA hidrojel, kolay sentezi, foto çapraz bağlanabilirliği, düşük maliyetli olması, çok yüksek biyoyumluluğu ve hücre izleme de kolaylık sağlayan şeffaf yapısıyla yüksek potansiyelli hidrojellerden biridir [33], [34]. DLP yöntemi ile antibakteriyel özelliklere sahip siprofloksasin (CIP) içeren GelMA hidrojelleri geliştirilebilir. Gram negatif ve bazı gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu bilinen, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı geniş spektrumlu bir antibiyotik olan CIP, hidrojel [35] ve fiber [36] doku iskelelerinde kullanılan bir antibiyotiktir. Fakat 3B baskılanan GelMA hidrojeller tek başına ECM karmaşıklığını tam olarak yansıtamaz [37] bu yüzden nazal kıkırdak ECM'sini taklit edebilen nanofiber üretimi için elektro-eğirme metodu ile ayarlanabilir morfolojiye sahip, üç boyutlu, gözenekli ve nano ölçekli fiber bazlı matrislerin üretimi başarılı bir şekilde sağlanabilir [38]. Yapılan bir çok çalışma PCL ile elde edilen nanofiberlerin NKDM'de kullanımının uygun olduğunu rapor etmiştir [39], [40]. PCL, hidrofobiktir buda hücre afinitesi ve yapay doku oluşumu için bu biyomalzemeyi tek başına elverişsiz kılar. Ama ECM'in ana bileşenlerinden biri olan kolajen (COL), oldukça hidrofilitiktir ve bu nedenle PCL ile oluşturulacak biyokompozit malzeme ile PCL'nin sınırlamalarının üstesinden gelinebilir [41]. Böylelikle burundaki kıkırdak bölge doğal mekanik yapısı taklit edilerek biyomimetik doku iskelesi tasarlanabilir.

Kaburga, septum, kulak gibi anatomik bölgelerden kıkırdak alma girişimini bertaraf etmek için farklı hücre kaynaklarının (mezenkimal kök hücreler (MKH) gibi) kullanımı ile bireyde ikincil donör morbiditesi ortadan kaldırılabilir. Bu hücre kaynaklarından kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (KİMKH) yaygın kullanım alanı bulmuştur [41]. MKH farklılaşmasını arttırmak için büyüme faktörlerinin doku iskelelerine polimerik mikro/nano partiküller ile dahil edilebilir. Böylece doku iskelelerine immobilize olmuş moleküller tarafından sinyal iletiminin

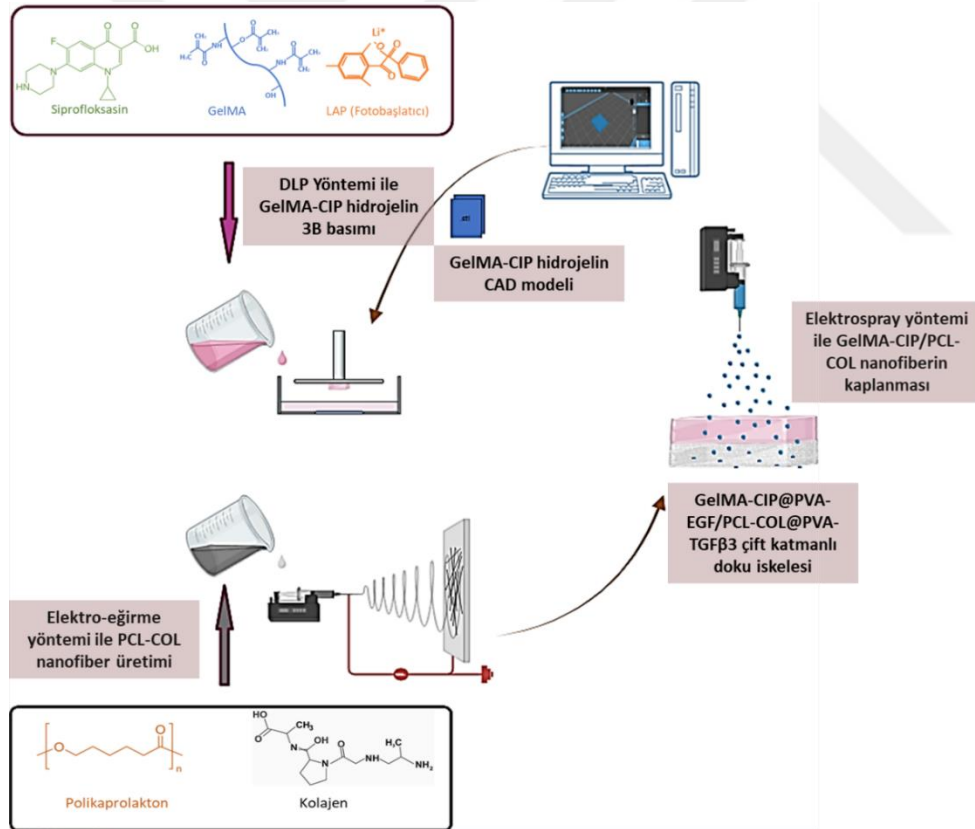
çözünür moleküllere göre daha uzun süre devam etmesi beklenmektedir [42]. Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF β 3) kullanımı ile kondrojenik farklılaşmanın indüklenmesi ve sürdürülmesi sağlanabilir [43], [44]. Ayrıca istenilen matris bileşenlerini ve mekanik özellikleri artırabilir [45]. Aynı şekilde epidermal büyüme faktörü (EGF), salınımı da kıkırdak katman üzerine epitel benzeri yapıların geliştirilmesi hem de yara iyileşmesinin hızlanması için hidrojellere immobilize etmede önemli olacaktır. Çünkü EGF MKH'in epitelizasyonunda ve yara iyileşmesinde destek olabilir [46]. Büyüme faktörlerinin yan etkilerini azaltmak ve istenen terapötik faydaları elde etmek için doku iskelelerine uygulaması üzerinde hassas kontrol gereklidir [47]. Ayrıca doku iskelesi üzerine implante edilen KİMKH farklılaşmasını yönlendirmek için büyüme faktörlerinin kontrollü salınım sistemi ile ortama verilmesi çok önemlidir [48], [49]. Bu yüzden polimerik mikro/nanopartiküller ile büyüme faktörlerinin ihtiyacı olan özel taşıyım ve paketleme hedefine ulaşılabilir. Bunun için ilaç taşıma sistemlerinde daha küçük parçacıklar üretmede kullanılan metotlar arasında olan elektrosprey yöntemi istenilen boyutta partikül üretmenin basit bir yoludur [50], [51]. Son yirmi yılda, polimerik malzemeler kullanılarak elektrosprey ile üretilen polimerik mikro/nanopartiküller biyomedikal uygulamalar için ilgi odağı haline gelmiştir [52]. Polimer tabanlı partikül olarak polivinil alkol (PVA), biyouyumluluğu, hidrofilikliği, bozunabilirliği ve toksik olmaması nedeniyle kullanılır [53]. Böylece ilaçlar, proteinler, hücreler, DNA ve büyüme faktörleri gibi biyoaktif bileşenleri elektrosprey tekniği ile doku iskelesine entegre etmek mümkündür [54]. Biyobozunur polimerden yapılmış polimerik partiküller, geleneksel ilaç taşıma araçlarına kıyasla sürekli ve kontrollü salım sağlayabilir, ilaçları kimyasal ve enzimatik bozunmadan koruyabilir, *in vivo* yarı ömürlerini uzatabilir, hücre zarı ve kan-beyin bariyeri penetrasyonunu iyileştirebilir. Fizyolojik bariyerleri aşabilirler ve ayrıca daha etkili taşıma veya azaltılmış yan etkilerle hücrelere, dokulara veya organlara hedefleyebilir [55].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmanın amacı, nazal doku mühendisliğinde kullanılmak üzere DLP yöntemi kullanılarak 3B basılmış antimikrobiyal özelliklere sahip GelMA-CIP ve elektro-eğrilmiş PCL-COL nanofiberler ile hidrojel/nanofiber kompozitlerden

oluşan biyomimetik çift katmanlı doku iskelesi üretmektir. Daha sonra üretilen çift katmanlı doku iskelesine elektrosprey yöntemi kullanarak hidrojel katmanına EGF yüklü PVA nanopartikülleriyle, nanofiber katmanına ise TGFβ3 yüklü PVA nanopartikülleriyle biyofonksiyonellik kazandırmaktır.

Tasarlanıp üretilen biyomimetik-biyofonksiyonel GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 çift katmanlı doku iskelesinin karakterizasyonları, mekanik analizleri, fiziksel analizleri, *in vitro* ilaç ve polimerik partikül yüklü büyüme faktörlerinin salım çalışmaları, *in vitro* 3B baskılanan hidrojel katmanının antibakteriyel analizi, *in vitro* hücre canlılık analizleri, büyüme faktörlerinin etkisi ile 3B hücre kültüründe farklılaşmasının histolojik takibi yapılmıştır. Böylece; burun rekonstrüktif-estetik cerrahisi ve yüz plastik cerrahisinde zorlu bir problem olan nazal patolojileri gerçeğine en yakın nazal DM grefti ile tedavi etmek için çift katmanlı doku iskelesi tasarımı ve üretimi amaçlanmıştır.



Şekil 1.1 GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 çift katmanlı doku iskelesinin üretiminin şematik gösterimi

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında geliştirilen hipotez;

Burun patolojilerinin tedavisinde hem geleneksel yaklaşımlarda kullanılan greftlerin dezavantajlarının üstesinden gelmek hem de bu greftlerin üstünü örtmekte kullanılan deri fleplerine muadil/destek olabilecek hidrojel/nanofiber kompozitinden oluşmuş GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 çift katmanlı doku iskelesi üretilebilirse, rinoplasti çalışmalarında kullanılabilecek nazal DM grefti elde edilebilecektir.

DLP, elektro-eğirme ve elektrosprey yöntemlerinin kullanarak makroskobik karmaşıklıkta yapıya sahip GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 çift katmanlı doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemelerin biyobozunur ve biyouyumlu olması ECM'nin uygun taklidini sunarak tedavisi hedeflenen bölgede hücrelerin kolaylıkla tutunup çoğalmasına katkı sunabilecektir. Ayrıca çift katmanlı doku iskelesinin KİMKH ile inkübasyonundan sonra nakil işlemi birden fazla operasyona ihtiyaç duymadan cerrahi işlemin yapılmasına olanak sağlayabilir. İlaveten çift katmanlı doku iskelesinin antibiyotik ihtiva etmesinden ötürü cerrahi operasyon için kritik olan süreçte enfeksiyonu önleyebilmesi sağlanabilir. Dahası MKH ile yüklenmiş çift katmanlı doku iskelesinin büyüme faktörü ihtiva eden polimerik nanopartiküllerle kaplanması, kontrollü salımı ile hem iyileşmeyi hem de farklılaşmayı hızlandırabilir. Böylece, kullanılan biyomalzemelerin senkronizasyonu ile gerçek burun kıkırdağı en yakın şekilde taklit edilebilir, tedavide daha ekonomik çözüm sunulurken, tekrar tekrar cerrahi operasyon geçirmek zorunda kalınmaz, cerrahi operasyon sonucu oluşan yaralar hızla iyileşebilir, enfeksiyon gelişimi önlenir, doku iskelesi üzerinde bulunan kök hücre farklı katmanlarda farklı hücre soylarına farklılaşabilir.

Bu tez çalışmanın *özgün değerleri* aşağıda sıralanmıştır:

Hem sentetik hem de doğal polimerlerin bir arada kullanıldığı büyüme faktörlerinin ve nano malzemelerin de kombine edilmesiyle yenilikçi bir yaklaşımla kişiye özgü, nazal hasarlarda kullanılmak üzere tasarlanmış çift katmanlı doku iskelesi literatürde belirtilmemiştir. Böylece ilk kez nazal DM çalışmalarında epitel ve kıkırdak katmanının iyileşmesi hedeflenerek biyomimetik ve biyofonksiyonel çift katmanlı doku iskelesi tasarlanmıştır.

GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 çift katmanlı doku iskelesinin DLP, elektro-eğirme ve elektrosprey yöntemleri kullanılarak nazal DM çalışmalarında kullanılabilir potansiyelde olduğu mekanik, fiziksel ve biyolojik analizler ile bu tez çalışmasında ortaya konmuştur.

3B baskılı GelMA-CIP hidrojel katmanının elektrosprey metodu kullanılarak polimerik partiküller ile kaplanan GelMA-CIP @PVA-EGF hidrojelinin üretildiği ve deri fleplerine destek ve/veya muadil yama/doku iskelesinin potansiyelde olduğu ilk defa bu tez çalışmasında sunulmuştur.

Elektro-eğilmiş PCL-COL nanofiber katmanının elektrosprey metodu kullanılarak polimerik partiküller ile kaplanan PCL-COL@PVA-TGF β 3 nanofiber doku iskelesi nazal kırıldaklarına destek ve/veya muadil bir ürün olabilecek potansiyelde olduğu ilk defa bu tez çalışmasında sunulmuştur.

Literatürde kondrojenik farklılaşmada çok etkili olan TGF β 3 ile ilgili çok az çalışma vardır. Bu tez çalışması hem @PVA-TGF β 3 nanopartiküllerin hem de @PVA-EGF nanopartiküllerinin geliştirilerek sunulduğu ilk çalışmadır.

2 NAZAL KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

2.1 Kıkırdak Doku Mühendisliği

Kıkırdak dokunun genel fonksiyonu; kulak ve burunda şekli koruyarak esnekliği sağlamak, trakea ve bronş yapılarına destek olmak, omurlar arasında amortisör görevi görmek, eklem ek yerlerinde sürtünmeyi azaltmaktır. Vasküler, nöral, lenfatik sistemden yoksun bir bağ doku türüdür ve embriyonun mezoderm tabakasından gelişir [56]. Ayrıca; kemik ile yakın temas halinde bulunan elastik, esnek, yarı şeffaf bir dokudur. Perikondrium ile örtülü olan kıkırdak doku buradan difüzyonla veya eklem boşluklarında sinovyal sıvı ile beslenir [57]. Kondrosit adı verilen olgunlaşmış kıkırdak hücreleri yaşam boyu ECM'nin; agregan, tip II kolajen ve sülfatlanmış GAG gibi bileşenlerinin üretimini sağlayarak kıkırdak dokunun fonksiyonunu korur [58]. Kıkırdak dokuda dağınık halde %60-85 arası interstisyel sıvı, % 5'den az kondrosit, %4-7 oranında proteoglikanlar, yoğun miktarda Tip II kolajen, az miktarda Tip IX, X, XI kolajen ve diğer makromoleküller bulunmaktadır [59]. Kıkırdağın düşük kendini yenileme potansiyeli; progenitör hücrelerinden ve damarlanmadan yoksun olmasına ayrıca yoğun ECM'den dolayı hareketsiz kalan kondrositlerden kaynaklanmaktadır [60]. Kıkırdak dokusunun hiyalin, elastik ve fibröz kıkırdak olarak sınıflandırılan farklı türleri vücudun çeşitli bölgelerinde bulunmaktadır [61], [62].

Kıkırdak DM ile üretilmiş yapılar iki farklı alanda kullanılır. Bunlardan ilki, yapay kıkırdağın genellikle kıkırdağı onarmak için kullanıldığı ortopedik cerrahidir. Eklem fonksiyonunu eski haline getirmek amacıyla eklem ve menisküste kusur veya kayıp gibi durumlarda kullanılır. Diğerleri genellikle kulak kepçesi, trakea, burun, gırtlak veya göz kapağındaki kıkırdak kusurlarını veya kaybını baş ve boyun rekonstrüksiyonu için onarmada kullanılır. Özetle bir uygulama için tasarlanmış

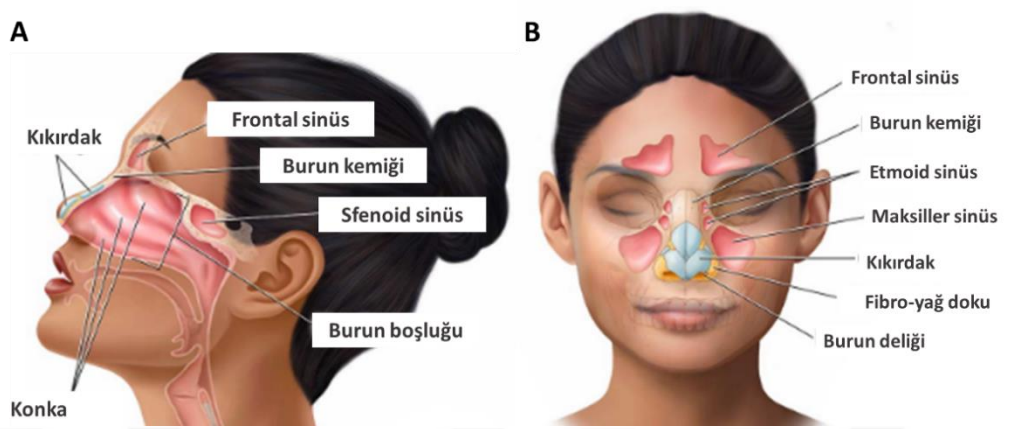
kıkırdagın karşılaştığı zorluklar, diğer uygulama için tasarlanmış kıkırdagın karşılaştığı zorluklardan oldukça farklı olabilir. Sonuç olarak, kıkırdak oluşturmaya yönelik mühendislik stratejilerinin vurgusu genellikle her uygulama için farklı olabilir [1]. Kıkırdak DM hızlı gelişmesine rağmen, nazal kıkırdagın rejenerasyonu üzerine araştırmalar sınırlı kalmıştır [2]. NKDM yeni bir araştırma alanı olmasına rağmen, eklem kıkırdagina adanmış çabalardan faydalanabilir ve böylece hızla ilerlemesi muhtemeldir [3]. Bu tez çalışmasında NKDM alanına yoğunlaşmıştır.

2.2 Burun (Nazal)

Burun; kıkırdak ve kemikten bir çerçevenin dış tabakasının deri, iç astarının ise mukoza ile kaplanmasından oluşan kompozit bir organdır [5]. Burnun; solunum, koku alma ve savunmadan oluşan üç temel işlevi vardır. Solunum işlevi; solunan havayı burun boşluğunun dar yapısı sayesinde ısıtılarak akciğerlere uygun sıcaklıkta iletilmesini sağlamaktır. Ayrıca nemlendirme ve koku epitelini korumada görevlidir. Burun boşluğuna gelen hava konkalar vasıtasıyla boşluğun üst bölgelerine doğru ilerler ve burada bulunan koku alma reseptörleri koku maddelerine bağlanıp koku alma korteksine ve diğer beyin bölgelerine sinyaller gönderir böylece koku alma işlevi gerçekleştirilir. Savunma işlevinde ise nefes alma ile solunum sistemine taşınan parçacıkları ve antijenleri mukus salgıları vasıtasıyla tutar [4]. İnsan burnunun yapısal karmaşıklığı burnun şeklinde ve formunda farklılıklara neden olur. Kas, yağ ve deri dokusunda bulunan (Dermokartilaginöz ligament ve lateral kıkırdaklar gibi) bireysel farklılıklar sebebiyle burnun profil şekillerinde farklılıklar mevcuttur [63].

Burun boşluğu solunum yolunun en sefalik kısmıdır. Dış çevreyle ön açıklıklar aracılığıyla, nazofarenks ile arka açıklıklar aracılığıyla iletişim kurar. NSK tarafından iki ayrı boşluğa ayrılarak, kemik ve kıkırdaklı çerçeve ile açık tutulur. Her boşluğun içinde solunum bölgesi (solunum epiteli, mukus hücreleri, nörovasküler bölge), koku alma bölgesi ve nazal vestibülden oluşan üç bölge vardır. Nasal vestibül; ön burun deliklerinden arkaya doğru olan alandır. Bu bölgede kaba tüyler içeren skuamöz epitelyum solunan parçacıkları filtreler. Psödostratifiye silialı sütunlu epitelyum, alt lateral kıkırdak (ALK), fibro-yag alar dokusu ve NSK da bu bölgede bulunur. Ayrıca burun boşluğunu çevreleyen alanda, hava içeren mukozal astarlı sinüsler, etmoid sinüsler (üst), frontal sinüsler (üst ön), sfenoid

sinüsler (posterior), çift maksiller sinüsler (lateral) mevcuttur [64]. Burundaki tüm anatomik bileşenlerin bütünlüğü, burnun şeklini, işlevini ve stabilitesini belirlemeye yardımcı olur [25].



Şekil 2.1 İnsan burnunun anatomik yapısı: (A) burun kısımları yandan görünümü, (B) burun kısımları önden görünümü [65]

2.2.1 Burun Anatomisi ve Fizyolojisi

Burun rekonstrüksiyonunun ilk adımı burun anatomisinin anlaşılmasıyla başlar. Burun; kıkırdak, kemik, lif, kas, yağ ve epitel dahil olmak üzere çeşitli doku tipleriyle çevrilidir ve bunlar yapısal olarak farklı kalınlıktaki bağlarla birbirine bağlıdır [66]. Genel anlamda yumuşak doku, yapısal çerçeve ve iç astar olmak üzere üç katmana ayırmak mümkündür. Her katmanın kendine özgü özellikleri ve rekonstrüktif zorlukları vardır.

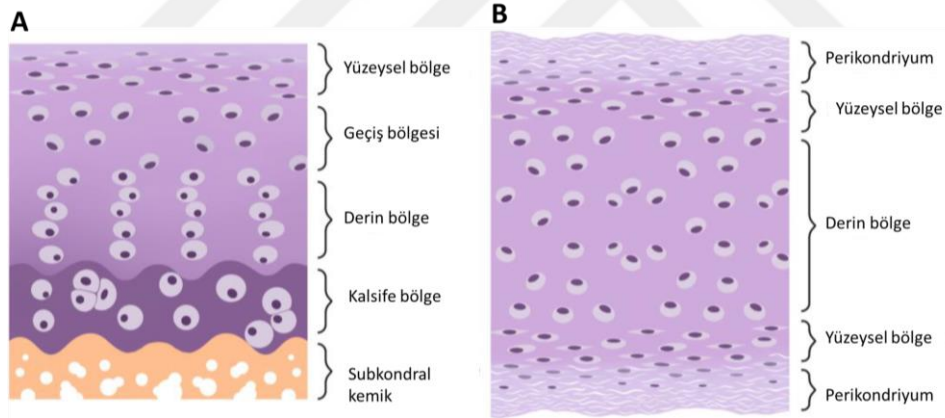
Burun yumuşak doku örtüsü (cilt); cilt altı yağ, fibromusküler tabaka ve osseokartilaginöz iskeletin üzerinde bulunan perikondrium (kıkırdak zarı) ve periosteumdan (kemik zarı) oluşur. Yumuşak doku zarfının içinde hem dış hem de iç karotid arter sistemlerine dayalı geniş bir arteriyel kaynak da vardır. Bu geniş damar dizisi, burun rekonstrüksiyonunda geniş bir serbestlik aralığı sağlar. Son olarak, bu katmanın içinde hem yumuşak doku zarfına hem de burun mukozasına duyuşallık sağlayan karmaşık bir sinir ağı da vardır [67]. En içteki tabaka, psödostratifiye silyalı sütunlu epitelyumdan oluşan (mukus salgılayan hücreler) nemli, dinamik bir doku olan vasküler burun mukozasıdır [24]. Dıştaki cilt tabakası, burnun 3 boyutlu çerçevesini örter ve bu çerçeve, sefalik uca doğru burun kemiklerinden, kaudal uca üst ve alt kıkırdaklara kadar uzanır ve fibro-yağ dokusundan oluşur (Şekil 2.3) [24]. Deri altı yağ, dermise yapışıktır ve deriden ayırt edilmesi zor olabilir. Bu tabakanın kalınlığı burun boyunca değişir [67]. İnsan

derisi, genel olarak epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere katmanlardan oluşur. Cildin en ince ve en dış tabakası olan epidermis, damarsızdır ve çok sayıda keratinosit katmanından oluşur. Bu tabaka ayrıca pigment üreten melanositlerin yanı sıra konak bağışıklık tepkisinde rol oynayan antijen sunan Langerhans hücrelerini de içerir. Altta yatan dermis, kan damarları, sinir uçları ve çeşitli bezler açısından zengindir ve esas olarak ECM için tip I kolajen sentezleyen fibroblastlardan oluşur. Son olarak, endokrin sisteminin bir parçası olarak düşünülebilecek hipodermis, çoğunlukla enerji depolama ve termoregülasyonda işlev gören yağ hücrelerinden oluşur. Hipodermis, deri modellerinde genellikle basit bir yağ depolama sistemi olarak göz ardı edilir. Fakat kök hücreler, hormonlar ve büyüme faktörleri açısından zengin, karmaşık bir lipid bariyeri olarak da işlev görür. Bu doku tabakası, üst katmanlara nüfuz eden sinirleri ve kan damarlarını sağladığından, hipodermis yeniden epitelizeasyon, yara iyileşmesi ve anjiyogeneze önemli bir rol oynar [68]. Burun bölgesindeki cilt örtüsünün mekanik özellikleri hakkında çok fazla çalışma yoktur. Homojen olmayan kalınlığa (ortalama 2mm) sahip cilt viskoelastik ve anizotropik bir malzemedir. Ciltte, anizotropik ve ince zar katmanları sürtünmeye karşı direnç ve yanal sıkıştırmaya tepki gibi mekanik özellikler sergiler. Düzgün olmayan şekli ve doğrusal olmayan bir gerilim-gerinim ilişkisi nedeniyle doğal olarak gerginlik altındadır. İçerisinde ön gerilim çizgileri (yani Langer çizgileri), kırışıklık çizgileri ve kontur çizgileri (iki cilt düzleminin etkileşimi; örneğin yanak-burun eklemi) olmak üzere üç tür doğal çizgi bulunur. İnsan cildinin mekanik özellikleri büyük ölçüde Langer çizgilerinin yönelimine bağlıdır ve nihai çekme geriliminde gerilme oranını etkiler [69]. Ayrıca cilt dokusunun nemli veya kuru olması ve sıcaklık mekanik özelliklerini etkiler. Stratum korneumun elastikiyet modülünün %0-%100 hidrasyon değişiminde 1000 ila 5 MPa arasında değiştiği bildirilmiştir. Farklı bir çalışmada kuru ve tamamen nemli stratum korneumun elastikiyet modülünün sırasıyla 200 ve 50 MPa rapor edilmiştir [70], [71]. İnsan cilt dokusunun ortalama nihai çekme mukavemetini 21,6 MPa ve elastik modülünü 83,3 MPa olarak bildirmişlerdir [72]. Ayrıca yapılan tek eksenli çekme testlerinde Langer çizgilerine paralel bir yönelimde gözlenen nihai çekme gerilimi ve elastik modül değerleri sırasıyla 28,0 MPa ve 160,8 MPa olduğu, bunun aksine, dik yönelim için bildirilen nihai çekme gerilimi 15,6 MPa ve elastik modül 70,6 MPa olarak rapor edilmiştir [73].

Burundaki yapısal çerçeve için kıkırdak dokudan detaylıca bahsetmek gerekir. Kıkırdak yapısal veya işlevsel olarak üç alt birime ayrılabilir: NSK, ALK ve eşleştirilmiş üst lateral kıkırdak (ULK) [74]. Üç bölgeden oluşan (lateral, ara ve medial crura) ALK, burun ucu ve burun deliklerinin estetik şeklini korurken nazal-vestibüler hava yolu için kritik destek sağlar [75]. ULK, septumdan üstte nazal kemiklerle ve lateralde maksilla ile arayüze kadar uzanır [75]. ULK ve ALK arasında aksesuar kıkırdak adı verilen ek kıkırdak parçaları bulunabilir. Aksesuar kıkırdak ALK'nin sefalik kenarında ya da serbestçe bulunabilir. ULK ve ALK arasındaki kıvrım bölgesi birçok endonazal rinoplasti ve hava yolu cerrahisi operasyonunda kesildiği için önemlidir [75]. NSK, burnun merkezindeki birincil yapısal kıkırdaktır ve birincil olarak dış burnun üç boyutlu yapısını ayarlamakla sorumlu olduğu için büyük öneme sahiptir [75]. Burun boşluğunu ikiye ayırarak ULK ve ALK'yı dorsal ve kaudal olarak, etmoid kemiğinin dik plakasını posterosuperior olarak, vomer kemiğinde posteroinferior olarak ayıran dörtgen hiyalin kıkırdak parçasıdır [76]. Bu bölgedeki doku; yoğun kolajen, proteoglikan ve diğer matris moleküllerinden oluşan önemli miktarda ECM ve sınırlı kondrositten oluşur (Şekil 2.2) Bu özel yapısı sayesinde şok emme yeteneğine, sağlam mekanik ve elastik özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, burun kıkırdağının kendi kendini onarma yeteneği oldukça sınırlıdır. Ayrıca lenf, kan damarları ve sinir innervasyonunun eksikliği nedeniyle herhangi bir olumsuz durumda (kopma, yaralanma vb.) bu bölgedeki kıkırdak dokunun yenilenmesi için gerekli besinlerin üretimi sınırlıdır [2]. ULK ve NSK, sırasıyla nazal kubbenin yumuşak lateral ve medial duvarlarını oluşturur [75]. Ayrıca, nazal kemiklerin çökmesini önleyen dikey bir destek olarak önemli bir rol oynar [77], ve yüksek mekanik özellikleri, burnun daha önce düşünülenenden daha yüksek mekanik yüklere dayanmasını sağlar [11]. Bu bölge, çiğneme ve nefes almada önemli işlevlere sahiptir ve estetik görünüm için de önemlidir [78]. NSK, ULK ve ALK'nin mekanik özelliklerinde, biyokimyasal içeriklerinde ve kolajen tiplerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. NSK'de majör kolajen tip II kolajendir, ancak septum perikondriumunda tip I kolajen ve elastin lifleri de mevcuttur [76]. ULK ve ALK'de NSK'ya kıyasla daha fazla miktarda kolajen tip I ve III bulunduğu rapor edilmiştir, böylece ULK ve ALK'nin daha fibrokartilajinöz olduğunu düşündürmektedir [11]. Fibrokartilajda, kolajen tip III kendi başına homofibriller ve tip I kolajen ile heterofibriller oluşturur ikisi birlikte toplam kolajenin %10'undan daha azını oluşturur [79]. NSK'nin geniş

bir ağ çerçevesinde oldukça organize olmuş kalın kolajen tabakaları içerdiği fakat ALK'nın daha gevşek, daha az organize bir kolajen düzenlemesine sahip olduğu gösterilmiştir [80]. Kadavralarda yapılan çalışmalar da her miligram ıslak kıkırdağın 24.900 ± 3910 hücre, $17,1 \pm 3,0$ mikrogram sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG), $73,9 \pm 6,4$ mikrogram kolajen ve $\%77,7 \pm 1,9$ su içerdiği rapor edilmiştir. Kondrositlerin ise yetişkin doku hacminin yalnızca yaklaşık %1'ini oluşturduğu bildirilmiştir [76].

Şekil 2.2'de eklem kıkırdağı ve burun kıkırdağı arasındaki yapısal farklılık gösterilmiştir. Burun kıkırdağı, ECM ve kondrositlerden oluşan hiyalin kıkırdaktır. Yüzeyinde subkondral kemiğe geçiş yapan bir yapının aksine, iki perikondrium arasında sandviç benzeri yapısıyla eklem kıkırdağından oldukça farklıdır. Perikondriumdan derin bölgeye yaklaşırken hücreler giderek daha büyük, daha yuvarlak ve daha seyrek dağılır. Perikondrium, tip I kolajen açısından zengindir ve böylece tip II kolajen içeren kıkırdak dokusundan ayrılır. Ancak perikondrium, kıkırdak dokusundan kolayca ayrılabilen bir zar değildir [81].



Şekil 2.2 Eklem ve burun kıkırdağı: (A) eklem kıkırdağının subkondral kemiği üzerindeki dört katmanlı yapısı, (B) burun kıkırdağının üç katmanlı yapısı [81]

ULK ve ALK'de, kolajenin medial-lateral (ML) yönünde, hem anterior-posterior (AP) hem de inferior-superior (IS) yönlerine dik olarak hizalanmasından söz edilebilir. Ayrıca NSK, ULK ve ALK'nın, sırasıyla $\%59,9 \pm 25,3$, $\%77,7 \pm 52,4$ ve $\%78,2 \pm 22,2$ 'lik birbirinden farklı gerilimde hiperelastik davranış gösterdikleri rapor edilmiştir. Ayrıca ULK'deki GAG miktarının, NSK ve ALK'den önemli ölçüde düşük olduğu da gözlenmiştir. Bu üç kıkırdak bölgenin yapısal ve işlevsel özellikleri incelendiğinde agregat modülünün NSK'nin (392kPa), ULK (185kPa) ve ALK'nin (185kPa) iki katından fazla sıkıştırıcı agrega modülüne sahip olduğu

rapor edilmiştir. Çünkü agregat modülünün, kolajen çapraz bağlama derecesiyle önemli ölçüde ilişkisi olabilir. Ayrıca daha yüksek miktarda olgun kolajen çapraz bağlarının varlığının ve kolajenin piridinolin çapraz bağlanmasının çekme mukavemetini etkilediği öne sürülebilir [11]. İnsan eklem kıkırdığının eklemlerde deneyimlediği "sürtünme kuvveti"nin 0,5 - 5,0 MPa olduğu bildirilmiştir [82]. Oysa ki sağlıklı bireylerde hareket eden havanın burun duvarıyla temas ettiğinde oluşan "sürtünme kuvveti"nin 0,08 Pa- 1,2 Pa olduğu rapor edilmiştir [83], [84]. Böylece NSK'nin yüksek mekanik kapasitesi ortaya konulmaktadır. Aynı zamanda, NSK'nin kulak kıkırdığına kıyasla üstün doku stabilitesine sahip olduğu da bildirilmiştir [77].

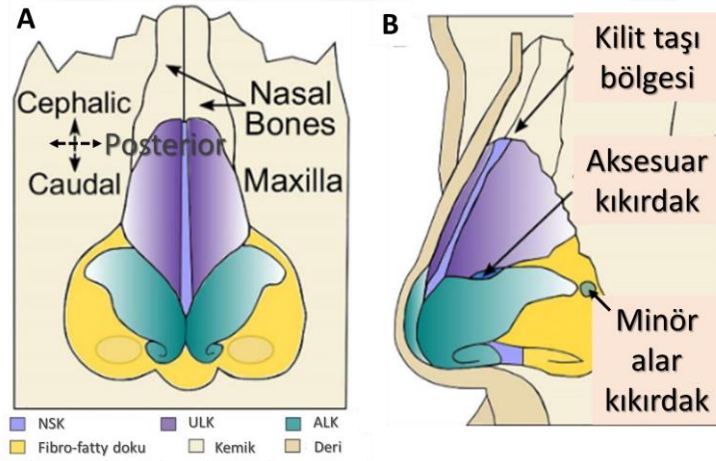
Burun dokusunun mekanik özellikleri bugüne kadar çok fazla incelenmemiştir. Literatürde olan çalışmalar ise genellikle burun kıkırdaklarının mekanik özellikleriyle ilgilidir. Fakat yapılan bir çalışmada tek eksenli uzama altında insan burun periostu ve fasyasının biyomekanik özellikleri incelenmiştir. Periost için, %24,8'lik bir kırılma gerilimi ile 3,88 MPa'lık ortalama bir çekme mukavemeti belirlendiği, fasya örneklerinin ise %51,8'lik kırılma geriliminde ortalama 2,70 MPa'lık bir çekme mukavemetine sahip olduğu bildirilmiştir [85].

İnsan burun kıkırdığının sertliği ile ilgili yapılan bir çalışmada toplam modülünün 0,23 MPa olduğu bildirilmiştir [86]. Çekme yüklemesi altında, NSK için denge modülünü 3,01 MPa, dinamik modülünü 4,99 MPa, nihai gerilimi 1,90 MPa olduğu rapor edilmiştir [87]. Benzer bir çalışma da sıkıştırma altındaki NSK için 0,44 MPa'lık bir denge modülü bildirmiştir [88]. Başka bir çalışmada NSK'ların ortalama 1,39 MPa elastikiyet modülüne sahip olduğu bildirilmiştir [89]. Yapılan başka bir çekme testi çalışmasında, insan burun kıkırdığının ortalama sertliğinin yaklaşık 0,8 MPa olduğunu göstermiştir. Fakat 0,03 - 1,5 MPa aralığında değişikliklere eğiliminde olduğu rapor edilmiştir [24]. NSK'nin ortalama elastikiyet modülünü 2,72 MPa, alar kıkırdaklarının ise 2,09 MPa olarak rapor edilmiştir [90].Yapılan başka bir çalışma da NSK, ULK ve ALK için sırasıyla nihai çekme dayanımının (MPa) doğal doku da 7,3 MPa, 4,0 MPa ve 3,0 MPa olduğunu bildirmiştir [11].

NSK ve ULK, osseokartilagenöz bağlantı ya da kemik-kıkırdak arayüzleri denilen çeşitli yüz kemikleriyle arayüz oluşturur. NSK'nin dört adet osseokartilagenöz bağlantısı vardır. Bunlardan ilki burun omurgasını, ikincisi maksillanın palatin

çıkıntısının üstünde bulunan vomer kemiğini, üçüncüsü etmoid kemiğinin dik plakasını ve dördüncüsü ise kilit taşı bölgesindeki burun kemiklerini içerir. Kilit taşı bölgesi, burunun yapısal stabilitesindeki önemli rolü nedeniyle bu şekilde adlandırılmıştır. Septum, bu bölgeleri güçlendirmek için ön ucunda ve osseokartilagenöz arayüzlerinde kalınlaşır. ULK'nin osseokartilagenöz bağlantısı, buruna mekanik mukavemet ve stabilite sağlar [26].

Ayrıca burunda osseokartilagenöz bağlantı yanı sıra cilt ve osseokartilajinöz yapılar arasında yüzeysel yağlı panniculus, fibromüsküler tabaka, derin yağlı tabaka ve periosteum veya mukoperikondrium olmak üzere dört adet tabaka bulunur. Yüzeysel yağlı tabaka panniculus, burun deliklerinin genişlemesinden sorumludur. Fibromüsküler tabaka (yüzeysel muskuloaponeurotik sistem (SMAS)) kasları, bağları ve damarları içerir. Derin yağlı tabaka, burundaki kıkırdak ve kemik yapılarıyla doğrudan temas halinde olan fibro-yagli dokunun (alt-SMAS) bir alt tabakasıdır. Son olarak mukoperikondrium ise burun kemerinin iç kısmını kaplayan ve burnun iç yapılarını korumaya yarayan tabakadır. Burun kıkırdaklarını çevreleyen tüm bu dokular, burnun stabilitesini ve şeklini korunmasına yardımcı olarak uygun burun fonksiyonu sağlar [18].



Şekil 2.3 Burun anatomisini oluşturan farklı dokular: (A) burun önden görünüm, (B) açılı önden görünüm [18]

2.2.2 Burun Patolojileri

Burun patolojilerinde genellikle kıkırdak hasarlarından bahsetmek mümkündür. NSK düz ve simetrik olmasına karşın; genetik, ırksal, çevresel ve travma gibi faktörlerden dolayı sıklıkla deviasyona uğrayabilir. Genellikle NSK

deviasyonlarının doğumda geliştiği ve yaşla birlikte kötüleştiği düşünülmektedir [6]. Temelde bu patolojik durumlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Konjenital veya edinilmiş NSK deviasyonları,
- Nazal iskelet deformiteleri,
- NSK çökmesi veya kaybına bağlı burun tıkanıklığı travmaları,
- Kanseri vakaları,
- Yaşlanma,
- ALK ve ULK'de çeşitli nedenlerle meydana gelmiş travmalar,
- Önceki cerrahi operasyonlardan kaynaklanabilir [5], [18], [11], [76].

Kalıtımsal faktörler, hamilelikte ya da doğum sırasında maksilla boyunca oluşan sıkıştırıcı basınç, maksilla ve maksiller sinüslerin düzensiz büyümesi veya gelişimi gibi nedenler konjenital NSK deviasyonlarına (%1,45 - %6,3) sebep olabilir [91]. Ayrıca en yaygın edinilmiş NSK deviasyonlarına motorlu taşıt çarpışmaları, sporla ilgili yaralanmalar ve kavgalardan kaynaklanan travmalar sebep olabilir [7]. Cilt kanserinin en yaygın görüldüğü (~%36) bölge olan burunda tümör rezeksiyonu burun kıkırdaklarının hasarı ile sonuçlanabilir [8]. Patlama ile ani gerçekleşen yanık gibi askeri yaralanmalar (%44) [9] sonucu gerçekleşen travmalar, yanık merkezlerindeki sivil (%70) hastalar da meydana gelen burun deformiteleri ve hava yolu kısıtlaması yaratan yara kontürleri [10] bu patolojik durumlar arasındadır.

Burun yüz de en çok dikkat çeken bölge olduğundan üzerinde meydana gelen dejeneratif bir durum bireyde fiziksel ve psikolojik sağlık sorunlarına yol açabilir. Tüm bu olumsuz durumları düzeltmek için mevcut yaklaşımlar olan rinoplasti ve septoplasti prosedürleri burun kıkırdaklarını yeniden yapılandırmak için günümüzde kullanılmaktadır [11].

2.2.3 Burun Patolojilerinin Tedavisi (Rekonstrüksiyonu) için Mevcut Yaklaşımlar

Burun rekonstrüksiyonu, rekonstrüktif cerrahinin en zorlu ve karmaşık alanlarından biridir. Burun rekonstrüksiyonunun temel amacı, yapıyı ve fizyolojiyi tehlikeye atmadan patolojik durumu tedavi etmektir. Modern cerrahi, mukozal fleplerin yeniden düzenlenmesiyle veya düzenlenmesi olmaksızın, deri flepi yoluyla otolog kıkırdak hasadı ve implantasyonuna olanak tanır [24].

NSK deviasyonu nedeniyle burun tıkanıklığı olan kişilere nitel ve nicel fayda sağlamak için septoplasti sıklıkla yapılır [92]. Genel olarak septoplasti rinoplastideki diğer tüm prosedürlerden önce gelir [93]. Septoplasti, deforme olmuş bir nazal septumun yeniden şekillendirilmesi veya septumun orta bölgesinden kıkırdak çıkarılması işlemidir. Genellikle, bu prosedür ek bir kıkırdak grefti gerektirmez. Septoplasti sırasında mukoperikondrium tabakasının septumdan kaldırılması gerekir çünkü cerrahi işlem sonrasında perforasyon veya yırtık gibi komplikasyonlara yol açabilir [18]. NSK eğriliğinin burun tıkanıklığı veya sinüzit gibi tıbbi açıdan önemli komplikasyonlara yol açtığı hastalarda, septoplasti ile rinoplasti eşleştirilebilir. Bu eş zamanlı prosedür, eğri burun septumunu düzeltmeyi ve ilişkili morbiditeleri ele almayı amaçlar [94]. Tedavinin temel amacı hem fizyolojik hem de estetik restorasyondur, yani hastaya burun yoluyla temiz bir hava yolu sağlamak, yara iyileşmesini sağlamak ve hastanın güzel bir burunla özgüvenini ve yaşam kalitesini artırmaktır [12]. Rekonstrüktif vakalarda rinoplasti; travma, konjenital kusurlar veya tümör rezeksiyonları gibi tıbbi prosedürler sonrasında burnun formunu ve işlevini geri kazandırmayı amaçlar. Rinoplasti, burun çerçevesini değiştirmek veya alanları büyütmek için greft kıkırdak kullanan rekonstrüktif uygulamalardır [18]. Bu uygulamaları amaçlarına bağlı olarak aşağıdaki şekilde sınıflandırabiliriz [95].

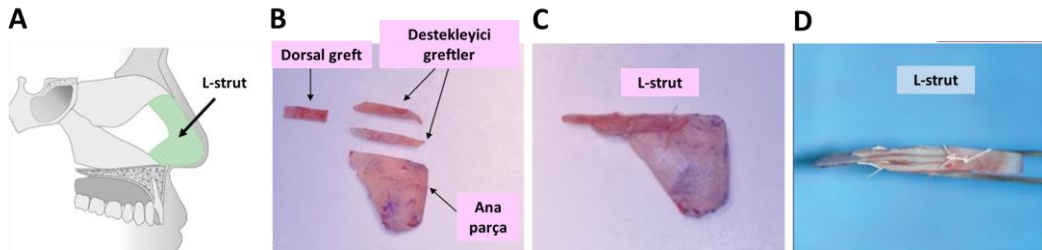
- Kozmetik cerrahi rekonstrüksiyonu (görünümü iyileştirmek için yapılır, burunda herhangi deformite ve patolojik durum yoktur),
- Deformite rekonstrüksiyonu (genellikle travma veya gelişimsel (dudak yarığı gibi) ilgili sorunlarla ilgilidir),
- Fonksiyonel rekonstrüksiyon (konka hipertrofisini onarmak için ya da NSK deviasyonu ile ilgilidir)
- Tümör rezeksiyonu

Doğal kıkırdak dokusu zayıf rejeneratif kapasiteye sahip olduğundan, rekonstrüktif burun cerrahisi genellikle orijinal doku yerine kıkırdak greftlerinin naklini gerektirir [15]. Kıkırdak greftleri, nazal kıkırdak patolojisini düzeltmek için kullanılmıştır. Greftler, hem statik kuvvetlere (örneğin yerçekimi ve yara iyileşme kontraktürü) hem de dinamik kuvvetlere (burun valfinin döngüsel deformasyonu ve kas kasılması) dayanacak şekilde mekanik olarak sağlam olmalıdır [15].

Otogreftler, allogreftler ve sentetik greftler, nazal kıkırdağı yapısal olarak desteklemek için kullanılır [16].

2.2.3.1 Otolog Greftler

NSK'nın ön ve üst bölgeleri deformitelerden etkilenirse veya tahrip olursa, L-strut adı verilen L şeklinde bir kıkırdak greft ile rekonstrüksiyon yapılır. L-strut, burunla kenetlenmeyi sağlamak için üstte dorsal grefti her iki kenarındaki üst lateral kıkırdağa bağlar (Şekil 2.4). Mümkün oldukça, greftler kalan doğal kıkırdağa dikilir ve kemikli buruna cerrahi olarak tutturulması gerekmez [3]. Günümüzde greftler burun kıkırdaklarından, kulak veya kaburga kıkırdağından elde edilmektedir. NSK'nın, ULK-ALK'den daha fazla tip II kolajen içermesi [11] nedeniyle otolog kıkırdak nakli için en sık kullanılan donör bölgelerinden biridir. Fakat NSK miktarı azalmış hastalarda, akut olarak eğilmiş, zayıf veya ince septumları olan hastalarda, alternatif greft dokusu olarak otolog kulak (auriküler) veya kaburga (kostal) kıkırdağı kullanılır [96]. Düz greftler ya da ince, kavisli greftlerin gerekliliğine göre kaburga ya da kulak kıkırdağından greft alınmasına karar verilmektedir. Kulak kıkırdağından greft alınması kolay olsa da greftleme için kullanımı sınırlı olduğundan genellikle 5. ile 12. kaburgalardan kıkırdaklı veya kemikli kıkırdaklı bir bölgeden greft kıkırdak izole edilmektedir [97], [18]. Otolog greftleme yaklaşımları, immünojenik olmadıkları için tedavide altın standart olarak kabul edilir. Ancak kullanımları donör bölge morbiditesine neden olur, enfeksiyon riskleri taşır, doku miktarı, doku kalitesiyle ve cerrahi komplikasyonlar nedeniyle sınırlıdır [17], [18], [98]. Kaburga kıkırdağından alınan greft; göğüs deformitesine, pnömotoraksa ve fonksiyonel sorunlara yol açabilir [99]. Ayrıca uzun operasyon süresi, minimal kıkırdak varlığı nedeniyle yetersiz rekonstrüktif ve ağrıya neden olabilir [90].



Şekil 2.4 L-strut tekniği kullanılarak NSK'nın rekonstrüksiyonu: (A) NSK değiştirmek için L-strut konumlandırması (yeşil), (B) L-strut'u oluşturan kıkırdak parçaları, (C) birleştirilmiş L-strut'un lateral görünümü, (D) birleştirilmiş L-strut'un üst görünümü [3]

2.2.3.2 Allojenik (Homolog) Greftler

Yeterli miktarda otolog greft için doku bulunmadığında, canlı veya kadavra donörlerden elde edilen allogreftler kullanılabilir. Biyouyumlu değildir ve teorik olarak immünojeniktir. Fakat hasta bireyde ikinci bir cerrahi operasyona sebep olmadığından otolog greftlere göre avantajlı kabul edilirler [18]. Işınlanmış homolog kostal kıkırdak (IHKK) greftleri veya ışınlanmış homolog kaburga greftleri (IHKG), rinoplastide kullanılan başlıca allojenik greftlerdir. Alıcıda bağışıklık tepki potansiyelini kaldırmak için gama ışınlarına tabi tutulan allojenik greftler hücresizleştirilirler. Böylece kullanımı güvenli kabul edilir fakat IHKG'ler %31'lik rezorpsiyon oranına sahipken, otolog kostal greftler %3'lük rezorpsiyon oranına sahip olduğu rapor edilmiştir [100]. Rinoplastide allojenik yaklaşımlar daha fazla araştırılmalıdır çünkü greft doku eksikliğini, uyumsuz doku form faktörünü ve otolog greftlemeyle ilişkili donör bölgesi morbiditesini büyük ölçüde hafifletme potansiyeline sahiptir. Bunun yanı sıra hastalık bulaştırma, enfekte olma ve yeniden emilme potansiyeline de sahiptir [18]. NSK için at, domuz ve keçi kıkırdak ksenogreftleriyle de gerçekleştirilmiş çalışmalar mevcuttur [3].

2.2.3.3 Sentetik Greftler

Doku greftlerinin muadili olarak üretilmiş ticari ürünlerdir. Genellikle silikon, Medpor® (yüksek yoğunluklu gözenekli polietilen) veya Gore-tex (farklı mekanik özelliklere sahip politetrafloroetilen) gibi sentetik greftler, düşük immünogeniteleri ve donör bölgesi morbiditesinin olmaması nedeniyle tercih edilmiştir. İstenilen forma kolayca getirilebilir, maliyeti azdır, kolaylıkla temin edilebilir ve birden fazla cerrahi operasyon gerektirmediği için cerrahi süreyi kısaltır [20], [18]. Bununla birlikte, sentetik greftlerin konak doku ile entegrasyon, yüksek enfeksiyon, göç ve ekstrüzyon gibi sınırlamaları vardır [21]. Doğal burun kıkırdaklarının özellikleriyle sentetik greftlerin özellikleri niceliksel olarak yeterince karşılaştırılıp güvenilirliği üzerine çalışmalar yapılmamıştır. Ayrıca sentetik greftlerde öngörülemeyen komplikasyonlardan dolayı çok fazla tercih edilmezler.

2.2.3.4 Cilt Flepleri

Kıkırdak greftlerin yumuşak doku ile kaplanması gerekir. Böylece, kıkırdak greftinin üstü bir cilt flepi ile kaplanarak alttaki kıkırdak alanının iyileşmesine olanak tanınır [22]. Cilt flepleri, renk uyumuna, doku bulunabilirliğine, pedikül

kalitesine, kişisel deneyim ve uzmanlığa göre seçilir. Günümüzde burun rekonstrüksiyonu için alından alınan yumuşak doku parçası, renk uyumu ve deri altı kalınlığı nedeniyle altın standarttır. Alın flebi yoksa ön kol deri flebi de kullanılabilir [23]. Cildin biyomekanik değerleri literatürle karşılaştırıldığında mekanik testlerde farklılıkların olması biyolojik dokularda beklenen bir durumdur. Bu durum biyolojik dokunun test koşullarından ve denekler arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Cilt parçasının vücuttan çıkarıldıktan sonra mekanik analizler için farklı saklama ve hazırlama protokolleri nedeniyle sayısal veriler değişebilir. Griffin ve ark., burun rekonstrüksiyonu için farklı cilt bölgelerden yaptıkları mekanik özellikleri karşılaştırarak, farklı cilt bölgeleri arasında elastik modülünün değiştiğini bildirmişlerdir. Sonuçlar; submandibular cilt parçası için 1,28 MPa, Ön kol için 1,03 MPa, Postauriküler mastoid için 0,86 MPa, temporoparietal için 0,65 MPa, Alın için 0,33 MPa olarak rapor edilmiştir [23]. Annaidh ve ark., bugüne kadar literatürde yer alan çıkarılmış insan cildinin sonuçlarını karşılaştırmış ve elastik modülünün farklı donör bölgelerinden bağımsız olarak 2,9 ila 150 MPa arasında değiştiğini bildirmiştir [72]. Jacquemoud ve ark., alın ve kolun *in vitro* gerginliğini karşılaştırmış ve elastik modülün 19,5-87,1 MPa arasında değiştiğini bildirmiştir [101]. Deri fleplerinde, implant ekstrüzyonu allogreftlerde çok karşılaşılan bir komplikasyondur. Bu ekstrüzyon mekanizmasının; enfeksiyon, hastanın eşlik eden hastalıkları ve implant özelliklerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Burun rekonstrüksiyonu için sentetik greftler kullanıldığında; greftin üstteki cilde maruz kaldığı temas stresini azaltmak için implantı bir otolog doku tabakasıyla sarmak hedeflenir. Bu şekilde kaplı sentetik greftlerin çevredeki cilt dokusu üzerindeki stresi azaltarak ekstrüzyonun önlenmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir [23].

Büyük cilt defektlerinde nazal rekonstrüksiyonun kozmetik sonucunu iyileştirmek için hastanın cilt dokusu ve rengiyle tam olarak eşleşecek şekilde tasarlanmış, burunun en ideal konturlarını alan, buruna uyan, donör bölgesi oluşturmada bir DM ile yapılmış cilt yapısı ideal olacaktır.

Çünkü hem greft kullanımları hem de greft ile birlikte cilt flep kullanımlarının kendi içinde avantajları kadar dezavantajları da mevcuttur. Bu nedenle burun greftleri geliştiren araştırmacılar için, greftleri örtebilen ya da cilt flepine destek

olabilen cilt örtüsüne muadil ürünleri de dikkate alarak ürün geliştirmeye çalışmak önemli olacaktır.

Sonuç olarak burun patolojilerinin tedavisinde kullanılan yöntemlerin sınırlamalarını aşağıda maddeler halinde özetlemek gerekirse;

- Sınırlı donör dokusu,
- Enfeksiyon riski,
- Yetersiz yara onarımı,
- İşlevsel kıkırdığın yalnızca kısmi rekonstrüksiyonu gibi mevcut kıkırdak tedavilerindeki sınırlamalar,
- Rinoplastide kullanılan mevcut stratejiler ile greftin bireysel konturlara uyacak şekilde titizlikle şekillendirmesinin zaman alıcı ve zorlu olması,
- Birden fazla cerrahi işlem,
- İmplant ekstrüzyonu,

Çok farklı doku katmanlarına sahip olan burun patolojilerini onarmak için alternatif strateji alanı olarak DM paradigması ile DM greftleri tasarlanabilir. Bunu yaparken kıkırdak ve cilt alanlarında kaydedilen DM ilerlemesinin burun DM'si içinde itici güç olacağı düşünülebilir [24], [18].

Burun rekonstrüksiyonunda daha iyi sonuçlar sağlamak için uygun malzemeler üretmeye yönelik karşılanmaya çalışılan bir klinik ihtiyaç vardır. Ayrıca üretilecek ürünün çevresindeki dokularla benzer mekanik özelliklere sahip olmasını sağlamak, kayma gerilimini, mikro hareketi, enfeksiyon riskini önleyerek uygun boyutlarda üretilmesini sağlamak çok önemlidir.

Nazal rekonstrüksiyon için kullanılabilecek bir kompozit nazal DM üzerinde çalışmaların sayısının artması klinikte kullanıma en uygun ürün elde etmeyi de sağlayacaktır. Bu DM ürünü ayrı ayrı tasarlanabilir ve burunu yeniden yapılandırmak için cerrahi işlem ile birleştirebilir ya da kompozit bir doku iskelesi olarak tasarlanabilir ve cerrahi işlemi daha kolay hale getirebilir.

2.3 Doku Mühendisliği

Dr. Joseph ve Dr. Robert Langer tarafından yaklaşık 35 yıl önce DM kavramı tanıtılmıştır. Başlangıçtaki motivasyonu, organ nakli bekleyen hastaların artan ölümlerine yol açan organ azlığı sorununu ele almak ve diyalize alternatif olarak

canlı ekstrakorporeal cihazların üretimine alternatif olmaktır. Ayrıca klinik uygulamaların dışında, tasarlanmış biyolojik ikamelerin, *in vitro* biyoloji ve fizyoloji çalışmaları ile ilaç testleri gibi klinik olmayan amaçlar için de kullanılması amaçlanmıştır [102]. Biyomedikal alanda gelecek vaat eden disiplinler arası bir alan olan DM; biyologlar, mühendisler ve cerrahların iş birliğiyle; cerrahi ve diğer tıbbi müdahalelerin başarısız olması durumunda tedavi seçenekleri sunmayı hedefler. Nihai amacı; hastalıklı veya bozulmuş insan dokularının iyileştirilmesi, onarılması veya değiştirilmesi için yeni dokuları *in vitro* üreterek doğal işlevlerini geri kazandırmaktır. Geleneksel DM'nin en bilinen üçlü paradigması; hücreler, doku iskeleleri ve biyoaktif bileşenlerdir [103], [3]. Yaklaşık kırk yıl önce ortaya çıkan DM kavramı günümüze; sağlam biyolojik yapı taşları, hassas biyoüretim teknolojileri, derinlemesine karakterizasyon yöntemleri, *silico* modeller dahil olmak üzere biyoloji ve teknoloji arasındaki arayüz yenilikleri sayesinde gelişip olgunlaşarak ulaşmıştır. Artık günümüzde DM ile üretim, yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı stratejiler olarak ikiye ayrılmaktadır. Geleneksel yaklaşım yani yukarıdan aşağı üretim stratejisi; hücreler, biyoaktif bileşenler ve doku iskelelerden oluşan biyolojik bir üçlüye dayanmaktadır. Gelişimsel mühendislik (GE) olarak da adlandırılan alternatif bir aşağıdan yukarıya DM stratejisi ise *in vivo* doku gelişimini, yapısını ve işlevini taklit etmek için sistem biyolojisi ve gelişim biyolojisi ile yakından ilişkilidir [102]. Burada temel ilke, hücrelerin ve ECM bileşenlerinin entegre işlevsel ağlarını çoğaltmaktır. Böylece entegre biyolojik sistemlere sahip yapılar üretilmesi amaçlanmıştır. Tam işlevli dokuları yeniden oluşturmak için, farklı hücreler ve onları çevreleyen ECM bileşenleri gerçek hedef dokularda olduğu gibi koordine edilerek düzenlenir. Öncelikle tedavisi hedeflenen doku için her katmanı ayrı ayrı tasarlanarak üretilir daha sonra katmanlar birleştirilerek hedef dokunun taklidi sağlanır. Aşağıdan yukarıya stratejisi, geleneksel yukarıdan aşağıya stratejisinden birkaç açıdan farklıdır. Bunlar:

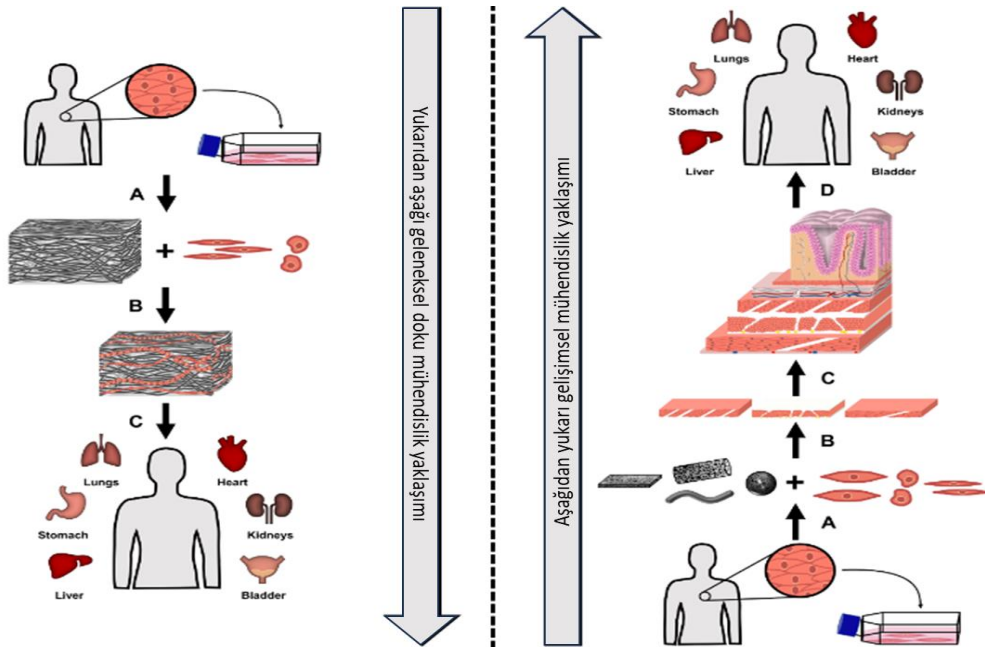
- Dokunun yeniden yapılandırması için daha temel ancak yalnızca birkaç baskın hücre tipi kullanılmaz.
- Hedef doku ile aynı boyut ve şekildeki tek bir doku iskelesi yerine, farklı hücre tipleri için daha küçük boyutlarda ve değişen şekillerde birden fazla modüler doku iskelesi üretilir.

- İşlevsel dokular, basitleştirilmiş tek aşamalı bir hücre ekimi ve kültürleme prosedürü yerine dikkatlice koordine edilmiş zamansal ve mekânsal süreçlerle yeniden yapılandırılır.

Sonuç olarak geliştirilmiş yeniden üretilebilirlik, standartlaştırılmış doku üretim protokollerinin tasarlanması DM çalışmalarını daha verimli hale getirir [102].

DM ile hazırlanmış ürünlerden birçok klinik çalışma devam etse de, günümüzde hala ticari olarak somut sonuçlar oldukça sınırlıdır [104]. Bu çok sınırlı klinik uygulama, esas olarak geleneksel yukarıdan aşağıya doku üretim yaklaşımıyla ilişkili temel engellerden kaynaklandığı düşünüldüğü için aşağıdan yukarıya DM stratejisi önerilmiştir. Bu strateji ile klinik uygulamalar için vaat edilen başarıları sağlama potansiyeli öngörülmüştür.

Yukarıdan aşağıya DM stratejisi, cilt ve kıkırdak dokuları gibi nispeten az hücre tipi ve basit anatomik yapılara sahip dokuların üretimi için uygun olduğu birçok kaynakta rapor edilmiştir. Ticari olarak yukarıdan aşağıya yaklaşımla üretilen klinik uygulamalarda tek başarılı DM ürünü, anatomik yapısı bakımından karşılaştırılabilir derecede basit olan yeniden yapılandırılmış insan derisidir. Klinik amaçlar için diğer umut vadeden DM ürünleri, üretici şirkete bağlı olarak faz I veya faz II klinik deneylerini geçen biyoyapay kıkırdaklar gibi görünmektedir [102].



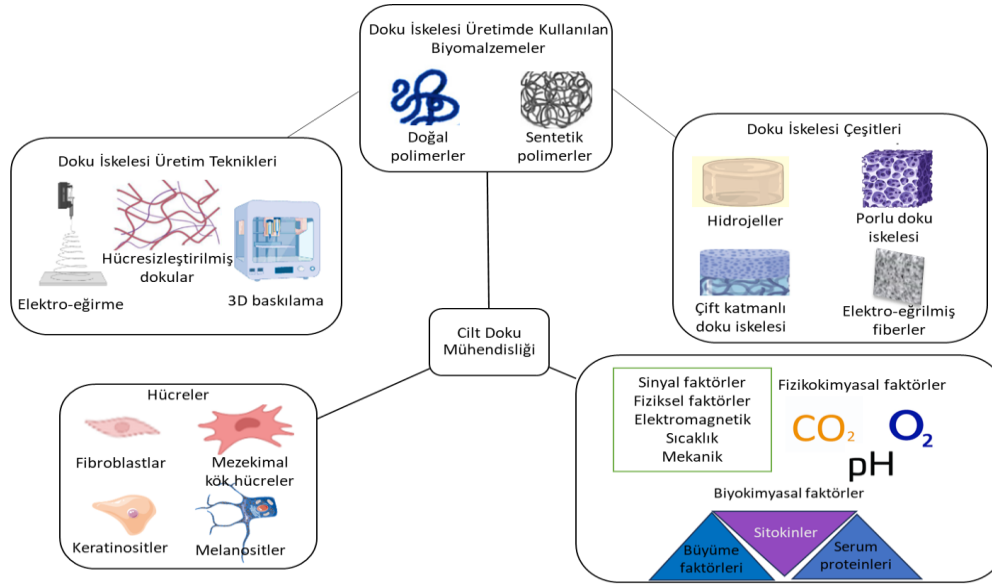
Şekil 2.5 Doku yeniden yapılanmasına yönelik geleneksel yukarıdan aşağıya doku mühendisliği (sol) ve aşağıdan yukarıya gelişimsel mühendislik (sağ) yaklaşımlarının karşılaştırılması [102]

2.3.1 Cilt Doku Mühendisliği

İnsan vücudunda en büyük organ olan cilt, epidermis, dermis ve hipodermis (subkutan fasya) olmak üzere çok katmanlı bir yapıya sahip olduğunu yukarıda bahsetmiştik. Epidermis ile dermis arasındaki arayüz, bağ dokusundan oluşan bazal membran bölgesidir. Öte yandan, hipodermis dermis ve epidermisi alttaki yapılara bağlama işlevi görür. Cildin her katmanının kendine özgü özellikleri vardır. Epidermis tabakasında bulunan keratinositler, melanositler, langerhans hücreleri, merkel hücreleri dermis ile immünolojik savunma, ultraviyole ışığa karşı bariyer, keratin üretimi sağlama gibi işlevleri görürken bazal membran dermis ile aradaki bağlantıyı sağlar. Dermis tabakasındaki fibroblastlar, dermal denrositler, mast hücreleri, histiyositler genellikle immünolojik savunma ve ECM üretiminden sorumludur. Bu tabakada bulunan kolajen mekanik destek, elastik lifler elastikiyet, GAG kolajen ve elastik dokuyu destekler. Son olarak hipodermis tabakasında bulunan fibroblastlar, yağ hücreleri, makrofajlar ise ECM üretiminden, trigliserit formunda enerji depolamadan ve immünolojik savunma işlevlerini yerine getirir. Bu tabakada bulunan kolajen ve elastik lifler de yine dermis tabakasındaki gibi mekanik destek sağlar. Ayrıca cilt, su ve elektrolit kaybına karşı bir bariyer görevi görür. Keratinositler epidermal hücrelerin çoğunluğunu, neredeyse %95'ini oluşturur. Kan damarları dermis ve hipodermiste bulunur. Ancak epidermiste kan damarı yoktur; besinlerini dermo-epidermal kavşaktan yayılan dermisin kan damarlarından alır. Doku sinirleri tüm cilt katmanlarına dağılmıştır [105].

Yanıklar, ülserler, travmatik ameliyat sonrası yaralar gibi akut ve kronik faktörler cilt yaralanmalarına neden olabilir. Cilt onarımı genellikle cilt greftleri veya rekonstrüktif cerrahi yoluyla yapılır, ancak bunların bireylerde yeni yara bölgelerinin oluşturulması gibi belirli sınırlamaları vardır [106].

DM ile elde edilen cilt muadili yama /doku iskelesinin amacı, doğal fizyolojik form veya işlevi taklit eden bir yapı oluşturmaktır. Bu geliştirilen yapı ile cilt dokusu tedavi edilebilir. Böylece cildin normal fonksiyonu zamanında geri kazanılabilir. Ciddi cilt yaralanmasında yara pansumanı veya cilt ikamesi olarak kullanılabilir [68]. Bundan dolayı nazal alanda kullanılacak bir cilt flep muadili DM ürününe cilt DM çalışmalarıyla ulaşılabilmektedir. Cilt DM alanı hızlı yara iyileşmesini ve dolayısıyla cildin restorasyonunu kolaylaştırmak için gelişmiştir. Cilt dokusu rejenerasyonu esas olarak uygun doku iskelelerinin kullanımına dayanmaktadır.



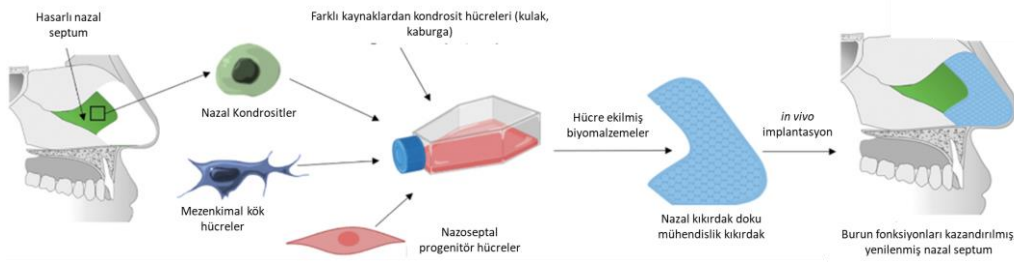
Şekil 2.6 Cilt doku mühendisliği paradigması

Bu dokü iskeleleri, son derece biyouyumlu doğal biyomalzemelerden veya sentetik malzemelerden oluşabilir [105]. Doğal veya sentetik biyomalzemelerin bir kombinasyonu olan kompozit dokü iskeleleri cilt dokusu rejenerasyonu için son derece biyouyumlu ve geliştirilmiş çekme mukavemetine sahip olabilir [107]. Çeşitli biyomalzemelerin ve dokü iskelelerinin özellikleri, avantajları ve dezavantajları hakkında uygun bilgi, cilt dokusu rejenerasyonu uygulamaları için uygun iskelelerin üretimini hızlandıracaktır. Dokü iskelesiyle hücre etkileşimi, daha hızlı hücresel çoğalma/farklılaşma ve tasarlanmış dokuların vaskülarizasyonu gibi dezavantajlar bu alanda önde gelen zorluklardan bazılarıdır [107].

2.3.2 Nazal Kıkırdak Dokü Mühendisliği

Nazal alanda kullanılacak olan yapay kıkırdakın kolayca eğilip bükülebilen, kuvvet geri çekildiğinde ise eski halini alabilen bir dokü iskelesi olması gerekir. İyileşmenin istenilen seviyede olabilmesi için bireye implant edilecek NKDM ürünü yapay dokunun etrafındaki sağlıklı dokü ile çok iyi seviyede bütünleşmesi gerekir. Ayrıca bu yapay dokuyu oluştururken o alan için doğru hücre soyundaki çok sayıda hücreye ihtiyaç vardır. Tüm bunlar göz önüne alındığında kıkırdak DM'nin tüm bileşenlerinin entegre olduğu ve hibrit metotların bir arada kullanılarak üretildiği bir biyomimetik, biyofonksiyonel NKDM ürünü yapay dokunun üretimi bu alandaki ihtiyacı karşılayacak bir çözüm yolu sunabilir [95]. NKDM alanı, kıkırdak DM'deki çalışmaların perspektifinden ilerleyebilir. Örneğin; Ortopedik uygulamalarda, tasarlanmış kıkırdakın, komşu doğal kıkırdakla

ve çoğu durumda subkondral kemikle bütünleşmesi gerekir. Yeniden yapılandırma için yeterli miktarda doku gereklidir ve tasarlanmış dokular, işlev ve uygun entegrasyon sağlamak için uygun biyokimyasal özelliklere sahip olmalıdır [108]. Osseokartilagenöz bağlantılar burun içindeki stabilite için önemli olsa da eklem kıkırdağı ile subkondral kemiği arasındaki gibi osteokondral arayüzleri yansıtır yansıtmadıkları hakkında çok az şey bilinmektedir. Rinoplastide şu anda kullanılan greftlerin kıkırdaktan oluştuğunu yukarıda detaylıca anlatmıştık. Bu greftler mukoperikondriumdan yoksundur ve genellikle kemikli yapılara cerrahi olarak bağlanmayı gerektirmez. Bu nedenle, NKDM için tasarlanan yapay kıkırdaklarda osteokondral implantlar oluşturmaya veya perikondriyal katmanları tasarlamaya gerek yoktur [18]. NKDM, hücreyel uygulamaları, doğal veya sentetik biyomalzemelerle hazırlanan doku iskelelerini ve uygun biyoaktif bileşenlerin kombinasyonunu kullanan çalışmaları içerir [3].



Şekil 2.7 Nazal kıkırdak doku mühendisliği paradigması [3]

Burada hücre kaynaklarını farklı dokulardan (burun, kulak ve kaburga gibi) kondrositler ve/veya çeşitli dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücreler (adipoz dokusundan, wharton jelinden veya kemik iliğinden) oluşturur. MKH kullanımı, septum, kulak veya kaburgalar gibi diğer anatomik bölgelerden kıkırdak hücresi toplama ihtiyacını ortadan kaldırarak, ikincil donör morbiditesi olmadığı için umut verici strateji haline gelmiştir. Bu alanda kullanılan biyomalzeme kaynakları oldukça çeşitlidir [109], [103]. Sentetik, doğal ya da kompozit polimerlerden geliştirilen doku iskeleleri, elektro-eğirme, 3B basım gibi yöntemler kullanılarak yapılandırılabilir [25], [110].

Literatür incelendiğinde nazal rekonstrüksiyon için tasarlanmış DM grefti genellikle NKDM uygulamalarının septum kıkırdağı veya alar kıkırdak rekonstrüksiyonu ile sınırlıdır. Burun kıkırdağını çevreleyen dokuların eş zamanlı tasarımı hakkında neredeyse hiç çalışma yoktur [24], [18]. Bu alandaki lezyonların ve defektlerin onarımı ve üst bölgedeki deri de dahil olmak üzere kıkırdak değiştirilmesini gerektiren

defektlerin yeniden yapılandırılması zor olabilir. Doğru biyomalzeme, biyoaktif bileşenler ve mekanik uyarılarla, bağışıklık tepkisi olmadan implante edilebilir bir nazal DM greftini elde etmek mümkündür. Yayınlanan her rapor, gelecekteki en mükemmel nazal DM greftinin oluşturulmasında itici güç olacaktır.

2.4 Doku Mühendisliği Paradigması

Yukarıda DM'yi anlatırken klasik DM'nin doku iskeleleri, hücreleri ve biyoaktif bileşenleri içerdiğinden bahsedilmişti [111]. Bundan sonraki bölümlerde paradigmanın tüm bileşenlerini daha detaylı anlatacağız.

2.4.1 Hücreler

DM paradoksunun üç temel taşından biri olan hücreler hedeflenen dokunun özelliklerine göre çalışmak istenilen DM yaklaşımına göre değişebilir.

Cilt DM'sinde hücre kaynakları olarak keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri ve endometriyal, yağ, göbek kordonu, kemik iliği gibi mezenkimal kök hücreleri (ya da yeni adıyla tıbbi sinyal hücreleri (MSC)) kullanıldığı rapor edilmiştir. Keratinositler epidermisteki ana hücrelerdir. İnsan dermal fibroblastları ise dermiste iyileşme sürecine katılan kolajen ve elastin lifleri üreten başlıca hücrelerdir. O yüzden keratinositlerin ve fibroblastların cilt DM çalışmalarında çoğunlukla kullanıldığı rapor edilmiştir [105].

NKDM'de yaygın kullanılan hücre kaynakları burun septumundan, kulak kepçesinden veya kaburgadan alınan otolog kondrositlerdir. Kondrositlerin *in vitro* çoğaltılması dedifferensiyon veya fenotip kaybına yol açmaktadır [112]. Sadece üç tek katmanlı kültür pasajından sonra fibroblast benzeri özellikler gösterir [113]. Kültür ortamına, TGF β 3, fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2) ve insülin büyüme faktörü 1 (IGF-1) takviyesi ile dedifferensiyon işlemi geciktirebilir [114]. Kondrositler her ne kadar kıkırdığa yük binmeyen sağlıklı bir bölgeden alınsa da büyük kıkırdak hasarları çok fazla hacimde kondrosit hücrelerinin toplanmasını gerektirir bundan dolayı donör de ikincil hasar meydana getirebilir [115].

Tüm bu saydığımız otolog kondrositlerin neden olduğu dezavantajlar hızlı bir şekilde alternatif hücre kaynaklarına yönelime neden olmuştur. Otolog kondrositlere alternatifler hücre kaynaklarından biri farklılaşmış kondroprogenitör hücrelerdir [76]. Nazal kondroprogenitör hücrelerin (KPH'ler) kullanımına yönelik araştırmalar, yerinde

burun septum kırıkdağı rejenerasyonu için fırsatlar ortaya çıkarmıştır. KPH'ler pluripotens ve mezoektodermal kök hücre belirteçleri ihtiva eder. Diğer hücelere kıyasla daha yüksek klon oluşturma potansiyeline sahiptir, daha uzun ömürlüdür ve *in vitro* hızla çoğalabilir [76]. Bu nedenle son dönemde oldukça dikkat çekmektedir. Ayrıca otolog kondrositlere diğer alternatif hücreler, pluripotent kök hücreler ve MKH'lerdir (yeni adıyla tıbbi sinyal hücreleri (MSC)) [76].

Kök hücreler; kendini yenileme kapasitesine ve vücuttaki herhangi bir hücre tipine farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Progenitor hücre ise elde edildiği dokuya veya organa özgü hücreleri üretme yeteneğine sahip hücelere denir. Birçok yetişkin kök hücre rapor edilmiş olsa da DM için kullanılabilir kök hücre tipleri sınırlıdır. Bunun nedeni aranan kök hücrenin; büyük miktarlarda kolayca elde edilebilir, implantasyon için güvenilir ve ihtiyaç duyulan hücelere farklılaşabilme yeteneğine sahip olması gerekliliğidir. Hem erişim hem de büyük sayılarda elde edilmesinin kolay olması sebebiyle genellikle yetişkin kök hücreler tercih edilir. Pluripotent kök hücreler (embriyonik kök hücreleri ve indüklenmiş pluripotent kök hücreleri içerir), çoğalma potansiyeline sahip oldukları için yeterli sayıda hücre sağlayabilirler, fakat etik tartışmalar ve tümör oluşturma potansiyelleri genellikle klinik uygulamalarını engeller [116].

MKH'ler kemik iliği veya yağ dokusu dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. MKH'lerin cildin iyileşme sürecinde ECM üretimine ve yeniden şekillenmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir [117].

KİMKH'lerin, yeniden epitelizeasyonu hızlandırıp, anjiyogenezi artırarak direkt olarak keratinosit-spesifik belirteç ifade eden epitel hücelerine farklılaşp cilt iyileşmesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir [118]. Hızlı büyüme ve uzun ömürlülük gibi avantajlarının yanı sıra, tekrarlanan alt kültürlenme ile yaşlanma ve MKH kaynaklı kondrojenin hiyalin kırıkdağı yerine tip I kolajen açısından zengin fibrokartilaj dokusu üretme eğilimi gibi dezavantajları yer alır [76]. Olgun doku oluşumunu desteklemek için kök hücreler büyüme faktörleri ile güçlendirilmelidir.

2.4.2 Biyoaktif Bileşenler

Biyoaktif bileşenler, doku iskelesine veya doğal doku parçasına entegre edilebilen; yapısal proteinler, anjiyojenik faktörler, sitokinler, hormonlar, DNA-RNA fragmentleri, büyüme faktörleri, sinyal molekülleri ve çevresel uyarıcılardır [119],

[120]. Hem doku iskelesi özelliklerinde hem de hücre davranışı üzerinde büyük etkiye sahip olabilir [120]. Uygulama amacı, hücre hareketini, büyümesini ve farklılaşmasını düzenlerken aynı zamanda doku yenilenmesini teşvik etmek için nakledilen hücrelerle veya konakçı hücrelerle kendi özel mikro ortamlarında etkileşime girmesinin sağlanmasıdır. Ayrıca *in vivo* doku ortamını taklit ederek gereken besinleri sağlayabilirler [119].

Büyüme faktörleri; hücresel aktiviteleri düzenlemek için sinyaller ileten polipeptitlerdir. Büyüme faktörleri, hücresel çoğalmayı, farklılaşmayı, göçü, yapışmayı ve gen ifadesini uyarabilir veya engelleyebilir [121], [119]. Bu küçük protein parçalarının, farklı hücre popülasyonları arasında bilgi aktarımında rolleri vardır. Hücrelerde belirli reseptörlere bağlanarak bazı moleküllerin salgılanmasını ve hücrelerin farklılaşmasını teşvik eden sinyal kaskadlarını tetiklerler. Fizyolojik mikro çevre içinde kısa biyolojik yarı ömre sahiptirler. Farklı hücre tipleri aynı büyüme faktörlerini üretse de, aynı proteinler konsantrasyona ve alıcı hücre tipine bağlı olarak farklı hücresel tepkiler ortaya çıkarabilir [122]. Doku işlevi için kritik büyüme faktörleri, EGF, TGF β , fibroblast büyüme faktörleri (FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve IGF-1 bulunur [68].

Tablo 2.1 Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan büyüme faktörleri [123], [124]

Büyüme Faktörleri	Moleküler Ağırlığı (kDa)	Aktivitesi
EGF	6,2	Epitel, mezenkimal ve fibroblast hücrelerinin çoğalması
PDGF-AA	28,5	Düz kas hücreleri için proliferasyon ve kemotaktik ajan; ECM sentezi ve birikimi
PDGF-AB	25,5	
PDGF-BB	24,3	
TGF α	5,5	Keratinositlerin göçü ve çoğalması; ECM sentezi ve birikimi
TGF β	25,0	Kıkırdak oluşturan hücrelerin çoğalması ve farklılaşması, fibroblastlar için kemotaktik
BMP-2	26,0	Kemik oluşturan hücrelerin farklılaşması ve göçü
BMP-7	31,5	

Tablo 2.1 Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan büyüme faktörleri [123], [124] (devamı)

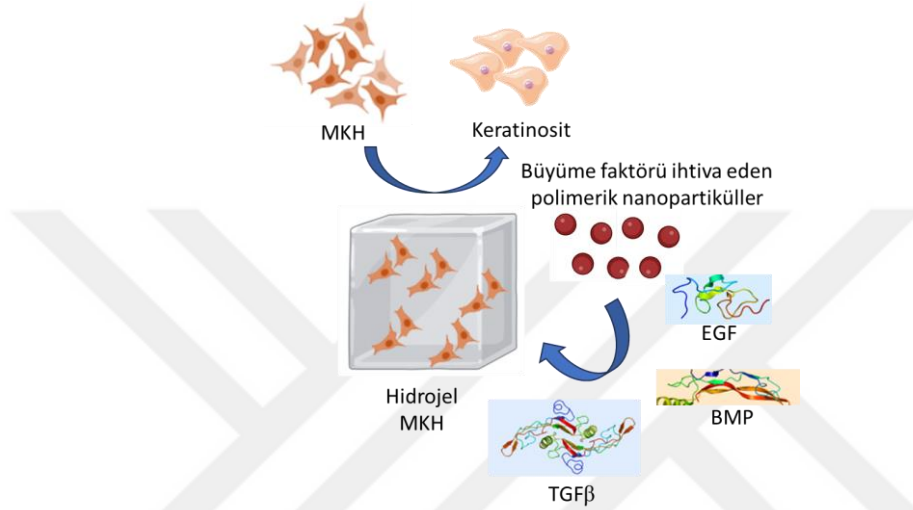
Büyüme Faktörleri	Moleküler Ağırlığı (kDa)	Aktivitesi
bFGF FGF-2	17,2	Fibroblastların çoğalması ve anjiyogenezin başlatılması
VEGF	38,2	Endotel hücrelerinin göçü, çoğalması ve hayatta kalması
IGF-1	7,65 [125]	Nöranal büyüme, miyelinleşme, endometriyal epitel hücre çoğalması, hücre apoptozunun inhibisyonunu artırır.

EGF, moleküler kütlesi yaklaşık 6 kDa olan küçük bir polipeptittir [47]. Güçlü bir mitojendir ve hücre içi kalsiyum ve pH'ın düzenlenmesi yoluyla mitozu uyarır. Ayrıca EGF, bazal membran ve ECM bileşenlerinin sentezini, keratinositlerin, endotel hücrelerinin ve fibroblastların uyarılmasını, çoğalmasını ve göçünü kolaylaştırır [126], [127]. KİMKH'lerin epitel benzeri hücrelere farklılaşmasında da görev alır [46].

TGFβ, süper ailesi, embriyogenez ve yetişkin doku homeostazında kritik roller oynayan TGFβ izoformları, aktivinler/inhibinler, nodal, anti-Müllerian hormon proteinleri, büyüme farklılaşma faktörleri (GDF'ler) ve kemik morfogenetik proteinlerini (BMP'ler) içerir. Üç TGFβ izoformu, farklı kromozomlarda bulunan farklı genler tarafından kodlanır. Genellikle, TGFβ3'ün mRNA'sı çekirdekte üretilir ve sitoplazmaya taşınır. TGFβ3, insan vücudunun tüm dokularında hücre metabolizmasını ayrıntılı bir şekilde düzenleyerek fizyolojik ve patolojik işlevlere katılır. [128]. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması için gerekli olan biyosinyal moleküldür. Kondrojenik farklılaşmanın indüklenmesinde ve sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır [43], [44].

Kondrogenezis ve epitelizasyon gibi kök hücreden spesifik doku hücrelerinin rejenerasyonunun gelişmesi için kök hücreleri indükleyen büyüme faktörleri kullanılabilir. Cilt yarası iyileşmesinin moleküler mekanizması esas olarak EGF TGFα ve TGFβ vb. gibi çeşitli büyüme faktörlerinin üretimini içerir [107]. *Epitelizasyon*, yara iyileşmesinin başarısının tanımlayıcı bir parametresi olarak kullanılan yara iyileşmesinin temel bir bileşenidir [129]. Yeniden epitelizasyon,

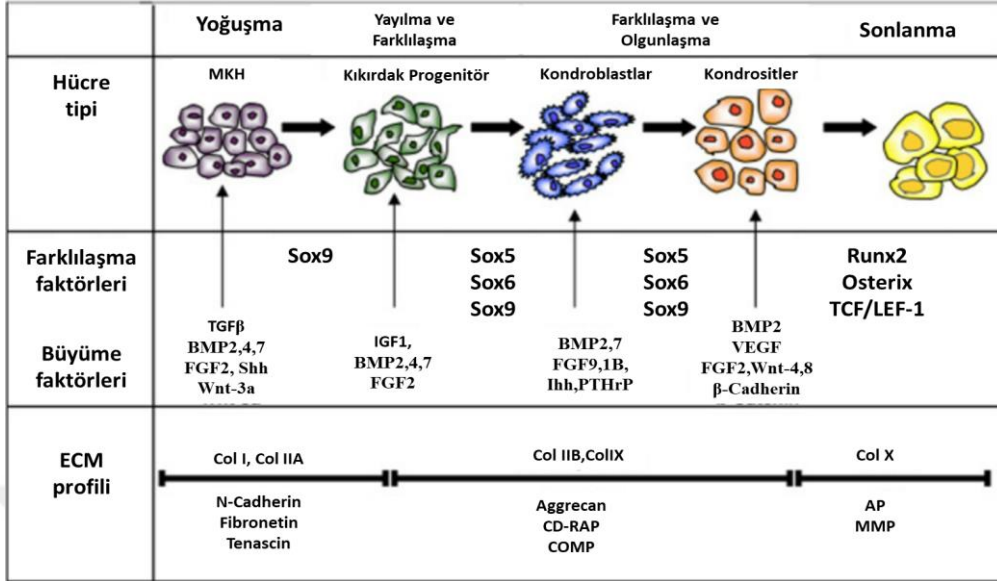
esas olarak makrofajlar tarafından sentezlenen nitrik oksit, EGF, hepatosit büyüme faktörü (HGF), FGF-7 dahil FGF'ler, heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF), TGF β , TGF α , IGF-1, sinir büyüme faktörü (NGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF'ler), BMP ve epidermal granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi sitokinler ve büyüme faktörleri sorumludur. Özellikle epidermal rejenerasyonun hızlandırılmasındaki olağanüstü işlevi nedeniyle EGF salınımı keratinosit göçünü ve çoğalmasını uyarır [130], [131].



Şekil 2.8 MKH'ların keratinositlere farklılaşmasının temsili şeması

NKDM'de kök hücrelerin kondrositlere farklılaşması, hücre kültürü ortamının çeşitli biyoaktif bileşenler (Kartogenin ve Simvastatin gibi) ve büyüme faktörleri (TGF β ailesi, IGF-I, FGF, PDGF ve trombositten zengin plazma (PRP) ile desteklenir. TGF β 'nin MKH'lerde kondrojenezi desteklediği ve PDGF, kıkırdak onarımında hayati bir rol oynadığı bilinmektedir [132]. *Kondrojenizde* etkili olması için kıkırdak dokunun anabolik ve katabolik reaksiyonları da göz önünde bulundurulduğunda tedavi yaklaşımında kullanılan büyüme faktörleri NKDM çalışmalarının en can alıcı unsurlarından biridir ve bu yaklaşım ile biyofonksiyonel doku iskelesi üretimi son dönemde oldukça popülerdir. En genel olarak kondrojeniz sürecinin teşvikinden sorumlu olan büyüme faktörlerinden bazıları; TGF β ailesi (β 1, β 2, β 3), FGF ve BMP'dir. Kondrojeniz için TGF ailesinin TGF β 2 ve β 3'ün en güçlü olduğu bildirilmiştir [133]. MKH'ler 2-3 hafta içinde kondrojenik farklılaşmaya uğrar ve esas olarak tip II kollajen ve agrekan gibi kıkırdak-spesifik moleküllerden oluşan bol miktarda ekstraselüler matris üretirler.

Bu kıkırdak belirteçlerinin ekspresyonu, MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasının kanıtı olarak kullanılabilir [134].



Şekil 2.9 MKH'leri kondrositlere dönüştürmede yer alan farklı aşamaların özeti, Kısaltmalar: alkalın fosfataz (AP), kıkırdaktan türetilen retinoik asit duyarlı protein (CD-RAP), COL, kıkırdak oligomerik protein (COMP), matris metalloproteaz (MMP), VEGF [5]

2.4.3 Doku İskelesi

Cilt DM ve *Nazal KDM* başlıkları altında genel itibari ile kullanılan doku iskelelerinden bahsedilmiştir. Hem *Cilt DM*'inde hem de *NKDM*'de üretilen doku iskeleleri tıpkı diğer *DM* alanlarında üretilen doku iskeleleri gibi hücrelerin yerleştirilmesi, onların korunması, 3B doku oluşumunu desteklemek, dokuların oluşumu için çok önemli olan hücreler arası bağlantıların geliştirilmesi için kullanılır [135]. Doku iskeleleri vücuda yerleştirildiklerinde cerrahi operasyonlar sırasında şekillerini koruyabilmeli ve mekanik kısıtlamalara dayanabilmelidir. Daha doğrusu, işlem sırasında kırılmamalı, hedef dokuya uymalı ve vücuda herhangi bir mekanik hasar vermemelidir. Çok farklı biyomalzeme ve üretim yöntemi ile doku iskelesi yapmak mümkündür. Bu nedenle doku iskelesinin üretiminde kullanılan biyomalzemeler ve doku iskelesi üretim teknikleri olmak üzere iki başlık altında bunları inceleyeceğiz. Temelde *DM* ile yapılmak istenilen doku iskelelerin özellikleri aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir [136], [137].

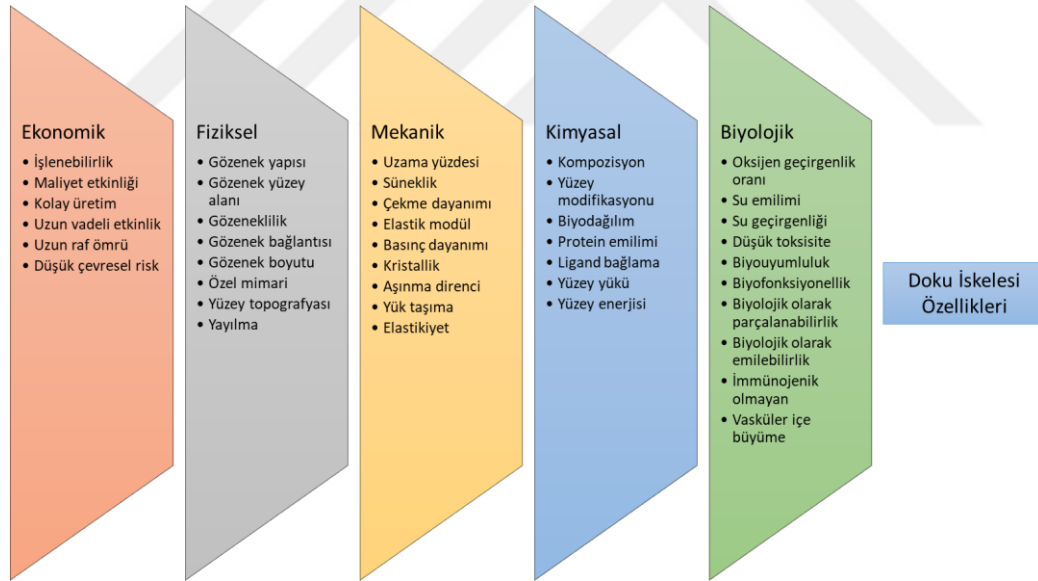
- *Biyouyumluluk*: Doku mühendisliği için herhangi bir doku iskelesinin ilk kriteri biyouyumlu olmasıdır. Hücreler yüzeye yapışmalı, normal şekilde çalışmalı ve sonunda doku iskelesinden geçerek yeni matris oluşturmada

önce çoğalmaya başlamalıdır. İmplantasyondan sonra, doku iskelesi veya doku mühendisliğiyle oluşturulan yapı, iyileşmeyi azaltabilecek veya vücut tarafından reddedilmesine neden olabilecek kadar şiddetli bir inflamatuvar yanıtı neden olmasını önlemek için ihmal edilebilir bir bağışıklık tepkisi uyandırmalıdır. Konakçıda herhangi yan etkiye veya olumsuzluğa neden olmamalıdır.

- *Biyobozunabilirlik:* Vücudun kendi hücrelerinin zamanla implante edilen doku iskelesi veya doku mühendisliğiyle oluşturulan yapıyı değiştirmesini sağlamaktır. Doku iskeleleri ve yapılar kalıcı implantlar olarak tasarlanmamıştır. Bu nedenle doku iskelesi, hücrelerin kendi hücre dışı matrislerini üretmelerine izin verecek şekilde biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır. Bu parçalanmanın yan ürünleri de toksik olmamalı ve diğer organlara müdahale etmeden vücuttan çıkabilmelidir. Parçalanmanın doku oluşumuyla birlikte gerçekleşmesine izin vermek için, makrofajlar gibi hücrelerin kontrollü infüzyonuyla birleştirilmiş bir inflamatuvar yanıt gereklidir. Bozunma hızı ile doku rejenerasyonu hızı birbirini karşılamalı ve bozunan ürünler herhangi bir yan etkiye neden olmamalıdır.
- *Antibakteriyel özellik:* Bakteriyel enfeksiyona neden olmamalı ve fiziksel bariyer sağlamalıdır.
- *İmmünojenik olmayan:* İmmünojenik tepkiye neden olmamalıdır.
- *Toksik olmayan:* Herhangi sitotoksositeye neden olmamalıdır.
- *Vasküler destekleyici:* Daha hızlı ve sağlıklı hücre çoğalması için kan temininin geçişini sağlamalıdır.
- *ECM'yi taklit edebilen:* ECM'yi yapısal, işlevsel ve biyolojik olarak taklit etmelidir.
- *3B yapı:* Hücrelerin içe doğru büyümesini, besin ve gazların hareketini kolaylaştırmalıdır.
- *İşlenebilirlik:* Farklı şekil ve boyutlarda işlenebilir olmalıdır.
- *Gözeneklilik:* Mekanik dayanıklılıktan ödün vermeden hücre yapışması, çoğalması ve yeniden damarlanması için yeterli alan sağlamalıdır. Birbirine bağlı gözeneklere sahip olmalıdır.
- *Aşındırıcılık:* Fizyolojik pH'ta parçalanmamalıdır.
- *Yüksek yüzey alanı hacim oranı:* Hücre-yüzey etkileşimlerine izin vermelidir.

- *Yüzey modifikasyonu:* Yapışma ve çoğalmayı artırmak için diğer biyomoleküler veya kimyasal gruplar ile modifiye edilebilir olmalıdır.
- *Sterilize edilebilirlik:* Toksik kontaminasyonu önlemek için Sterilize edilebilir olmalıdır.
- *Tekrarlanabilirlik:* Doku iskelesi yapısal ve boyutsal kararlılığını korumalıdır.
- *Mekanik özellikler:* Muadil olabilecek doku ile benzer mekanik özellikler göstermelidir ki canlı organizma koşullarında oluşan stres ve zorlanmaya dayanmalıdır.

Hazırlanan DM doku iskeleleri genellikle doğal dokuların heterojen yapısından farklı olan izotropik ve homojen yapılardır. İdeal olarak, DM üretilmiş doku iskeleleri, birbirine bağlı gözenekli bir yapıda, uygun biyomekanik özellikte, toksik olmayan, biyolojik olarak emilebilir, biyouyumlu ve biyobozunur olmalıdır. Doku iskelelerinin üretiminde dikkat edilmesi gereken özellikleri Şekil 2.10'da özetlenmiştir [137].



Şekil 2.10 Doku iskelelerinin üretiminde dikkat edilmesi gereken özellikleri

Doku iskelesinin mekanik kararlılığı, üç boyutlu yapıyı korumak için anahtardır. Genellikle yaklaşık 250-300 µm çapındaki büyük gözenekler, hücre göçünü, difüzyonunu ve çoğalmasını kolaylaştırarak moleküllerin, atık ürünlerin ve gazların yapıya kolayca yayılmasını sağlar [103]. Burun için üretilen doku iskelelerinin ideal parametreleri cerrahi bölgeye bağlı olarak değişse de çoğu durumda düz, mekanik olarak sağlam olması beklenir. Örneğin, septum kıkırdağı rinoplastide altın standart

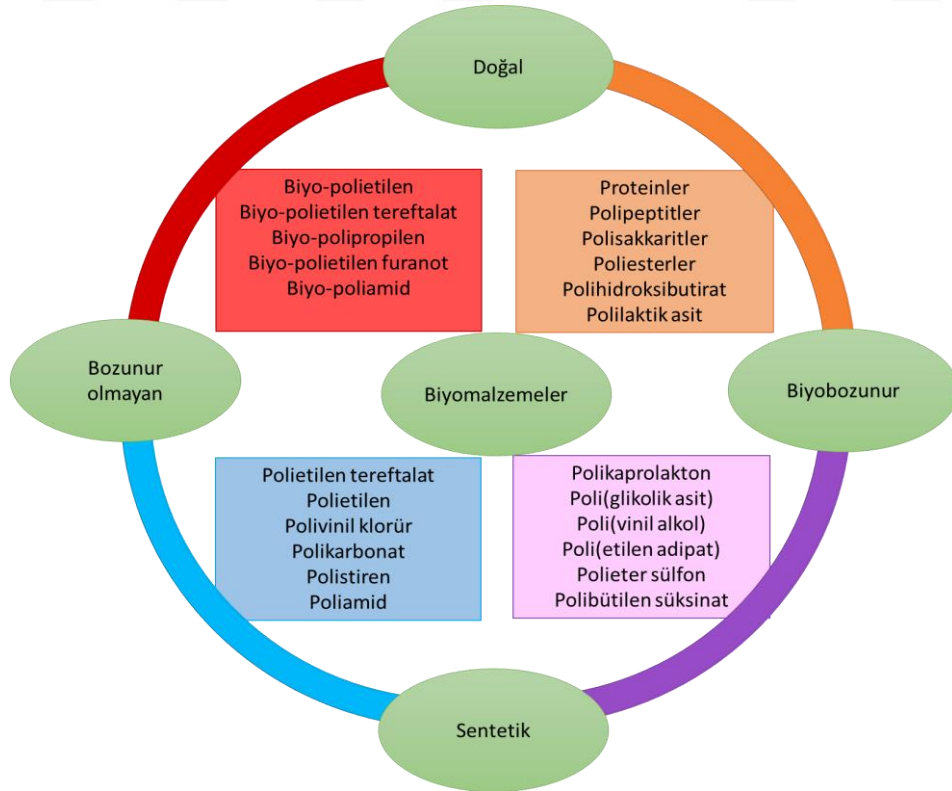
olarak kabul edilmiştir çünkü rinoplastide kullanılan greftlerin çoğu 25 mm'den kısa, 15 mm genişliğinde ve yaklaşık 1,5 mm kalınlığında olup uygun düzlük ve sertliğe sahiptir. Ancak revizyon rinoplastisinde ihtiyaç duyulan greftler 40 mm uzunluğunda ve mekanik olarak daha çeşitlidir. Daha karmaşık rekonstrüksiyonlar hem allotransplant kıkırdak hem de alından veya yanaktan alınan pediküllü deri flepleri gibi anatomik olmayan doku transferleri gerektirir ve bu da oluşturulan neokartilaje'ı büyük kuvvetlere maruz bırakabilir. Bu nedenle, NKDM ile oluşturulan greftler bu kuvvetlere dayanacak yeterli sertliğe, hatta belki de doğal değerlerden daha fazla sertliğe sahip olmalıdır. Burun kıkırdağı fleksiyon altında çekme kuvvetlerine maruz kaldığından, burun iskelelerinin çekme özelliklerinin doğal kıkırdak ile karşılaştırılması önemlidir [18].

Çift Katmanlı Doku İskelesi; Doku iskelesi geliştirilirken genellikle düzgün malzeme bileşimi ve yapısına sahip olan tek katmanlı yapılara odaklanılmaktadır. Ancak, tek katmanlı doku iskelelerin biyolojik ortamı yeterince taklit edemediği ve doku onarımı için optimum olmadığı öngörülmüştür. Bu nedenle, doğal dokuların (osteokondral, kutanöz, kemik, sinir, vasküler dokular ve mesane gibi) doğal çok katmanlı yapısından ilham alınarak, daha karmaşık çok katmanlı doku iskelelerinin DM için daha avantajlı olduğu bildirilmiştir. Çok katmanlı doku iskeleleri tek katmanlı doku iskeleleriyle karşılaştırıldığında, *in vivo* doku organizasyonunu daha iyi taklit ederler, mekanik destek ve optimum hücre büyümesi sağlarlar. Fiziksel ve biyokimyasal uyarılar sağlayarak hücreler için uygun biyo-ortam sağlayabilirler. Literatürde genellikle çok katmanlı dokular vasküler, kemik/kıkırdak, deri, periodontal, mesane ve trakea dokularına ait çift katmanlı doku iskeleleri alanındaki gelişmelere odaklanmıştır [138]. Fakat burun gibi çok katmanlı dokulara sahip organların çalışmaları neredeyse hiç yoktur [25]. Çift katmanlı doku iskelelerin kullanımı, katmanlı anatomik mimariye benzeyen iki veya daha fazla farklı bölgeyle dokuya özgü bir ortamın taklit edilmesine olanak tanır. Bu tür doku iskelelerin üretimi, bir veya daha fazla bileşenle, benzer veya farklı tekniklerle, ayrı ayrı üretilen iki doku iskelesinin nihai olarak bir araya getirilmesiyle gerçekleştirilebilir. Bu tür biyomimetik doku iskeleleri üretmek için çok sayıda üretim tekniği geliştirilmiştir [138].

2.4.3.1 Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyomalzeme; vücudun herhangi bir dokusunu, organını veya işlevini değerlendirmek, tedavi etmek veya değiştirmek için biyolojik sistemlerle arayüz oluşturmayı amaçlayan malzemedir [136]. Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), biyomalzemeyi “sentetik veya doğal kökenli, herhangi bir süre boyunca kullanılabilen, bireyin yaşam kalitesini korumak veya iyileştirmek için vücudun herhangi bir dokusunu, organını veya işlevini kısmen veya tamamen güçlendiren veya değiştiren, ilaçlar dışında herhangi bir madde veya madde kombinasyonu” olarak tanımlar [139].

Biyomalzemeler üzerine yapılan son çalışmalar, DM için yeni malzemeler geliştirmeyi veya mevcut malzeme bileşimini ve mikro yapıyı değiştirme yönündedir. Doku iskele malzemeleri genellikle belirli bir doku uygulaması için seçicidir yani o uygulamaya özel olabilir [140]. Çeşitli biyomalzemelerden ve çok sayıda teknik kullanılarak üretilen birçok doku iskelesi vücuttaki farklı dokuları ve organları yenileme girişimlerinde kullanılmıştır [141]. Şekil 2.11’de, farklı doku iskeleleri hazırlamak için kullanılan biyomalzemelerin kaynaklarına ve parçalanma özelliklerine göre sınıflandırılması gösterilmiştir [142].



Şekil 2.11 Doku iskelelerin hazırlanma aşamasında kullanılan biyomalzemelerin kaynaklarına ve biyolojik olarak parçalanabilirliklerine göre sınıflandırılması

Tipik olarak doku iskelesi üretiminde kullanılan seramikler, sentetik polimerler ve doğal polimerler, olmak üzere üç ayrı biyomalzeme grubu vardır. Bu biyomalzeme gruplarının her birinin belirli avantajları ve kısmen dezavantajları mevcuttur. Bu nedenle farklı fazlardan oluşan kompozit iskelelerin kullanımı giderek daha yaygın hale gelmektedir [136]. Seramik biyomalzemelerden (hidroksiapatit (HA) ve tri-kalsiyum fosfat (TCP) gibi) üretilen doku iskeleleri tipik olarak yüksek mekanik sertlik (Young modülü), çok düşük elastikiyet ve sert, kırılğan bir yüzey ile karakterize edilir. Sentetik polimer kökenli doku iskeleleri ise termal ve kimyasal kararlılık ile üstün fiziksel ve mekanik özellikler sunabilir [137]. Daha yüksek mekanik mukavemet, birbirine bağlı gözeneklilik, değişken yüzey kimyası ve dokuların yenilenmesi için belirgin geometriler sağlarlar [143]. Doğal polimerler, insan fizyolojisinde bulunan ECM ile benzerlik gösterdikleri için önemlidir. Çünkü doku iskelesinin yüzeyi hücre yüzeyine benzer olmalıdır [140]. Doğal polimerler kullanılarak üretilen doku iskeleleri, üstün hücre sinyalizasyonu, düşük toksisite, biyobozunabilirlik ve biyouyumluluk sunabilir. Ek olarak, karakteristik doku segmentleri gibi bir alt atomik mimariye sahip oldukları için vücut tarafından kolayca algılanabilirler [141]. Doğal polimerler, sentetik polimerlere kıyasla üstün yapısal organizasyona sahip olduğundan dokunun içe doğru büyümesi ve hücrelerin canlılığı açısından benzersiz bir avantaj sağlar. Sentetik polimerler ise doku iyileşmesine yol açan hücresel yapışmayı ve çoğalmayı uyarabilen biyolojik göstergelere sahip değildir. Bununla birlikte, doğal polimerlerin aksine sentetik polimerler, mikroskobik düzeyde geniş yapısal organizasyon ile çeşitli şekillerde kolayca işlenebilir ve kalıplanabilir. Sentetik polimerler; su, radyasyon (UV/IR), pH, sıcaklık gibi uyaranlara olan yüksek duyarlılığı nedeniyle farklı üretim koşullarında doku iskelesi elde edilebilir [137]. Öte yandan, çeşitli enzimatik ve kimyasal mekanizmalar ile konjuge olan doğal-sentetik polimer kompleksleri ile çok sayıda fonksiyonel grup kolayca elde edilebilir. Bu, istenen özelliklere ve özelleştirilebilir yapıya sahip geniş yelpazede doğal ya da sentetik polimer bazlı doku iskeleleri üretmenin yolunu sağlayabilir [144].

Tablo 2.2 Doku iskelesi imalatında kullanılan biyomalzeme çeşitleri [145]

Biyomalzeme türü	Örnekler	Özellikleri	Kullanım alanları
Doğal polimerler	Kolajen, jelatin, hiyalüronik asit, kitosan, fibrin, ipek, aljinat	Biyouyumlu, biyobozunur, Hücrelerin yayılma ve yapışma özelliklerinde iyi, zayıf mekanik özellikleri	Cilt, kırık, kemik damar, kalp DM vb. çalışmalarında
Sentetik polimerler	PCL, PVA, PEO, PLA	Biyouyumlu, Hücre tanıma da eksiklik, yüksek mekanik mukavemet	Cilt, kırık, kemik tendon, karaciğer, mesane DM vb. çalışmalarında
Seramikler	Hidroksiapatit, TCP	Biyoinert, tekrar emilebilir, düşük tokluk ve yüksek aşınma direnci	Diş, kemik DM vb. çalışmalarında
Kompozitler	Jelatin/PCL, Kolajen/kitosan, PLA/TCP	Biyouyumlu, biyobozunur, Hücrelerin yayılma ve yapışma özelliklerinde iyi, yüksek mekanik mukavemet	Cilt, kırık, kemik, damar DM vb. çalışmalarında
Metaller	Titanyum, Paslanmaz çelik	Sünek, aşınabilir, yoğun ve çok güçlü	Diş, yük taşıyan kemik implantları vb.
Hücreleştirilmiş doku parçası	Kadavra dokularından kolajen vb.	Basit ve ekonomik doku iskelesi, doku mimarisinin orijinali korunur, önemli ölçüde hücre davranışlar sergiler	Mesane, kalp kapakçıkları, sinir, karaciğer vb.

Cilt DM için doku iskeleleri genellikle elektro eğirme metodu kullanılarak hazırlanır. Son derece biyouyumlu kolajen, jelatin, keratin, fibrin, aljinat, selüloz, elastin, kitosan gibi doğal biyomalzemelerin kullanıldığı literatürdeki çalışmalardan görülmektedir. Poli (etilen glikol-tereftalat) (PEGT), poli (bütilen

tereftalat) (PBT), poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA), PCL, hidroksietil selüloz (HEC), poli (DL -laktit) sentetik polimerlerin kullanıldığı da bildirilmiştir. Ayrıca bunların kompozitlerinden de oldukça yoğun çalışmalar vardır [107], [105]. Son dönemde yapılan çalışmalarda, yumuşak doku mühendisliğindeki uygulamalar için biyoseramik (genellikle biyoaktif cam) polimer bazlı doku iskelelerin kullanımı araştırılmıştır [146].

NKDM için doku iskelesi üretiminde en çok kullanılan biyomalzeme PCL'dir, bunu aljinat, kolajen, fibrin, elastin, hialuronik asit veya jelatin gibi doğal biyomalzemeler takip eder [3]. Literatürdeki güncel çalışmalar *Burun Kıkırdağı Doku Mühendisliğinde Güncel Uygulamalar* başlığı altında ve Tablo 2.5'de detaylı olarak verilmiştir.

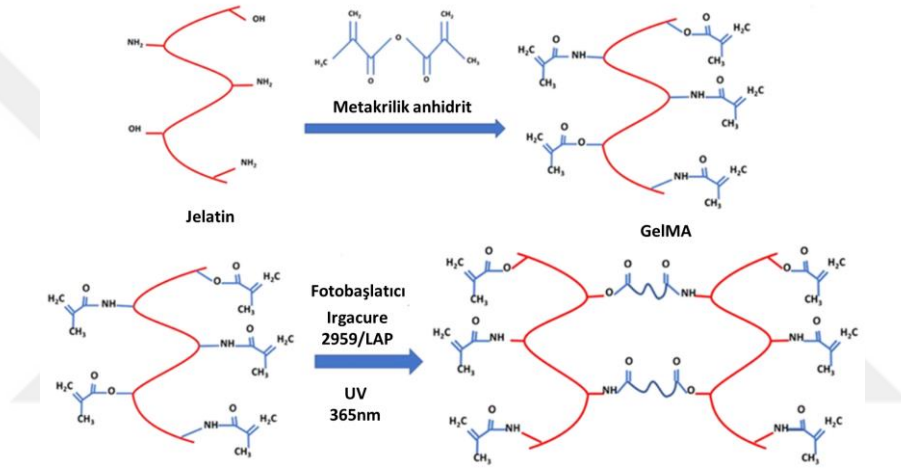
- **Doğal Biyomalzemeler**

Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilen doğal biyomalzemeler, benzersiz ancak karmaşık bileşenler, mikro yapılar ve fizyolojik özellikler açısından büyük bir çeşitlilik sergiler. Bu tür malzemeler, doğal ortamlarında çeşitli işlevlere sahip hücre bağlanması ve büyümesi için uygun biyolojik destek sunabilirler. ECM'nin 3B hiyerarşik mikro yapısı ve elektromekanik yapısı, hücre yüzey reseptörleriyle etkileşime girip büyüme faktörlerini ve diğer sinyal moleküllerine bağlanabilir. Böylece taşıma özelliklerinde, hücresel iletişimde, mekanotransdüksiyonda ve büyüme faktörü sinyallemede önemli bir rol oynayabilirler [147]. DM'de yaygın kullanılan doğal biyomalzemeler; biopolyester bazlı PLA ve polihidroksialkanoat (PHA), polisakkaritler (hialuronik asit (HA), aljinat, selüloz ve kitosan gibi), proteinler (kolajen, jelatin, fibroin, poli-glutamik asitler (PGA) gibi) ve antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) dir. Ayrıca 3B basımda doğal biyomalzemelerin metakrilatlanmış halleri fotokürlenebilen özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir. hialuronik asit metakrilat (HAMA), GelMA, pektin metakrilat (PECMA), ipek fibroin metakrilat (SilMA) sadece birkaç örneğidir [148].

GelMA; hidrofilik bir polimerdir. 3B basımda, basılabilirlik, biyoyumluluk ve biyobozunabilirlik gibi özellikleri nedeniyle en çok tercih edilen fotokürlenebilen biyomalzemedir [149], [150]. Bu sentez, jelatinin amino grupları ve metakrilik anhidrit (MAA) metakriloil gruplarının değişimi yoluyla gerçekleşir. Çok yönlü bir

biyopolimer olan jelatin, genellikle sığır, kümes hayvanları ve balıktan üretilir. Sığır ve domuz jelatinleri, GelMA sentezi için yaygın olarak kullanılır [151]. Bu nedenle, GelMA, A tipi veya B tipi jelatinden türetilmesine göre iki türe ayrılabilir. GelMA, MAA metakriloil gruplarının (metakrilamid, metakrilat grupları) jelatin amino grupları (lizin ve hidroksil lizin) reaksiyonu sonucu metakrilamid ile modifiye edilmiş jelatin/jelatin metakrilat oluşur. Tanımlanmış iki farklı yöntem ile sentezi yapılabilir. Bunlardan ilki ve geleneksel kabul edileni jelatinin 50°C'de PBS (pH 7,5) içinde çözündürülerek MAA ile reaksiyona sokulmasıdır. Diğeri ise jelatinin 50°C'de karbonat bikarbonat tamponunda (CB tamponu pH 9) çözündürülerek MAA ile reaksiyonudur [152]. Fotopolimerizasyon, termal jelleşme veya redoks reaksiyonu, GelMA hidrojellerini çapraz bağlamak için yaygın kullanılan yöntemlerdir [152]. Yapısında metakriloil gruplarının bulunması nedeniyle fotobaşlatıcı eklendiğinde UV ışığı altında fotoçapraz bağlanma yeteneği kazanan GelMA hidrojelleri, jelatinin başlıca avantajları olan MMP, arginin-glisin-aspartik asit (RGD) dizilerinin varlığını, biyoyumluluğu ve biyobozunurluğunu korur. Ayrıca jelatinden farklı olarak vücut sıcaklığında stabilitesini ve şeklini koruma avantajına sahiptir [153], [154]. Fotopolimerizasyon ile GelMA hidrojellerin doğal biyoaktivitesini kaybetmeden kolayca hazırlanması ve mekanik olarak modifiye edilmesi sağlanabilir. Genellikle lityum fenil-2,4,6-trimetil-benzoil fosfinat (LAP) ve 2-hidroksi-4'-(2-hidroksietil)-2-metilpropiofenon (Irgacure-2959) gibi suda çözünen fotobaşlatıcılar fotopolimerizasyon için kullanılır. Serbest radikallerin salınması üzerine fotopolimerizasyonu başlatır [152]. LAP, 370-405 nm dalga boyundaki görünür ışıkla uyarıldığında bağ kopmasıyla serbest radikaller oluşturur [155]. LAP'ın düşük çapraz bağlama süresi nedeniyle biyolojik uygulamalar için daha uygun olduğu ve hücre toksisitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Irgacure-2959, 276-365 nm dalga boyundaki UV ışığı ile uyarıldığında bağ kopmasıyla serbest radikaller oluşturur. En büyük dezavantajı UV ışığına maruz kalma esnasında oksijenle reaksiyona girerek reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini tetiklemesidir. Bu durum oksidatif DNA hasarına neden olabilir, böylece mutajen olabilir ve hücre ölümüne yol açabilir [156]. Biyoyumlu GelMA hidrojelleri, hücreler için bir ECM ortamı sağlayarak doku onarımına katkıda bulunur.

GelMA'nın metakrilatlanma derecesi (DS); gözeneklilik, şişme ve bozunma ve mekanik sertlik gibi özelliklerini doğrudan etkiler. GelMA'nın genel DS'si %30-100 arasındadır. GelMA DS, kullanılan jelatin ve MAA konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. DS, $^1\text{H-NMR}$ ile metakrilik fonksiyonel gruba karşılık gelen spektral tepe entegrasyonu ile belirlenir. Sonuçlar jelatin ile karşılaştırılır ve gram protein başına metakrilik grubun mol sayısı olarak hesaplanır. Fakat bu yöntem tek başına GelMA'daki kesin amin içeriği bilinmediği için yeterli değildir. GelMA hidrojelindeki amin içeriğini ölçmek için bir kolorimetrik yöntem olan 2,4,6-trinitrobenzen-sülfonik asit (TNBS) kullanılır. Jelatin konsantrasyonu ve amino grubu konsantrasyonu standart bir glisin eğrisi çizilerek belirlenebilir [157], [158].



Şekil 2.12 GelMA'nın kimyasal yapısı [152]

Kolajen; İnsan vücudundaki proteinin %25 ila %35'ini oluşturan biyolojik bir makromolekül olan kolajen hem omurgasız hem de omurgalı organizmalarda en çok bulunan memeli proteindir. Biyolojik dokuların ECM'sinin temel yapısal lifli proteindir. Kolajen, cildin dermisi gibi çoğu içi boş organ da lifli bağ dokularında ve kıkırdakta bol miktarda bulunur. Dokulara ve organlara çekme mukavemeti ve esneklik sağlayarak temel yapısal rol oynar. Şu ana kadar en az 29 tip kolajen tanımlanmış ve öncelikle yapılarına göre sınıflandırılmıştır. Vücuttaki kolajenin %90'ından fazlası tip I iken, diğer yaygın kolajen tipleri arasında tip II, III ve IV bulunur [159]. Tip I kolajen, çoğu bağ dokusunun, özellikle cildin, tendonların ve kemiğin ana bileşenini oluştururken, Tip II kolajen kıkırdakta ve Tip III kolajen kan damarlarında bulunur. Hücre büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını da düzenler. Bu nedenle, osteoblastlar, kondrositler ve fibroblastlar gibi birçok hücre bu proteini sentezleme ve salgılama yeteneğine sahiptir. Kolajenler, üç polipeptit

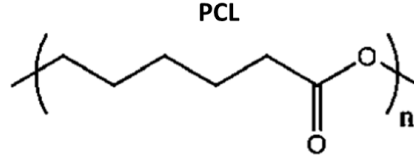
zincirinden oluşan trimerik moleküllerdir, karakteristik bir üçlü sarmal yapıya sahiptir. α -zincirleri en az bir tekrarlayan diziden oluşur – $[\text{Gly-X-Y}]_n$, burada X ve Y genellikle sırasıyla prolin ve hidroksiprolindir [120]. Kolajenin arzu edirliliği ve biyomalzeme olarak çeşitli alanlarda geniş uygulanabilirliği esas olarak biyoyumluluk, biyobozunabilirlik, kolay bulunabilirlik ve yüksek çok yönlülük gibi muazzam özelliklerine bağlıdır [159]. Tek başına kolajen kullanılarak hazırlanan doku iskeleleri biyoyumlulukları iyi ama zayıf mekanik özellikler, kısa bozunma özellikleri ve yüksek maliyetleri nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Bundan dolayı yaygın olarak biyobozunur doğal ve sentetik polimerler ile birlikte kullanılır. Böylece DM alanı için biyoyumlu ve mekanik olarak kararlı biyomalzemelerin elde edilmesini sağlanmış olur [120].

- **Sentetik Biyomalzemeler**

DM’de doku iskelesi üretiminde yaygın olarak araştırılan sentetik polimerler PCL, PVA, PEO, PLA, PGA, poligliserol sebasat ve poliüretanlardır. Bireysel polimerlerin özellikleri, yan zincirlerin düzenlenmesi de dahil olmak üzere ilgili bileşimleri ve moleküler mimarileri tarafından belirlenir. Polimerlerin biyobozunurluğu, zincir uzunluğu, dallanma derecesi ve kristalinite gibi özellikler tarafından yönlendirilir [160].

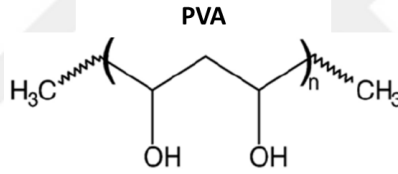
PCL, alifatik doğrusal bir polyesterdir. Biyoyumlu, biyolojik olarak emilebilir ve düşük maliyetli bir sentetik polimerdir. PCL’in T_m değeri literatürde kesin bir şekilde sabittir ve 60-70°C arasındadır [161]. Yarı kristalin ve hidrofobik yapısı nedeniyle çok yavaş bozunma hızı (başlangıç moleküler ağırlığına bağlı olarak 2-4 yıl) gösterir ve çeşitli uygulamalar için uygun mekanik özelliklere sahiptir. FDA tarafından onaylanmış bir malzemedir ve 1980’lerden beri yavaş salınımlı ilaç verme cihazı ve dikiş malzemesi olarak klinik olarak kullanılmaktadır. PGA, PLA ve çeşitli kopolimer sentezleri gibi diğer alifatik doğrusal polyesterlerle karşılaştırıldığında, PCL’in bazı belirgin fiziksel özellikleri vardır. Bunlardan ilki, PCL’nin PLA’da (PDLA, PLLA ve PDLLA) olduğu gibi izomerleri yoktur. Buna uygun olarak PLA varyantlarının biyolojik bozunma ve erime noktaları farklıdır. PCL’nin erime noktası PLA, PGA ve tüm değişken kombinasyonlardan önemli ölçüde daha düşüktür ve bu büyük olasılıkla PGA ve PLA’nın PCL ile karşılaştırıldığında daha büyük polaritesi ve hidrojen bağı oluşturma potansiyelinin bir yansımasıdır. PCL ayrıca çok çeşitli doku iskelesi üretim teknolojilerinden

oluşturulmasına olanak tanıyan bazı reolojik ve viskoelastik özelliklere sahiptir. PCL ve kopolimerleri, kısmen düşük erime sıcaklığı, çok iyi karışım uyumluluğu, FDA onayı ve düşük maliyeti nedeniyle elektro-eğirme, faz ayırma, katı serbest form üretim, 3B basım ve elektrospreyleme gibi yöntemlerde başarıyla kullanıldığı rapor edilmiştir [162].



Şekil 2.13 PCL'in kimyasal yapısı [162]

PVA; hidroliz reaksiyonu ile polivinil asetatın elde edilebilen yarı kristalin suda çözünür bir polihidroksi polimeridir. Düşük maliyet, hücrelerle uyumluluk, doğası gereği oldukça elastik olma ve eklem kırıkdağıyla eşleşen çekme mukavemeti gibi özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılırlar [163].



Şekil 2.14 PVA'nın kimyasal yapısı [164]

2.4.3.2 Doku İskelesi Üretim Teknikleri

DM'de son yirmi yılda meydana gelen önemli gelişmelerin hepsi ideal doku iskelesi bulma yolculuğunda ideal üretim metotlarını belirleme çabasıyla gerçekleşmiştir. Böylece biyolojik ortama bağlı olarak çok yönlü performans gösterebilen doku iskeleleri, biyomalzemelerin modifikasyonu, katman katman biriktirilmesi, yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesi (birden fazla ilaç veya hücre bağlanması) gibi özgüllük kazandırılan yapılar olarak günümüzde evrimleşmiştir [165].

Daha öncede belirttiğimiz gibi doku iskelenin hedef dokuyu taklit etmek için gereken özel gereksinimlere göre (özellikle kimyasal ve yapısal benzerliklere sahip matris bileşimi açısından), uygun üretim tekniğinin seçilmesi çok önemlidir. Doku iskelelerinin üretim teknikleri şekil, gözeneklilik ve mekanik özellikleri dikkate alınarak seçilir. Tablo 2.3'de bu üretim teknikleri özetlenmiştir [139], [138].

Çift katmanlı doku iskelesi üretiminde her katman geleneksel veya gelişmiş üretim yöntemleri adı verilen iki ayrı kategoride hazırlanabilir. Geleneksel üretim yöntemleri; Solvent casting/particle leaching (Döküm/partikül süzme), dondurarak kurutma, faz ayırma, elektro-eğirme yöntemleridir. Gelişmiş üretim yöntemlerinde ise 3B baskı ve 3B biyobaskı yöntemleridir [138].

Biyomimetik tasarıma izin veren çift katmanlı doku iskelesi yaklaşımı, hücre-malzeme etkileşimini hedefler ve özel doku iskeleleri üretmek için en uygun biyomalzemeleri belirler. Son zamanlarda, çift katmanlı doku iskelesi üretimi için 3B baskı ve elektro-eğirme tekniklerini birleştirerek hidrojel/nanofiber kompozitlerinin üzerine çalışmalar yapılmıştır. Hidrojel/nanofiber çift katmanlı doku iskeleleri için farklı hazırlama metotları vardır. Bunlardan en temel beş tanesi aşağıda sıralanmıştır [28].

- Elektro-eğrilmiş nanofiberlerle lamine edilmiş hidrojeller,
- Hidrojel solüsyonu içerisine elektro-eğrilmiş nanofiberlerin katkısı ile hazırlanmış nanofibröz hidrojeller,
- Hidrojel solüsyonu içerisine koaksiyel elektro-eğrilmiş nanofiberlerin katkısı ile hazırlanmış nanofibröz hidrojeller,
- Koaksiyel elektro-eğirme ve elektrospreyleme üretilmiş nanofiberlerin katkısı ile hazırlanmış nanofibröz hidrojeller,
- 3B basım ile hazırlanmış hidrojel ve elektro-eğrilmiş nanofiberlerin kombinasyonu; bu yöntemin amacı, 3B baskı teknolojisiyle üretilen hidrojel yapıları üzerinde elektro-eğirme yoluyla çok katmanlı nanofiberler üretmektir. Böylece, bu kompozit yapıdaki hidrojel belirli bir sertlik ve geometriye göre 3B olarak basılır. Hidrojeller güçlü su emme ve genleşme özelliklerini koruyabilir fakat, doğal biyomalzemelerden 3B yazdırılmış yapılar deformasyona eğilimlidir ve kullanım için iyi bir mekanik destek sağlamaz, bu yüzden mekanik dayanımı destek olabilmek için nanofiberler ile hazırlanan bir kompozit yapı daha faydalı olabilir. Nanofiberler yüksek yüzey-hacim oranına sahiptir. Hücre penetrasyonunu ve besin alışverişini destekleyebilir [29], [30].

Tablo 2.3 Doku mühendisliği uygulamaları için farklı doku iskelesi üretim tekniklerinin avantajları ve dezavantajları [139], [138]

Teknik	Avantajları	Dezavantajları
Döküm/partikül süzme	Yüksek gözeneklilik (%50-90), Kontrollü ve ayarlanabilir gözenek boyutu ve yapısı, Kolay işlenebilir ve düşük maliyetli	Düşük gözenek bağlantısı, Organik çözücülerin kullanımı, Yüksek enerji ve zaman alıcı, İnce membranlarla sınırlıdır (<3 mm)
Kendi kendine montaj	%80-90 gözeneklilik, %70-90 hücre canlılığı, 5-300 nm	Peptit kullanımı, Karmaşık işlem, Ölçeklenebilir değil, Lif boyutu üzerinde zayıf kontrol
Gaz Köpürtme	Çözücü içermez, Doku iskele matrisinde biyoaktif bileşen kaybı olmaz	Yüksek basınç, Gözenekliliğin zayıf bir şekilde birbirine bağlanmasına, Doku iskele yüzeyinde yüzeysel film tabakalarının varlığına ihtiyaç duyar
Hücreleştirilmiş doku parçası doku iskelesi	Hücrelere destek sağlama yeteneği, Nispeten iyi biyouyumluluk, Zayıf bağışıklık tepkisi, Bol miktarda biyoaktif bileşen	Kaliteli greftler elde etme zorunluluğu, Uzun hücreleştirme protokolleri, Hücreleştirme sırasında kullanılan toksik ajanların bulunma riski
Dondurarak kurutma	Yüksek gözeneklilik (>%90) ve birbirine bağlanabilirlik, Hücre canlılığı <%90, Gözenekli ağı yüksek düzeyde birbirine bağlılığı, Ayarlanabilir gözenek boyutu ve yapısı, Biyoaktif bileşenler entegre edilebilir, Yüksek sıcaklıkların önlenmesi yeteneği,	İskele gözenekliliği ve morfolojisinin zayıf kontrolü, Organik çözücülerin kullanımı, Yüksek enerji ve zaman alıcı, Uzun işlem süresi

Tablo 2.3 Doku mühendisliği uygulamaları için farklı doku iskelesi üretim tekniklerinin avantajları ve dezavantajları [139], [138] (devamı)

Teknik	Avantajları	Dezavantajları
Faz ayırma	Kontrollü ve ayarlanabilir gözenek boyutu ve yapısı, %60-95 gözeneklilik, Diğer tekniklerle kolayca birleştirilebilir, Biyoaktif bileşenler entegre edilebilir, Yüksek sıcaklıkların önlenmesi yeteneği,	Çok az sayıda polimer aralığıyla sınırlıdır, Organik çözücülerin kullanımı, Zayıf kontrol iskelesi morfolojisi,
Elektro-eğirme	Geniş polimer yelpazesi, Lifleri ayarlamak için kontrol edilebilir işlem parametreleri, %80-95 gözeneklilik, 100-1100 nm lif çapı, <%80 hücre canlılığı, Geniş yüzey alanı/hacim, Homojen, hizalanmış lif, gözenekliliğin güçlü bir şekilde birbirine bağlanması, Basit ve düşük maliyetli,	Çoğunlukla 2B–3B doku iskelesi üretmekle sınırlıdır, Gözenek boyutu ve şeklinin zayıf kontrolü, Yüksek voltajlı cihazlara ihtiyaç vardır, Kullanılan çözücüler toksik olabilir,
3B Baskı	Yüksek çözünürlüklü karmaşık 3B şekiller, Gözeneklilik ve gözenek boyutunun bağımsız kontrolü, Geniş polimer yelpazesi	Zaman alıcı katman katman işleme
3B Biyobaskı	Karmaşık şekillerin yüksek doğrulukla çalışılması, Yüksek baskı hızı, Yüksek hücre canlılığı (80/90%) ile hücreleri iskeleye dahil etmek için uygundur	Yüksek maliyet

- **3B Basım**

Eklemeli üretim (AM) veya katmanlı üretim olarak da tanımlanan 3B basım ISO standardına göre (ISO 52900), “Ardışık katmanların veya birimlerin bir model oluşturmak için eklemeli teknikler kullanan üretim süreci” şeklinde tanımlanır [166]. 3B baskı, bilgisayar destekli yazılım (CAD) programları ile tasarlanan herhangi bir 3B verinin, ilgili ana malzemeler (katı, sıvı veya toz olabilir) kullanılarak bir yazıcı ile katmanlar halinde basılması işlemidir [166], [167].

Baskı işleminin temeli aşağıda sıralanan adımlardan oluşur [166], [167];

- Modelleme; genellikle, üretilecek parçanın bilgisayar destekli (CAD) yazılımlar kullanılarak 3B modellenmesi yapılır ve üretilecek parça bilgisayarda prototiplenmiş olur.
- Dilimleme; prototipleme adımından sonra parçanın modeli yazdırılarak katmanlara dilimlenir. Bu işlem için çizilen modelin bir STL dosyasına dönüştürülmesi gerekir. “Stereolitografi dili” anlamına gelen ve “STL” olarak kısaltılan dosya formatı, 3B tasarlanmış modellerin yüzeylerinin matematiksel bir düzende birçok üçgene bölünmesiyle elde edilir. Bu format ile birçok üçgen olarak tanımlanan yüzeyin adım adım yazım işlemi gerçekleştirilmiş olur. Bunun dışında “Eklemeli Üretim Dosya” biçimi anlamına gelen “AMF” de kullanılabilir [168].
- G-kodu oluşturma; Cihaz içerisinde yönlendirme ve eklemeli imalar ekipmanları tarafından G-kod üretilir. G-kodu (G-kodları ya da RS-274) birçok çeşidi olan nümerik kontrol amaçlı kullanılan bir programlama dilidir. Genellikle otomatik makine parçalarını kontrol etmek için bilgisayar destekli üretimde kullanılır. G-kodu sık sık G programlama dili olarak da kullanılır. G programlama dili temel olarak kesici takıma ya da parçaya ne yapması gerektiğini belirtir.
- Üretim; baskı adımında, katman üzerine katman eklenerek nesne üretilir. Böylece üretim katmanlı bir yapıda gerçekleşmiş olur.

3B basım yöntemlerinin geleneksel yöntemlere göre bazı avantajları mevcuttur. Bunlardan ilki aylarca süren prototipleme, kalıplama ve üretim gibi uzun süren süreçlerin 3B basım yöntemi ile birkaç gün veya saate düşürerek zamandan ve maliyetten tasarruf sağlanabilir. İkinci olarak, geleneksel yöntemlerle üretilmesi

imkânsız olan geometrik ve yapısal karmaşıklığa sahip parçaların üretimi mümkün olduğundan tasarım özgürlüğü sağlayabilir [167]. Üçüncüsü, istenilen şekilde tasarlanmış parçaların aynı anda biyomalzemeleri, büyüme faktörlerini ve hücreleri kullanarak benzersiz bozunma oranlarına, gelişmiş hücre farklılaşmasına, belirli biyolojik ipuçlarına ve doku iskelesinin ömrü boyunca mükemmel biyomekanik özellikler gösteren kompozitler oluşturma yetenekleri sağlayabilir [165].

3B basım yöntemi son on yılda DM çalışmalarında büyük ilgi görmektedir. CAD teknolojisi ile seramik, plastik, metal, polimerik sıvı malzemeler katman katman basım yapılarak karmaşık yapılara sahip malzemeler üretilebilir. Birçok farklı 3B basım teknolojileri vardır [138]. Çözüm, ilke ve uygulama açısından çok farklı olsalar da, teknolojiler arasında önemli işlevsel ortaklıklar mevcuttur [166]. Tablo 2.4’de günümüzde kullanılan 3B baskı teknolojileri özetlenmiştir.

Tablo 2.4 3B baskı teknolojileri ve kullanılan malzemeler [169]

	İşlem Adı	İlke
Ekstrüzyon Baskı	Erimiş Biriktirme Modellemesi (FDM)	Termoplastik bir malzeme eritilerek platformuna yerleştirilir katman katman yapı ve nesne oluşturulur. Malzemeler: akrilonitril bütadien stiren (ABS), polilaktik asit (PLA), naylon.
	Biyobasım	Biyolojik malzemeler basınç altında bir nozuldan ekstrüde edilerek, doku iskelesi inşa edilene kadar ardışık katmanlar halinde malzemeleri katman katman oluşturur. Malzemeler: aljinat, kitosan, jelatin, kolajen, fibrin.
Malzeme Sinterleme	Seçici Lazer Sinterleme (SLS)	Yüksek güçlü bir lazer ışını, toz halindeki malzemeleri katman katman birleştirerek bir nesne oluşturur. Malzemeler: naylon, poliamid.
	Elektron Işını Üretimi (EBM)	EBM, SLS'ye benzerdir; ancak toz parçacıklarını eritmek için yüksek güçlü elektron demeti kullanılır. Malzemeler: titanyum, kobalt-krom alaşımı.

Tablo 2.4 3B baskı teknolojileri ve kullanılan malzemeler [169] (devamı)

	İşlem Adı	İlke
Malzeme Sinterleme	Stereolitografi (SLA)	UV lazer ışını, fotopolimer reçineyi katmanlar halinde sertleştirir. Her katman katılaştırılıp bir sonrakinin üzerine gelerek nesne oluşturulur. Malzemeler: fotopolimerler.
	Sürekli Sıvı Arayüz Üretimi (CLIP)	CLIP, SLA'ya benzerdir; ancak UV ışını reçinenin alt kısmındaki şeffaf bir pencereden geçirilir ve yapı platformu 3B yazdırılmış nesneyi tutarak yukarı doğru yükselir. Malzemeler: fotopolimerler.
Malzeme Bağlama	Bağlayıcı Püskürtme/Mürekkep Püskürtme	Son nesne oluşana kadar, sıvı bağlayıcı malzeme toz yatağına toz-bağlayıcı sıvı-tozun alternatif katmanları halinde seçici olarak bırakılır. Malzemeler: nişasta veya alçı (toz yatak) ve su (bağlayıcı madde)
	Çok jet	Polyjet baskı, mürekkep püskürtmeli baskıya benzer; ancak bağlayıcı maddeler yerine, fotopolimer sıvısı katmanlar halinde yapı platformuna püskürtülür ve UV ışığı kullanılarak anında kürlenir. Malzemeler: polipropilen, polistiren, polikarbonat.
Laminasyon	Lamine Nesne Üretimi (LOM)	Yapıştırıcı ile kaplanmış malzeme katmanları sırayla birbirine yapıştırılır ve lazer kullanılarak istenilen şekillerde kesilir. Malzemeler: ince kağıt levhalar, polivinil kaprolaktam (PVC) plastik veya metal laminatlar

Amerikan Test ve Malzeme Topluluğu'nun (ASTM) standart sınıflandırmasına göre, yedi temel 3B baskı tekniği vardır [168]. Bunlar: malzeme püskürtme, malzeme ekstrüzyonu, bağlayıcı püskürtme, kuvvet fotopolimerizasyonu, toz yatak füzyonu, levha laminasyonu ve yönlendirilmiş enerji biriktirme teknikleridir. Her bir 3B baskı tekniğinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır ve uygun bir 3B baskı tekniğinin seçimi büyük ölçüde amaçlanan uygulamaya bağlıdır.

Küvet fotopolimerizasyonu, parça karmaşıklığı ve şekil doğruluğu açısından en yüksek standartlara ulaşabilen 3B teknolojiler grubudur [170]. %16,52'lik bir oranla

üçüncü en yaygın kullanılan 3B baskı tekniğidir. Bu teknik, kemik, kırık, sinir, karaciğer ve deri gibi çeşitli dokuların yanı sıra çeşitli tıbbi cihazlar üretmek için de kullanılabilir [32].

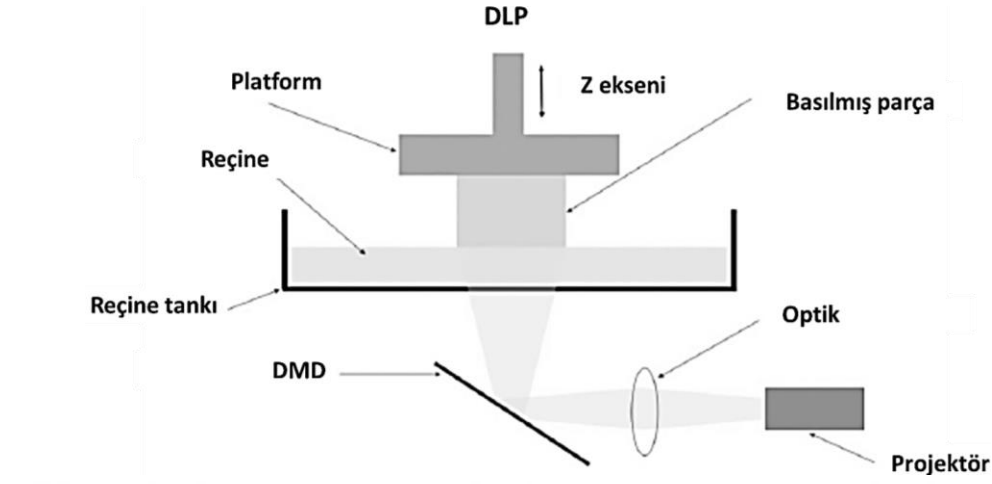
Fotopolimerizasyon sürecinin başlangıç malzemeleri

- UV ile kürlenebilen monomer/oligomer veya bunların farklı karışımları olan çapraz bağlanabilen reaktifler,
- Işık kaynağının etkisi altında fotodegradasyona uğrayan bir başlatıcıdır.

Küvet fotopolimerizasyonu işlemlerinde en yaygın kullanılan iki ana malzeme ailesi vardır. Bunlar akrilik ve metakrilik bazlı reçinelerdir. Her aile farklı bir polimerizasyon sürecine dayanır. Akrilik ve metakrilik bazlı reçineler ışıkla etkileşimin sonucunda zayıf bağların homolizi yoluyla serbest radikal fotopolimerizasyonuna dayanır [170]. Doğal ya da sentetik polimerler, seramikler ve metaller reçine olarak kullanılabilir. Bu baskı yönteminde, istenen ürünün 3B parçalarını elde etmek için serbest radikal fotopolimerizasyon sürecini başlatmak üzere yüzeye bir ışık kaynağı yansıtıldığında fotokürlenebilir reçine seçici olarak çapraz bağlanır [32]. Küvet fotopolimerizasyon süreci, ışık kaynağının konumuna bağlı olarak yukarıdan aşağıya veya aşağıdan yukarıya olarak kategorize edilebilir ve iki ana gruba ayrılabilir: stereolitografi (SLA) ve DLP.

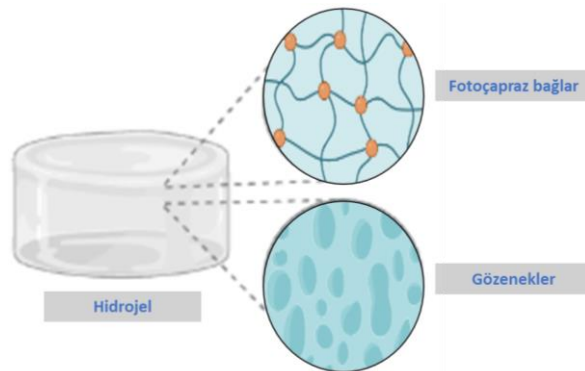
DLP, SLA'nın gelişmiş bir versiyonudur. Fotopolimer reçinelerinin katman katman kürlenmesi ilkesine dayanır [171]. Bir ışık kaynağından yansıyan ışık ile aynı anda 2B görüntüsü küvete yansıtmak ve katmanların kürlenmesi için dijital mikro ayna aygıtı (DMD) kullanır. Kaldırma modülü, basılı katmanı konumundan uzaklaştırır ve reçine bir sonraki katmanı yazım için hızla doldurulur. Böylece 3B nesnelerin istiflenmesi kolaylaşır [172]. DLP ile önemli ölçüde daha hızlı üretim elde edilir. Bu, çevredeki reçinenin istenmeyen kısmi polimerizasyonunu önlemek için aşırı pozlamayı en aza indirirken, optimum pozlama süresiyle yeterli makromer dönüşümünü sağlar [173]. Bu yöntem, işlem süresini azaltır, yüksek çözünürlüklü üretime olanak tanır ve doğal dokuları taklit eden mükemmel geometrilere sahip yapılar üretir [32], [33], [31]. Fakat geniş alanlı nesneler üretmek ve opak biyomalzemelerle yüksek çözünürlüklü nesneler hazırlamak zordur [172]. DLP'de yaygın olarak kullanılan malzemeler arasında hidrojel, reçineler, seramikler ve diğer kompozit malzemeler bulunur. Hidrojel yaygın olarak ayarlanabilen

fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde üstün avantajlara sahiptir ve biyomürekkep bazlı 3B biyobasım da temel malzeme haline gelmiştir [172].



Şekil 2.15 DLP sisteminin şematik gösterimi [170]

Hidrojeller, şekillerini ve bütünlüklerini koruyarak suda şişebilen çapraz bağlı polimerik ağlardır ve özellikle biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılırlar. Hidrojeller, fiziksel ve/veya kovalent bağlarla çapraz bağlanmış şişmiş doğal veya sentetik polimer ağlardır. ECM benzeri mimariler oluşturdıkları ve makromoleküllerin yaralanma bölgesine minimal invaziv iletimi için platform görevi görebildiklerinden doku onarımı için yüksek potansiyel gösterirler. *Polimer bazlı hidrojeller* ile hücreleri kapsülleyebilir, konak dokuya biyoaktif sinyaller sağlayabilirler. Hidrojellerin besin difüzyonunu ve hücre hareketliliğini düzenleme yeteneği ve mekanik stabiliteleri; üretim sırasında ayarlanabilen çapraz bağ yoğunluğuna ve ağ boyutuna bağlıdır [165].



Şekil 2.16 Hidrojel morfolojisi

Ancak hidrojeller, zayıf mekanik özellikleri nedeniyle geleneksel çıkarmalı teknolojilerle şekillendirilemez, bu nedenle karmaşık geometriye sahip bileşenler

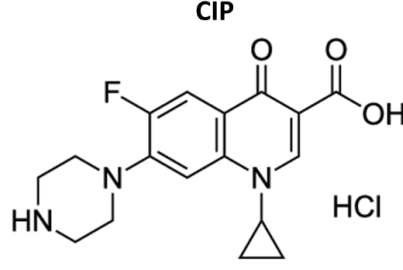
üretmek için bu malzemeler için 3B baskı özellikle ilgi çekicidir. Geri dönüştürülebilirlik, ayarlanabilir mekanik özellikler, biyouyumluluk, düşük immünojenite, sitouyumluluk ve fonksiyonelleşme açısından avantaj sağlarlar [174]. DLP ile baskılanan hidrojel ilaçlar, hücreler ve büyüme faktörleri ile fonksiyonelleştirilen birçok DM uygulaması için yüksek potansiyel gösterir [165]. Ayrıca uygun dolgu maddesi ile elektriksel veya termal iletkenlik, manyetik özellikler, mekanik özellikler (örneğin, sertlik, kırılma direnci), elektromanyetik koruma, veya antibakteriyel özellikler verebilir [170]. DLP’de kullanılan başlıca hidrojel arasında poli(etilen glikol) diakrilat (PEGDA), poli(ftalik asit gliserit) akrilat (PGSA), polikaprolakton diakrilat (PCLDA), diakrile edilmiş Pluronic F127 (DA-PF127), GelMA, HAMA, kolajen metakrilat (ColMA), Tiyol-en hidrojel (PETMP, HDDA, TMPMP, TMI, TMPTA3EO), katyonik hidrojel (DGEBA, CDVE) vardır [172]. Mekanik mukavemeti artırmak için çeşitli hidrojel hazırlama yöntemleri önerilmiştir [175], [173]. DLP ile 3B basım da onlardan biridir. Literatürde DLP ile 3B baskılanmış kemik, kırık, diş, cilt, timpanik membran DM de GelMA hidrojel çalışması mevcuttur [176], [177]. GelMA hidrojel cilt DM için mükemmeldir. İnsan keratinositleri, melanositleri ve dermal fibroblastı gibi birçok cilt hücre tipini destekler. Ayrıca hayvan modellerinde yara iyileşmesini desteklediği de bildirilmiştir. GelMA hidrojel biyolojik özelliklerini geliştirmek için büyüme faktörleri gibi biyoaktif moleküllerle birleştirilebilir [152]. GelMA hakkında detaylı bilgi “*Doğal Biyomalzemeler*” başlığı altında verilmiştir. Menassol ve ark. dermo-epidermal bağlantıyı taklit eden DLP ile basılabilir GelMA-kolajen matris rapor etmişlerdir [178]. Zhou ve ark. GelMA ile N-(2-aminoetil)-4-(4-(hidroksimetil)-2-metoksi-5-nitrosofenoksi) bütanamid (NB) bağlı hiyaluronik asit (HA-NB) ile geliştirdikleri GelMA/HA-NB biyomürekkebine farklı hücre hatları ekleyerek işlevsel canlı deri üretmek için DLP yöntemi kullanmışlardır. Böylece; cildin fizyolojik yapısını taklit eden, neovaskülarizasyonu teşvik eden ve güçlü mekanik özelliklere sahip ürün ürettiklerini rapor etmişlerdir [33].

Mekanik veya işlevsel özellikleri iyileştirmek için, 3B baskılanan hidrojellerin formülasyonuna dolgu maddeleri eklenebilir. Bazı özelliklerin artırılması, polimerin daha geniş uygulamalarda kullanılabilmesini sağlayan fonksiyoneleştirme işlemi yapılabilir. Uygun dolgu maddesi, bir polimere

elektriksel, termal iletkenlik, manyetik ve mekanik özellikler, elektromanyetik koruma, veya antibakteriyel özellikler verebilir [170].

İlaçların ve antibakteriyel ajanların hidrojellere yüklenmeleri ile salınımda önemli avantajlar kazandırabilir. Böylece antibakteriyel ajanların kullanımı büyük ölçüde iyileştirilebilir ve antibakteriyel ajanların hücreler üzerindeki toksik etkileri azaltılabilir. Genel olarak, enfeksiyonlar için etkili tedaviler doğrudan oral veya enjekte edilebilir antibiyotiklerdir. Sistemik tedaviye rağmen, antibiyotiklerin doğrudan kullanımı ilaç kullanımını kontrol etmeyi zorlaştırır ve bu da bakteriyel direnç gibi olumsuz faktörlere yol açabilir. Hidrojel, antibiyotik ilaçları yüklemek için uygun gözenekli bir yapıya sahiptir ve enfeksiyon bölgesine doğrudan uygulamaya izin vererek bakteriyel büyümeyi inhibe edebilir, yara iyileşmesini hızlandırabilir, iyi salım özelliklerine sahip olabilir. Hidrojel bazlı antibakteriyel tedavi yaklaşımları; “Antibiyotik yüklü hidrojeller, uyarıya duyarlı akıllı antibakteriyel hidrojeller ve ışık aracılı antibakteriyel hidrojeller” gibi birkaç kategoride özetlenebilir. Antibakteriyel ajanlar; antibiyotikler (Gentamisin, Siprofloksasin vb.), metal nanopartiküller, antibakteriyel polimerler, bitki ekstratları, antimikrobiyal peptitler, metal oksit nanopartikülleri olabilir [179].

Siprofloksasin (CIP), florokinolon sınıfında FDA onaylı geniş spektrumlu bir antibiyotiktir [180]. Gram negatif ve bazı Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu bilinmektedir [181], [182]. Farmakokinetik açıdan bakıldığında, kolayca emilir ve yaklaşık %70 ila %80 biyoyararlanıma sahiptir. Konsantrasyonu 1 ila 1,5 saatte zirveye ulaşır. Dağılım hacmi 2 ila 3 L/kg ile yüksektir [183]. İdrar yolu enfeksiyonları, cilt, kemik, eklem enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları, şarbon, veba, salmonelloz, kornea ülseri, konjonktivit, pediatrik orta kulak iltihabı, ayrıca gonore ve şankroid gibi cinsel yolla bulaşan enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır [184]. Daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmasına rağmen, CIP’in mesane kanseri, osteosarkom ve lösemi dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde apoptotik ve antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [180]. CIP’nin antibakteriyel mekanizması, bakteriyel DNA sentezinin ve girazların inhibisyonudur ve bu da bakteriyel ölümle sonuçlanır [185]. 3B basılan hidrojellerinde inorganik ve organik antibakteriyel ajanlar ile modifiye edilerek antibakteriyel özelliklere sahip hidrojellerin üretimi yapılabilir [179].



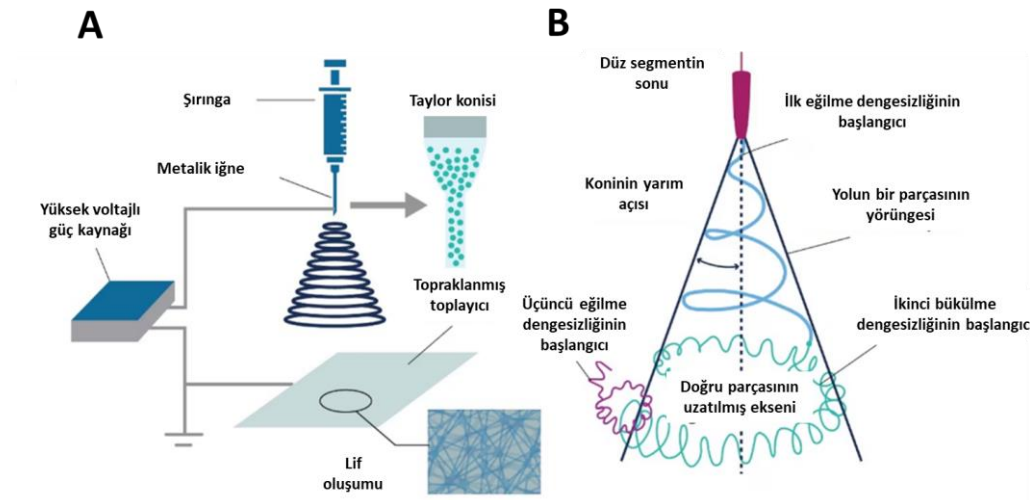
Şekil 2.17 CIP'in kimyasal yapısı [186]

- **Elektro-eğirme**

Elektro-eğirme, ayarlanabilir morfolojiye sahip üç boyutlu, gözenekli ve nano/mikron ölçekli lif tabanlı matrislerin üretimi için en başarılı tekniklerden biridir [187], [38]. Bu nedenle mevcut teknikler arasında, DM uygulamalarında sıklıkla kullanılan en umut verici yöntemlerden biridir [139]. Bazı dezavantajları mevcuttur bunlardan ilki düşük üretkenlik verimliliğidir (tek bir yayıcı başına saatte birkaç mililitre işleme verimi) elektro-eğrilmiş lif tabanlı matrislerin üretiminin laboratuvarından endüstriyel ölçeğe aktarılması zorludur. Bir diğer dezavantajı, işlem sırasında farklı parametrelerin standartlaştırılması gerekir. Özellikle, iki farklı parametrenin optimize edilmesi gerekir. Bunlar: elektro-eğirme işleminin kendisine ait uygulanan elektrik potansiyeli, çözelti akış hızı ve çalışma mesafesi gibi parametrelerdir. Diğerleri ise, kullanılan polimerik çözeltisine bağlı konsantrasyon, katkı maddeleri, çözücü türü, viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi gibi parametrelerdir [188].

Bu yöntem, polimer çözeltisinden mikro/nanofiberlerin üretimi için yaygın olarak kullanılan elektrohidrokinamik tabanlı bir işlemdir. En temel kurulumunda, bir enjeksiyon pompası, iğne takılı bir şırınga, yüksek voltajlı bir güç kaynağı ve bir toplayıcı plaka gerektirir. Kısaca, iğnenin ucu ile toplayıcı plaka arasında bir elektrik alanı oluşturmak için sisteme yüksek voltaj uygulanır. Şırıngada bulunan bir polimer çözeltisi, iğnenin ucuna pompalanır. İğneden bir polimer damlacık şeklinde oluşur. Taylor konisi olarak bilinen konik bir şekle uzar ve polimer damlacığı üzerindeki yüzey yükü, voltajın artmasıyla zamanla artar. Polimer damlacığının yüzey yükünü aştıktan hemen sonra bir polimer jeti oluşmaya başlar. Polimer jetindeki çözücü buharlaştırıldıktan sonra, jet üzerindeki yüzey yükü artar ve bu da polimer jetini dengesizleştirir. Polimer jeti, kararsızlığı telafi etmek için geometrik olarak başlangıçta iki jete ve sonunda çok sayıda jete ayrılır. Sürekli

olarak bölünen polimer damlacıklarını etkileyen elektrostatik kuvvet, fiber liflerin desenlenmesine neden olur [139], [138]. Fiber lifleri toplamak için alüminyum folyo, bakır levhalar ve dönen tamburlar kullanılabilir [189]. Bu yöntem ile fiberlerin boyutsal ve mekansal düzenlemesi ayarlanabildiği için DM'de kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Birçok doğal ve sentetik polimer ile çok çeşitli malzemeler kullanılabilir. Polimerlerin moleküler ağırlığı, iletkenliği, çözeltinin viskozitesi, yüzey gerilimi, akış hızı, voltaj ve nozul ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe gibi birçok parametre ayarlanabilir. Böylece üretilen fiber çapları birkaç nanometreden onlarca mikrometreye kadar değişebilir [189], [138].



Şekil 2.18 Elektro-eğirme mekanizması: (A) tipik elektrospinning kurulumunun şematik gösterimi, (B) üç ardışık elektriksel bükülme kararsızlığı içeren bir elektrospinning jetinin yolunun prototipik anlık konumunun gösterimi [189]

Elektro-eğirme ile hazırlanan membranlar, bol miktarda protein adsorpsiyon bölgesi ve çok sayıda hücre bağlanma bölgesi sağlayan yüksek yüzey alanı/hacim oranlarına sahip nanofiberler içerir [187]. Elektro-eğirilmiş lifler için en çok kullanılan sentetik polimerlerden biri PCL'dir, hakkında detaylı bilgi "*Sentetik Biyomalzemeler*" başlığı altında verilmiştir.

Burun kemiği ve kıkırdak rejenerasyonunu desteklemek için katmanlı doku iskeleleri geliştirmenin önemine dikkat çeken Kurowska ve ark., 3B/füzyon biriktirme modelleme teknolojisi ve elektro-eğirme metotlarını birlikte kullanarak katmanlı doku iskelelerinin üretimini sunmuşlardır. Üretim için biyocam (BG) ve çinko (Zn) katkılı BG ile modifiye edilmiş PCL yazdırırlar. Daha sonra, doğrudan doku iskelesi üzerine elektro-eğirme metodunu kullanarak farmasötik ilaç

Osteogenon (OST) parçacıkları içeren nanofibröz bir membran ile kaplayarak karakterizasyon çalışması yapmışlar. Sonuç olarak; fonksiyonelleştirilmiş doku iskelesi ile biyoaktiviteyi desteklediklerini, agreganın üretimi ve salgılanması üzerinde olumlu bir etki gözlemlediklerini ve tip II kolajenin üretimi ve salgılanmasını önemli ölçüde iyileştirdiklerini bildirdiler [190]. Rajzer ve ark., nazal septumun rekonstrüksiyonu için katmanlı bir implant olarak ürettikleri kompozit membranları PCL-A2Zn5 (Zn ile katkılanmış biyocamlı PCL) ile saf PCL membrana göre hücrelerin farklılaşmasını olumlu yönde etkilediğini rapor etmişlerdir [191]. San Marina ve ark, 5 farklı polimer karışımından elektro-eğrilmiş doku iskeleleri üreterek yaptıkları *in vitro* çalışmada polidioksanon (PDO), poli-3-hidroksibutirat-co3-hidroksivaleratın (PHBV) ve PHBV-PCL fiberlerin nazal kondrojenik takviye ile inkübasyonda en büyük matris birikimini gösterdiğini rapor etmişlerdir [192].

Elektro-eğrilmiş lifler, doğal polimerlerin biyouyumluluğunu sentetik polimerlerin üstün mekanik mukavemetiyle birleştirebilir [187]. PCL'in hidrofobik oluşu onu tek başına hücre afinitesi ve yapay doku oluşumu için uygunsuz hale getirir [193], [194]. PCL'nin biyouyumluluğunun iyileştirilmesi PCL-COL kompoziti oluşturularak aşılabılır [41]. ECM'nin ana bileşeni olan COL, oldukça hidrofilik olmasıyla hücre bağlanmasını teşvik ederek çoğalmayı ve farklılaşmayı destekler [195]. Böylece, nanofiberin mekanik özelliklerini, plastisitesini, biyouyumluluğunu ve parçalanabilirliğini ve dolayısıyla dokunun onarım verimliliğini daha da etkileyebilir [196]. PCL-COL nanofiberleri ayrıca yara pansumanı [197], vasküler greft [198], kemik ve kırık [196], ve ilaç dağıtım sistemi [199] gibi doku mühendisliğinin birçok alanında kullanılır.

Polimerik elektro-eğrilmiş lif tabanlı matrisler çok yönlü malzemelerdir ve tek katmanlı, çok katmanlı filmlerin ve/veya sandviç tipi kompozitlerin üretiminde kullanılabilirler. Dahası, elektro-eğrilmiş lif tabanlı matrisler, organik-inorganik nano dolgu maddeleri ve metalik nano parçacıklar ile güçlendirilmesiyle kolayca modifiye edilebilir. Bu nedenle, elektro-eğrilmiş lif tabanlı matrisler çok işlevli malzemeler olarak kolayca işlenebildikleri için ilaçların, antioksidanların ve/veya antimikrobiyal ajanların yada biyoaktif ajanların kontrollü salınımı gibi farklı özellikte üretilirler [188].

Biyoaktif moleküllerden biri olan büyüme faktörlerinin doku iskelelerine eklenmesi, mikro/nanopartiküller, lifler veya enjekte edilebilir kompleksler şeklinde olabilir [121]. Ama birçok sınırlamaları mevcuttur. Bunlardan ilki fizyolojik mikroçevre içindeki kısa yarı ömürleri nedeniyle büyüme faktörleri proteinazlar tarafından kolayca parçalanabilir veya hedef bölgeye gelmeden önce uzaklaştırılırlar [200]. Diğer bir sınırlama ise yeterli konsantrasyonun belirlenmesindeki zorluklardır. Uygun olmayan miktar veya salım kinetiği hücrelerin farklılaşmasın da istenilen verimi alamama ve istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir.

In vivo düşük stabilite ve yüksek sistemik düzeylerde istenmeyen etkilerin üstesinden gelmek için, büyüme faktörlerinin, hasta açısından minimum riskle maksimum terapötik fayda elde edilecek şekilde, sürekli ve lokalize bir şekilde uygulanması gerekir [123]. Literatürde kontrollü ve sürekli büyüme faktörü salım sistemleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu çalışmalardan en önemlilerinden biri, büyüme faktörlerinin bozunmadan korumak için polimerik matris içinde kapsüllenmektir yani biyopolimerik nanopartiküller kullanılarak modifiye edilmiş doku iskelesi üretimidir. Böylece büyüme faktörlerinin salınım kinetiği, polimerik matrisin bozunma hızının ayarlanması veya büyüme faktörler ile matris arasındaki fiziksel ve kimyasal etkileşimler yoluyla kontrol edilebilir [122].

2.5 Biyopolimerik Nanopartiküller

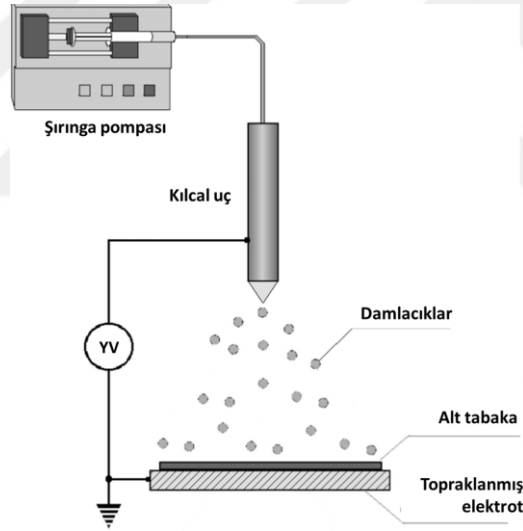
10 ila 1000 nm boyut aralığına sahip sıfır boyutlu (0B) nanomalzemelerdir. Geliştirilmiş yüzey-hacim oranı ve manyetik özellikleri nedeniyle ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, biyosensörler, gen dağıtımı, hücre görüntüleme ve etiketleme gibi birçok biyomedikal uygulamada kullanılmaktadırlar. Biyopolimerik nanopartiküllerin üretimi, yukarıdan aşağıya veya aşağıdan yukarıya yaklaşımlarla yapılabilir. Sentez tekniği, nanopartiküllerin boyutunu ve polidispersite indeksini büyük ölçüde etkiler. Polimerik nanopartiküllerin gerekli özellikleri göz önünde bulundurularak uygun bir üretim süreci seçilir. Biyopolimerik nanopartiküller için kullanılan üretim tekniklerinden bazıları, örnek olarak; emülsifikasyon, çökeltme, konservasyon ve elektrosprey verilebilir. Ayrıca üretiminde; albümin, jelatin, ipek fibroin, kolajen, kitosan, aljinat, PCL, PLA, PVA ve polietilen glikol (PEG) gibi birçok doğal ve sentetik biyomalzeme kullanılır. Sentetik polimerik nanopartiküller

doğal polimerlerden daha avantajlıdır. Kararlılıkları ve esneklikleri nedeniyle çeşitli uygulamalarda kullanılırlar. Kontrollü salınımı kolaylaştırır, immünojenik değildir ve vücuttan kolayca temizlenebilirler. Sentetik biyopolimerlerin dezavantajlarından biri, hücre yapışma yerlerinden yoksun olmaları ve özelliklerini iyileştirmek için kimyasal modifikasyonlar gerektirmeleridir. Daha yüksek yüzey-hacim oranı, daha yüksek reaktivite ve fonksiyonel grupları ve dolayısıyla yönetici özellikleri kolayca değiştirme kabiliyeti sağlar. PVA nanopartikülleri, nanopresipitasyon veya emülsiyon tekniği gibi tekniklerle üretilir. PVA nanopartikülleri, yüklenen ilacın biyoyararlanımını ve stabilitesini iyileştirmeye yardımcı olduğu bildirilmiştir [163].

2.5.1 Elektrosprey

Elektrosprey veya elektrohidrodinamik atomizasyonun (EHDA) temel deneysel kurulumu, elektro-eğirme'de kullanılan kurulumla benzerdir. Yüksek voltajlı bir güç kaynağı, bir şırınga pompası, tanımlanmış çaplı metal bir iğne (nozül) ile kapatılmış plastik veya cam bir şırınga ve parçacıkları toplamak için topraklanmış bir toplayıcı veya substrattan oluşur [201]. Tek veya çok adımlı prosesler yoluyla istenilen boyutta parçacıklar üretmenin basit bir yoludur [50]. Toplu sıvı jeti, pıhtılaşmayı önlerken dağılmalarına yardımcı olan aynı yüke sahip ince sıvı damlacıklarına bölünür. Nozuldaki yüksek elektrik potansiyeli, nozul ucunda güçlü bir elektrik alanı üretir. Bu da sıvı damlayı Taylor konisine deforme eder ve koni tepesinden ince bir sıvı jeti çeker. Bu jet, elektrohidrodinamik kararsızlık nedeniyle damlacıklar halinde dağılır [202]. Nozul ucundan çıkan sıvı damlacığının boyutu damlanın yüzeyindeki yük birikimi tarafından yönetilir. Sıvı damlacığındaki yük birikiminden kaynaklanan elektrik gerilimleri yüzey geriliminin ötesine geçtiğinde, sıvı yığından veya sıvının atomizasyonundan çok ince damlacıklara ayrılır [201]. Elektrospreyleme ve elektro-eğirme teknolojileri arasındaki temel fark, kullanılan polimerin konsantrasyonu ve moleküler ağırlığıdır, yani yüksek polimer konsantrasyonları kullanıldığında, fiber oluşma eğilimi vardır daha düşük polimer konsantrasyonları için parçacık oluşumu gözlemlenebilir [203]. Elektrospreyleme nozul ucu çeşidine göre temelde 3'e ayrılır. Bunlar; Mono-Eş Eksenli, Eş eksenli ve Çok eksenli elektrospreydir. Mono-Eş eksenli elektrosprey, klasik elektrosprey yöntemidir yani bir şırınga pompası tarafından kontrol edilen bir nozul bulunur. Bu Teknik çok dikkatli bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Çünkü biyoaktif ajanları

kapsüllemek için polimerik partiküller tasarlarken, polimer çözeltisinin ihtiva ettiği çözücüler nedeniyle sisteme eklendiğinde biyoaktif ajanlara zarar verebilir. Bunun için uygun polimer seçimi çok önemlidir. İstenilen partikül boyutu; akış hızı, iğne çapı ve uygulanan voltaj gibi deneysel parametrelerin yanı sıra polimer konsantrasyonu, kullanılan çözücü, iğne ile toplayıcı arasındaki toplama plakası arasındaki mesafe, sıcaklık, bağıl nem ve iğnenin kalibresi gibi parametrelerin de kontrol edilmesiyle elde edilebilir. Ayrıca parametrelerin ayarlanması ile küresel, uzunlamasına veya gözenekli gibi morfoloji dahil olmak üzere çeşitli partikül özellikleri sağlanabilir [204]. Yüksek buhar basıncına veya düşük yüzey gerilimine sahip organik çözücüler, sulu çözeltilere kıyasla elektrosprey de daha iyi kullanılır. Ayrıca, çözücü dielektrik sabiti veya iletkenlik, parçacık morfolojisini belirlemede önemli rol oynar. Organik çözücülerdeki polimer kompozitlerinden kontrollü boyut, şekil ve morfolojiye sahip çok çeşitli polimerik ve kompozit partiküllerin üretimi için avantajlı bir şekilde kullanılmıştır [201].



Şekil 2.19 Yüzey kaplamada kullanılan elektrosprey sisteminin şeması [202]

Son yirmi yılda, polimerik malzemeler kullanılarak elektrosprey ile üretilen mikro/nano partiküller biyomedikal uygulamalar için ilgi odağı haline gelmiştir [52]. Elektrospreyin karıştırma, yüzey modifikasyonu ve koaksiyel prosesler gibi çeşitli yöntemleri yoluyla ilaçlar, proteinler, hücreler, DNA ve büyüme faktörleri gibi biyoaktif bileşenleri partiküller içerisine alarak doku iskelelerin yüzeyini kaplamak mümkündür [54]. Böylece; cilt, kemik, kırık ve sinir dokusu onarımı ve yenilenmesini hedefleyen biyoaktif bileşenlerin geleneksel iletim yöntemlerine kıyasla organik çözücülere sınırlı maruziyet nedeniyle denatürasyonunu önemli

ölçüde azaltır. Büyüme faktörlerinin sınırlı stabilite, kısa yarı ömür, yüksek inaktivasyon oranı ve kansere yol açabilen aşırı doz riski nedeniyle *in vivo* iletimi, hücre göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik etmede ciddi zorluklarla karşılaşmaktadır. Elektrosprey ile polimerik partikülize edilmiş büyüme faktörleri formülasyonları bu zorlukların üstesinden gelebilir. Ayrıca DM'deki en büyük zorluklardan biri olan spesifik doku tepkisini ortaya çıkarmak için büyüme faktörlerinin lokalize iletimine katkıda bulunur [205]. Literatürde elektrosprey metodu kullanılarak çeşitli polimerik partiküller ile konjuge edilmiş birçok büyüme faktörü (BMP-2, BMP-7, VEGF, PDGF, SDF-1 ve FGF-2 gibi) ile ilgili çalışma bulunmaktadır [201], [177].

2.6 Burun Kıkırdağı Doku Mühendisliğinde Güncel Uygulamalar

Nazal DM uygulamaları genellikle NKDM ile ilgilidir. Bunun için bu bölümde literatürde yapılan bazı çalışmalara değinilmiştir. Mekanik özelliklerinin zayıf olmasından dolayı 3B basılmış tek bir doğal fotopolimerin nazal kıkırdak alanında kullanımının yeterli olmayacağını savunan Jia ve ark., GelMA-HAMA-poliakrilamiden (PAM) bir mürekkep üreterek DLP ile basımı gerçekleştirilmiştir. Hem mekanik özellikleri hem de baskı kalitesi artan bir hidrojel geliştirerek, neonatal Sprague-Dawley (SD) sıçan kondrositleri (CChons) ile kıkırdak gelişimi ve biyouyumluluğu değerlendirilmiştir. Gelecekte burun kıkırdağı yapımında önemli bir rol oynayacağını bildirmişlerdir [206]. Burun kemiği ve kıkırdak rejenerasyonunu desteklemek için katmanlı iskeleler geliştirmenin önemine dikkat çeken Kurowska ve ark., 3B/füzyon biriktirme modelleme teknolojisi ve elektro-eğirme metotlarını birlikte kullanarak katmanlı iskelelerin üretimini sunmuşlardır. Üretim için biyocam (BG) ve çinko katkılı BG ile modifiye edilmiş PCL yazdırırlar. Daha sonra, doğrudan doku iskelesi üzerine elektro-eğirme metodunu kullanarak farmasötik ilaç Osteogenon (OST) parçacıkları içeren nanofibröz bir membran ile kaplayarak karakterizasyon çalışması yapmışlar. Sonuç olarak; fonksiyonelleştirilmiş doku iskelesi ile biyoaktiviteyi desteklediklerini, agreganın üretimi ve salgılanması üzerinde olumlu bir etki gözlemlediklerini ve tip II kolajenin üretimi ve salgılanmasını önemli ölçüde iyileştirdiklerini bildirdiler [190]. Burun için önemli bir yapısal bileşen olan kıkırdak, nazal septum perforasyonundan sonra bozulmaya eğilimlidir. Bu amaçla, Zhang ve ark., kök

hücrelerle geliştirilen DM  r nlerindeki kondrojenik farklılaşmanın mekanik ortamdan etkilendiğini düşünerek, kıkırdak restorasyonu için ideal kök hücreleri içerebilen enjekte edilebilir termosensitif hidrojeller geliştirmişlerdir. Hayvan modellerinde NSK'yı başarıyla onarabildiklerini bildirmişlerdir [207]. Hubber ve ark., nazal deformasyonda otolog kıkırdak greftleri dışındaki greftlerin kullanımını araştırdılar, rekombinant trombosit türevi büyüme faktörü-BB (PDGF-BB) ile h cresizleştirilmiş domuz burun septum kıkırdağını (dDNSK) işlevselleştirilen bir tavşan modelinde septum kıkırdak defektlerini yeniden yapılandırmak için kullanarak, işlevselleştirilmiş DNSK'lerin iyileşme sürecini artırdığını, burun septumuna yapısal destek sağıladığını ve yerinde kıkırdak rejenerasyonunu uyardığını rapor etmişlerdir [208]. Tip I kolajen hidrojelleri, klinikte yaygın kullanımları ve kıkırdak ECM'sine benzerlikleri nedeniyle kıkırdakla ilgili DM uygulamalarında çokça kullanılmıştır. Lan ve ark., 3B biyobaskıda düşük viskozite, elastik modül ve kolajen I hidrojellerinin yavaş jelleşmesi gibi sorunların üstesinden gelmek için FRESH (askıya alınmış hidrojelin serbest formda geri dönüşümlü gömülmesi) adı verilen bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde kullanılacak hücrelerin hNK'ların tip I kolajen hidrojel ile önceden karıştırıp oda sıcaklığında ikincil bir jelatin banyosunda tutup istenen yapıya basabilmişlerdir. hNK'larla yüklenen hidrojellerde kolajen fibrillerinin oluşumunun, doğıal kıkırdak dokusuna benzer seviyelerde GAG oluşturduğunu ve SEM görüntülerinin doğıal insan NSK benzer olduğı bildirilmişlerdir [209]. Hidrojelin NKDM m kemmел uygulama potansiyeline sahip olduğı düşünüldüğünde, Sang ve ark., GelMA/HAMA/BC'den (bakteriyel selüloz) bir kompozit hidrojel hazırlayarak, hidrojelin mekanik özelliklerinin ve baskı doğıruluğunun arttığını bildirdiler. Fare kondrosit hücreleriyle 3B biyobasılan üründe hücre canlılığının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir [210].

NKDM hibrit yöntemlerin başarılı kullanımını göstermek için Zare ve ark., eriyik biriktirme modelleme 3B basım yöntemini kullanarak PCL'den bastıkları bir doku iskelesinde bir aljinat sülfat (Alg-Sul) hidrojel dolgusu üretmişlerdir. Daha sonra GAG ve kondrogenezi artırmak için hidrojellerine çeşitli konsantrasyonlarda h cresizleştirilmiş ekstraselüler matriks (dECM) ekleyerek hücre canlılığının arttığını rapor etmişlerdir [211]. Kıkırdağın sınırlı iyileşme kapasitesinin NKDM uygulamalarında kalıcı kusurlara ve komplikasyonlara yol a abileceğı hipotezine

dayanarak Shokri ve ark., kıkırdağı biyomimetik olarak taklit edebilen bir doku iskelesi geliştirerek, Elastin-jelatin-hiyaluronik asit (EGH) ürünü elde etmişlerdir. Tavşan deneyleri yoluyla burun kıkırdak defektlerinin rejenerasyonu için kullanımını bildirdiler [212]. Rajzer ve ark., hem evrensel olarak hem de taşıyıcı moleküllerle kullanılabilen ve patolojik alanın boyutuna tam olarak uyan bir DM greftiyle burun septum kıkırdağını rejenerasyonu amaçlanarak 3B baskı ile PLLA greft üretmişlerdir. Bu greft, burun septum kıkırdağı çıkarılan hastaların mikro yapısı dikkate alınarak CAD tasarımıyla üretilmiştir. Uygun şekilde eşleştirilmiş bir şekle, önceden tasarlanmış geometriye ve gözenek boyutuna sahip bir iskelenin burun septum kıkırdak patolojilerinin kapatılmasına olanak tanıdığı bildirilmiştir [213]. Kuhlmann ve ark., domuz burun septum kıkırdağı (DNSK) ve ADMKH'lerin kombinasyonunun ile sınırlı kondrositlere umut verici bir alternatif olabileceğini öne süren bir çalışma yürütmüşlerdir. ADMKH'lerin ve DNSK arasındaki etkileşimlerini *in vitro* modelde araştırarak, kondrojenik farklılaşmanın gerçekleşebileceğini ama, kondrojenik farklılaşma için başka alternatif uyarıcıların da gerekli olduğunu bildirmişlerdir [214]. Lee ve ark., kıkırdak dokusunu hücresizleştirmek için kullanılan fiziksel, kimyasal ve enzimatik adımların kıkırdak dokusunun benzersiz mimarisini bozduğuna inanarak, bunların çevre dostu, toksik olmayan, son derece etkili, patojen öldürücü, yanıcı olmayan ve aşındırıcı olmayan, uygun maliyetli süperkritik karbondioksit ($scCO_2$) teknolojisi rapor etmişlerdir. DNSK kimyasal çözücü kalıntılarından, yağlardan ve lipitlerden arınmış olduğunu göstermişlerdir. Kondrositlerle kültüre edilen DNSK tozunda GAG, hücre dışı matris, agrekan ve tip II kolajen ekspresyonu olan 3B histotipik fonksiyonel bir kıkırdak doku kütlesi üretmişlerdir [12]. D'Alessandro ve ark., burun dokusunun farklı katmanlarını hesaba katarak tek bir doku iskelesinde farklı burun dokularının rejenerasyonunu sağlayabileceklerini iddia ettikleri bir rapor yayınlamışlardır. PVA-jelatin süngerler ve mezodermal progenitör hücreleri (MPH) kullanarak 3B hücre/doku iskelesi yapılarından oluşan basit bir platform oluşturmuşlardır. Burundaki ana bağ dokuları olan hiyalin kıkırdak, vaskülarize kemik ve fibrokartilajın rejenerasyonuna izin veren 3B yapılar elde ettiklerini rapor etmişlerdir [215].

Ruiz-Cantu ve ark., burun kıkırdağı onarımı için biyoyumlu, mekanik olarak sağlam bir yapı tasarımı oluşturmak üzere kondrosit yüklü jelatin metakrilat ve

PCL'yi birleştiren bir 3B biyobasım yaparak, burun kıkırdağının mekanik özelliklerini taklit ederken aynı zamanda neokartilage oluşumunu destekleyen bir yapının başarılı bir şekilde üretildiğini göstermişlerdir [19]. Garakani ve ark., nazal ECM, kitosan ve agaroz kullanarak burun kıkırdağının özelliklerini taklit eden optimum özelliklere sahip kompozit doku iskelesi üretimini bildirmişlerdir. Ürettikleri hidrojel ile mekanik dayanıklılık, gözenekli morfoloji, kısmi kristallik, yüksek şişme oranı, kontrollü biyolojik bozunma oranı, *in vitro* hücre çoğalması, hücre bağlanması ve reolojik özellikler dahil olmak üzere çeşitli avantajlar sergilediğini rapor etmişlerdir [216].

Burun rekonstrüksiyonu için kullanılabilecek kondrosit yüklü GelMA ve PCL 3B biyobaskısının kondrositlerin yaşayabilirliği ve işlevselliği üzerindeki etkisini araştıran Ruiz-Cantu ve ark. doku iskelesinin gözenekli yapısını ve hücre işlevselliğini bozmadan kondrositlerin 3B biyoyazdırılması için en iyi konsantrasyonun %20 w/v GelMA olduğu bildirmişlerdir. Yapıların neokartilage oluşumu ve burun alar kıkırdağına benzer mekanik özellikler gösterdiği rapor edilmiştir [19]. 3B basım ile PCL/grafen nanoparçacıkları içeren doku iskelesi üreten Rajher ve ark., nazal kıkırdak replasmanı için mekanik özelliklerinin uygun olduğunu, kondrosit çoğalmasını desteklediğini bildirmişlerdir [217]. Von Bomhard ve ark. büyük burun kıkırdağı defektlerinin rejenerasyonu için doku iskele malzemesi olarak ksenojenik kıkırdak kullanılarak ayrı ayrı şekillendirilebilen, doğal dokuya benzer özelliklere sahip bir NKDM greft geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla, dehidreleştirilmiş domuz burun septum kıkırdağından ve otolog kulak kondrositlerinden türetilen bir biyomalzeme kullanarak 3B hücre/iskele yapıları üretmişlerdir. Bu greftler ile uzun vadeli, kararlı ve güvenilir septum rekonstrüksiyonu elde etmişlerdir. Hayvan deneyleri sonucunda, ekilmiş hücreler olmadan dehidreleştirilmiş ksenojenik septum kıkırdağının olası klinik uygulama için tercih edilebilir olduğunu ve grefte hücre ekilmesinin yalnızca septum perforasyonları açısından avantajlı olabileceğini bildirmişlerdir [218]. Andrews ve ark., NKDM parametrelerine dayalı çalışmalarda tasarlanmış kıkırdak kalitesini iyileştirmek için iki ana strateji kullanmışlar. Bunlar: Hipoksik kültür ve kemik iliğinden türetilen mezenkimal stromal hücrelerle eş kültür. Nazal kondrositler ve BMKH'lar eş kültürlendiğinde GAG ve kolajen II miktarında artış olduğunu ve düşük O₂ ortamında kültürün sürdürülmesiyle kondrojenlerin

farklılaşma kapasitesinde artış olduğunu bildirmişlerdir [8]. Gupta ve ark., otolog kondrosit mikrogreftler ile trombositten zengin plazmanın (PRP) kombinasyonunun burun rekonstrüksiyonu için DM greft hazırlamak amacıyla fibrin-genipin ve ECM parçacıkları içeren hidrojeller geliştirmişlerdir. Bu hidrojelin burun rekonstrüksiyonunda greft olarak kullanılabilen biyoaktif ve biyomekanik stabil bir hidrojel olabileceği bildirilmiştir [219].

Tablo 2.5 NKDM de güncel çalışmalar [25]

Referans	Hücre Hattı	Biyomalzemeler	Hazırlama Metotları
[206]	Neonatal SD CChons	GelMA/HAMA/PAM	DLP
[190]	Normal insan diz eklem kondrositleri	PCL, BG, Zn katkılı BG ve farmasötik ilaç OST	Elektro-eğirme, FDM
[207]	KİMKH	GelMA hidrojellerine yüklenen TGFβ1	Hidrojeller
[208]	-----	Hücreleştirilmiş burun septum kırıkdağı (DNSC) ve Rekombinant trombosit türevi büyüme faktörü-BB (PDGF-BB)	-----
[21]	hNK	Tip I kolajen hidrojel, Chondro-Gide doku iskelesi (Karşılaştırma için kullanılmıştır)	3B basım
[210]	Fare kondrositleri (ATDC5)	GelMA/HAMA/bakteriyel selüloz kompozit hidrojel	3B basım
[211]	ADMKH	PCL, Alg-Sul hidrojel, Hücreleştirilmiş hücre dışı matris	3B basım
[212]	Otolog kulak kondrositleri	Elastin-jelatin-hiyaluronik asit	3B basım
[213]	-----	PLLA	3B basım
[214]	ADMKH	Hücreleştirilmiş domuz burun septum kırıkdağı	-----

Tablo 2.5 NKDM de güncel çalışmalar [25] (devamı)

Referans	Hücre Hattı	Biyomalzemeler	Hazırlama Metotları
[209]	hNK	Tip I kolajen hidrojel	3B basım
[12]	Sıçan yağ dokusundan türetilen kök hücreleri ve Sıçan kaburga kırıkdağı kondrositleri	Hücreleştirilmiş domuz burun septum kırıkdağı	-----
[215]	Sıçan ve İnsan kemik iliğinden türetilen kök hücreleri	Sıçan ve insan kemik iliği türevli kök hücreler PVA-Jelatin süngerler	Emülsiyon ve dondurarak kurutma, ardından kimyasal çapraz bağlama
[216]	-----	Burun septum kırıkdağından elde edilen ECM, kitosan ve agaroz	Hidrojel
[19]	Kondrosit	GelMA ve PCL	3B Biyobaskı
[217]	Kondrosit	PCL/grafen	FDM
[218]	Tavşan kulak kondrositleri	Hücreleştirilmiş domuz burun septum kırıkdağı	-----
[219]	-----	Fibrin, fibrin-genipin ve hücre dışı matris (ECM) parçacıklar	Hidrojel
[8]	KİMKH	Chondro-Gide	-----

3

MATERYAL VE METOT

3.1 Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Materyaller

Polikaprolakton (PCL, $M_w = 80.000 \text{ g mol}^{-1}$), metakrilik anhidrit (MAA), polivinil alkol (PVA, $M_w = 130.000 \text{ g/mol}$), lityum fenil-2,4,6-trimetil-benzoil fosfinat (LAP), insan EGF (SRP3027-500UG), insan TGF β 3 (SRP3171-10UG), diyaliz membranı (kesme değeri 14 kDa ve ortalama düz genişlik 43 mm), dimetil sülfoksit (DMSO) ve paraformaldehit Sigma–Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Jelatin tip B (Tip B, jel mukavemeti ~jel 230–250 g Bloom) sığır derisinden ve Kolajen (COL) Halavet'ten (Türkiye) temin edilmiştir. Siprofloksasin (CIP) Cayman Chemical'dan (ABD) satın alınmıştır. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) (E0144Hu) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta3 (TGF β 3) (E2986Hu) ELISA kitleri BT LAB'dan (Çin) satın alınmıştır. Sodyum karbonat, sodyum hidroksit, %37'lik hidroklorik asit ve Parafilm® Merck'ten (Almanya) satın alınmıştır. Sodyum hidrojen karbonat (>%99,7) ISOLAB'dan (Almanya) satın alınmıştır. Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS, pH 7,4) ChemBio'dan (Türkiye) satın alınmıştır. L-glutamin (GlutaMAX™), penisilin streptomisin fungizon (PSF), fetal sığır serumu (FBS), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ve Trizol Thermo Fisher Scientific'ten (ABD) satın alınmıştır. DMEM/F-12 Sartorius AG'den (Almanya) satın alınmıştır. MTT Biomatik'ten (Kanada) satın alınmıştır. *In vitro* hücre canlılığını belirlemek için insan KİMKH (ATCC, PCS-500-012) kullanılmıştır.

Antibakteriyel deneyler için Tablo 3.1'de adı geçen bakteri suşları kullanılmıştır.

Tablo 3.1 Antibakteriyel deneylerde kullanılan bakteriler ve kodları

Bakteriler	Duvar Yapıları	Kaynak
Staphylococcus aureus	Gram pozitif	ATCC 25923
Escherichia coli	Gram negatif	ATCC 25922
Pseudomonas aeruginosa	Gram negatif	ATCC 27853

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

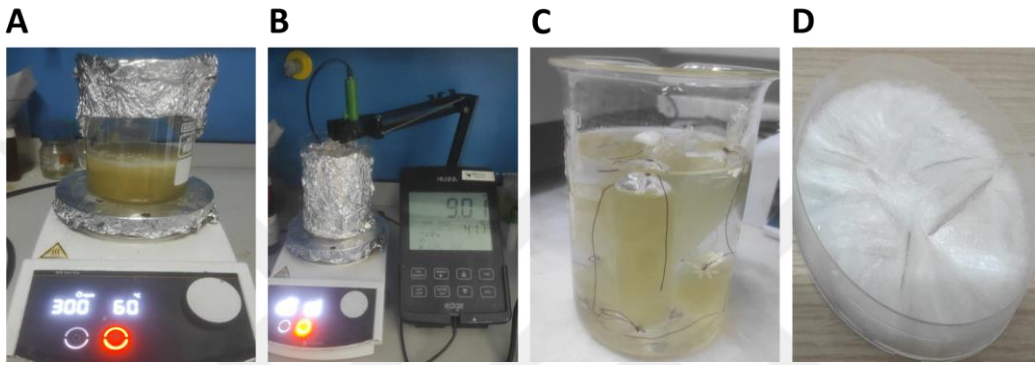
- GelMA'nın ikame derecesi için ^1H -NMR (Proton Nükleer Manyetik Rezonans) spektroskopisi Bruker Avance III 600 MHz, Bremen, Almanya kullanılmıştır.
- 3B basılan hidrojellerin üretimi için ticari olarak erişilebilir bir 3B yazıcı olan Phrozen Sonic Mini 8K, Phrozen Tech Co Ltd., Hsinchu, Tayvan kullanılmıştır.
- Hidrojellerin modeli bilgisayar destekli tasarım (CAD) yazılımı olan *SolidWorks 2020* Dassault Systèmes SE, Vélizy-Villacoublay, Fransa programı kullanılarak oluşturulmuştur.
- CAD dosyaları .stl dosya formatına dönüştürülmüş ve 3B yazıcı yazılımı olan *Chitobox V1.9.3* Shenzhen Chuangbide Technology Co., Ltd., Shenzhen City, Çin) kullanılarak dilimlenmiştir.
- Nanofiberleri üretmek için laboratuvar ölçekli elektro-eğirme cihazı NS24, Inovenso Co., Türkiye kullanılmıştır.
- Elektrosprey işlemi için laboratuvar ölçekli bir elektrosprey cihazı Inovenso, İstanbul, Türkiye kullanılmıştır.
- Numuneler Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), FT/IR-ATR 4700, Jasco, Easton, MD, ABD kullanılarak kimyasal olarak karakterize edilmiştir.
- Numuneler diferansiyel taramalı kalorimetre cihazı olan DSC-60 Plus, Shimadzu, Japonya kullanılarak termal olarak karakterize edilmiştir.
- Tüm üretilen malzemelerin yüzey morfolojisi bir taramalı elektron mikroskobu (SEM), EVA MA 10, Zeiss, Jena, Almanya kullanılarak incelenmiştir. Numuneler bir spreyci kaplama makinesi SC7620, Quorum, Laughton, Doğu Sussex, İngiltere kullanılarak kaplanmıştır.

- Hidrojellerin üzerindeki nanopartiküllerin ortalama partikül çapı ve nanofiberlerin fiber çapı *Image J* yazılımı (National Institutes of Health, Bethesda, ABD) kullanılarak hesaplanmış ve histogram grafikleri çizilmiştir.
- Üretilen malzemelerin mekanik özellikleri bir mekanik test makinesi EZ-LX, Shimadzu, Kyoto, Japonya kullanılarak incelenmiştir. Numunelerin kalınlığı dijital bir mikrometre cihazı olan Mitutoyo MTI Corp., ABD kullanılarak ölçülmüştür.
- Ayrıca GelMA sentezinin diyaliz aşamasında termal bir çalkalayıcı Microtest tutulmuş, şişme, bozunma ve salım çalışmaları için çalışılan ürünler termal bir çalkalayıcıda BIOSAN TS-100, Riga, Letonya inkübe edilmiştir.
- CIP doğrusal kalibrasyon eğrisi ve ilaç salım bir UV-vis spektrofotometresi, UV-Vis spektrofotometre Shimadzu UV- 1280 UV-VIS, Japonya kullanılarak analiz edilmiştir.
- Numuneler, hücre yapışmasını, büyümesini ve doku iskelesi katmanları boyunca dağılımını incelemek için bir floresan mikroskobu CO₂ İnkübatör Sistemli Zeiss Axio Observer Z1, Carl Zeiss ile fotoğraflanmıştır.
- KİMKH canlılığı için absorbans değerleri bir ELISA okuyucusu BMG LABTECH SPECTROstar® Nano aracılığıyla ölçülmüştür.
- Histolojik incelemeler ters ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ts2) ile incelenmiştir.

3.2 GelMA Sentezi

Ticari olarak sığır derisinden elde edilen tip B sığır jelatin kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tip B jelatinden GelMA sentezi için referans olarak hazırlanan prosedüre [157], [152] ilaveten her gram jelatin için 0,2 mL MAA kullanılmıştır. B tipi jelatin, A tipine göre daha fazla amin grubu içerdiğinden [220], MAA miktarının iki katına çıkarılması planlanmıştır. Kısaca, %10'luk (ağırlık/hacim) bir jelatin çözeltisinin 60°C'de 0,1 M bikarbonat tamponu içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra jelatin çözeltisine gram jelatin başına 0,2 mL MAA ilave edilmiş ve sürekli karıştırılarak 50°C'de 3 saat reaksiyona girmesi sağlanmıştır. Bu 3 saat boyunca MAA'nın altıda biri (334 µL) her 30 dakikada bir kuvvetli karıştırma altında jelatin

çözeltisine damla damla eklenmiş ve her eklemenin ardından pH 9-9,5'e yeniden ayarlanmıştır. Böylece jelatindeki lizin/hidoksilizin amino asitlerinin serbest amino grupları MAA ile reaksiyonu sağlamıştır. Reaksiyona girmemiş MAA ve metakrilik asit yan ürünlerini uzaklaştırmak için, elde edilen çözelti 5 gün boyunca 40°C'de damıtılmış su içerisinde 14 kDa moleküler ağırlık tutma değerinde (MWCO) membran ile diyaliz edilmiştir. Daha sonra diyalizden çıkarılan çözelti -20°C'de 24 saat boyunca dondurulmuştur. Akabinde dört gün boyunca liyofilize edilerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 GelMA Sentez Aşamaları: (A) jelatin çözeltisinin hazırlanması, (B) çözeltinin MAA eklenmesi sonucunda pH'sının ayarlanması, (C) diyaliz aşaması, (D) liyofilize GelMA

3.2.1 GelMA'nın Metakrilatlanma Derecesinin Belirlenmesi

Sentezlenen GelMA'nın DS'si, iki farklı yöntem ile araştırılmıştır. Bunlar, ¹H-NMR spektroskopisi ve TNBS yöntemidir.

¹H-NMR spektroskopisi için hem jelatin hem de GelMA, D₂O içinde 10 mg/mL'lik bir konsantrasyonda çözdürülmüştür; ¹H-NMR spektrumları, 600 MHz frekansında ve oda sıcaklığında elde edilmiştir [221]. GelMA'nın DS'si Denklem 3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$DS(\%) = \left(1 - \frac{\text{GelMA lizin metilenin pik alanı}}{\text{Jelatin lizin metilenin pik alanı}}\right) \times 100 \quad (3.1)$$

TNBS yöntemi için GelMA ve jelatin örnekleri, 0,1 M sodyum bikarbonat (pH 8,5) tamponunda 0,5 mg ml⁻¹ konsantrasyona kadar çözülerek örneklerin 500 µl'sine 250 µl %0,01 TNBS çözeltisi eklenmiştir. Çözelti eklenen örnekler karanlıkta 40°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. 250 µl %10 (w/v) SDS ve 125 µl 1 M hidroklorik asit solüsyonu reaksiyonu durdurmak için eklenmiştir. Her numunenin UV absorbansı

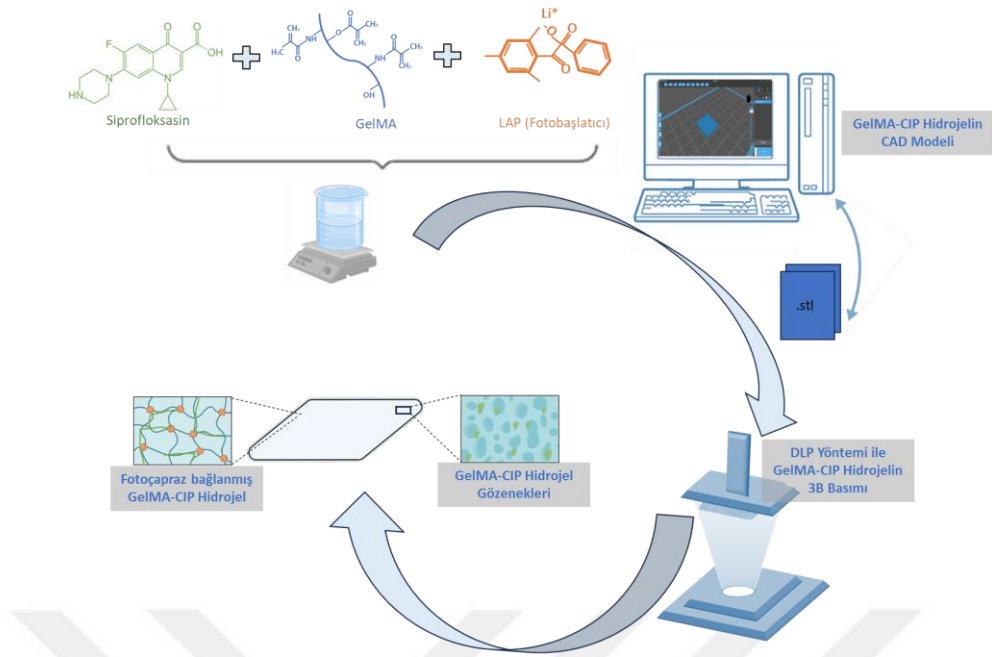
335 nm'de ölçülmüştür. Amino grup konsantrasyonunu belirlemek için 0, 1, 5 ve 10 µg ml⁻¹ konsantrasyonlu glisin standart solüsyonları kullanılmıştır.

3.3 GelMA-CIP Çözeltilisinin Hazırlanması

Hidrojel hazırlayabilmek için ml başına 2,5 mg LAP ile %20 GelMA PBS (pH 7.4) 'de tamamen çözülene kadar 40°C'de karıştırılarak 3B DLP yazıcı tankına aktarılmıştır. GelMA solüsyonuna antibakteriyal özellik kazandırmak için GelMA hidrojellerine farklı konsantrasyonlarda CIP antibiyotiği eklenmiştir. Bunun için önden bir antibiyotik solüsyonu hazırlanmıştır. Stok antibiyotik solüsyonu 1 ml 1N HCl içerisine 0,5 mg CIP eklenerek iyice çözünmesi sağlanmıştır. Akabinde farklı konsantrasyonlarda ilaç olacak şekilde (30, 100, 250, 500 µl) GelMA çözeltisine stok solüsyon ilave edilmiş ve 5 dakika sıcaklık olmayan ortamda iyice karışması sağlanmıştır. Gerçekleştirilen antimikrobiyal disk difüzyon analizinden sonra uygun konsantrasyona karar verilerek salım ve diğer çalışmalara devam edilmiştir.

3.4 GelMA-CIP Hidrojelinin Tasarımı ve 3B DLP Basımı

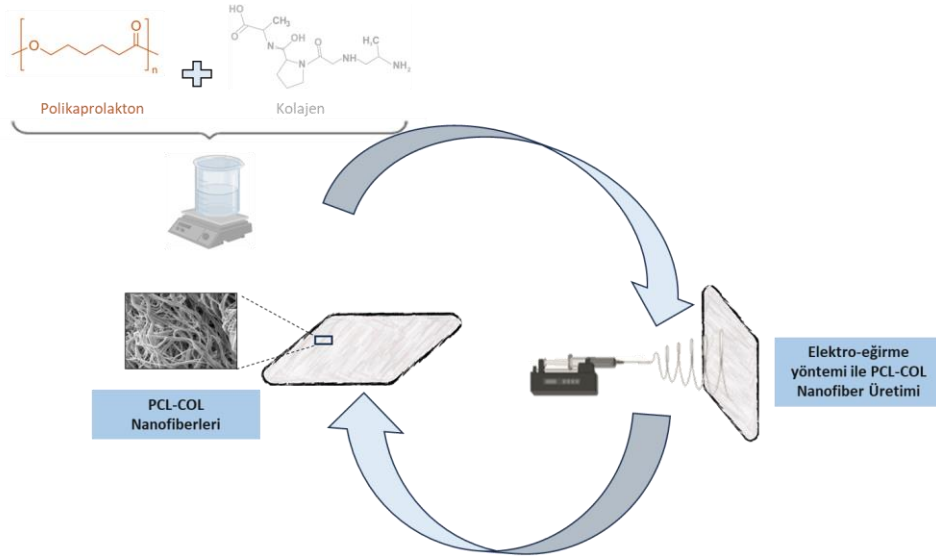
3B baskı için 2 mm kalınlığında ve 10 × 10 mm tabanlı bir model, bilgisayar destekli tasarım yazılımı *SolidWorks 2020* (Dassault Systèmes SE, Vélizy-Villacoublay, Fransa) kullanılarak tasarlanmıştır. Tasarım, .stl dosya formatına dönüştürülmüştür ve 3B yazıcı yazılımı *Chitubox* (Shenzhen Chuangbide Technology Co., Ltd, Shenzhen City, Çin) kullanılarak dilimlenmiştir. 60 saniye pozlama süresine, 12 mW cm⁻² ışık yoğunluğuna ve 405 nm görünür ışık dalga boyuna sahip 3B DLP yazıcısı kullanılmıştır. Üretilen 3B yazdırılmış hidrojel, SEM çalışması için -20°C'de 1 gün tutularak, ardından 1 gün liyofilizatörde kurutulmuştur. Diğer karakterizasyon çalışmaları için oda sıcaklığında bir kaptaki saklanmıştır.



Şekil 3.2 GelMA-CIP hidrojel DLP 3B yazıcı ile üretiminin şematik gösterimi

3.5 PCL-COL Çözeltilerinin Hazırlanması ve Elektro-eğirme İşlemi

Elektro-eğirme solüsyonlarını hazırlamak için %15 (w/v) PCL ve %15/5 (w/v) PCL/COL solüsyonları 24 saat boyunca 450 rpm'de %90 asetik asit solüsyonunda çözülmüştür. Daha sonra solüsyonlar 21 kalibre metal iğneye bağlı 10 ml'lik plastik şırıngalara beslenmiştir. PCL ve PCL/COL nanofiberlerini üretmek için laboratuvar ölçekli bir cihaz kullanılmıştır. Elektro-eğirme işlemi için deneysel parametreler 18 kV voltaj, 1 ml h^{-1} akış hızı ve iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 12,5 cm olacak şekilde optimize edilmiştir. Tüm elektro-eğirme işlemleri ortam koşullarında gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çift katmanlı bir iskele elde etmek için nanofiberler $10 \times 10 \text{ mm}$ boyutlarında kesilmiştir. 3B basılan hidrojellerin daha nemliken nanofiberlerle birbirine yapışması sağlanmıştır.



Şekil 3.3 PCL-COL nanofiberin elektro-eğirme ile üretiminin şematik gösterimi

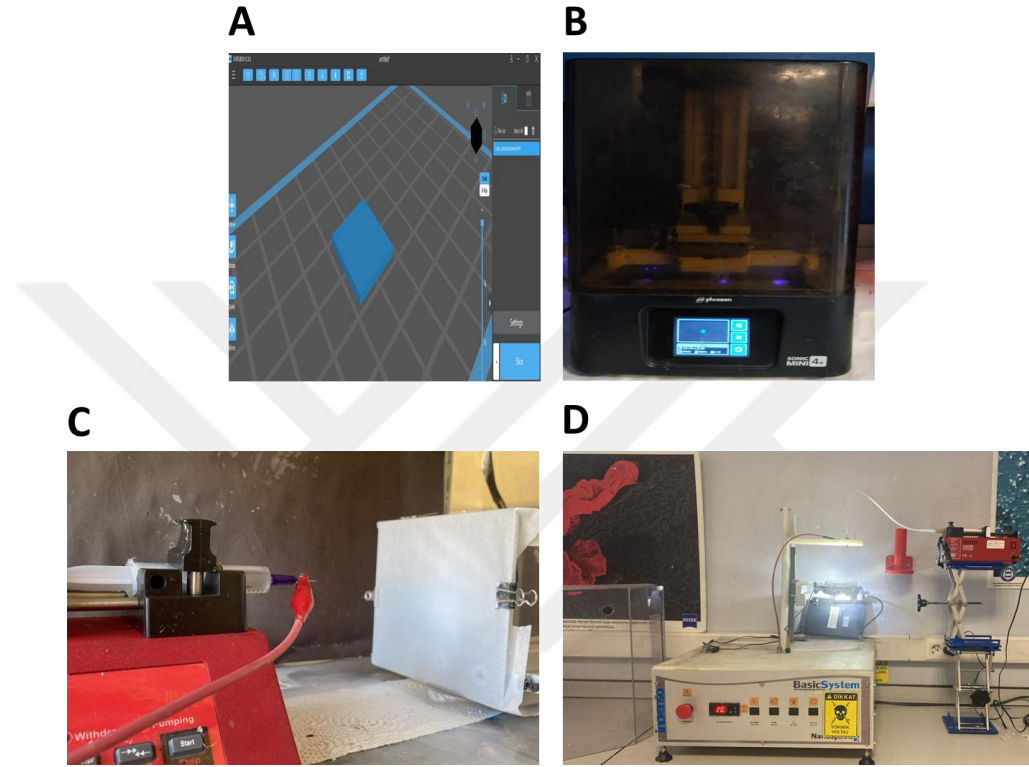
3.6 Elektrosprey Yöntemi ile Hidrojel ve Nanofiberlerin Nanopartikül Kaplaması

Hem hidrojel ve nanofiber katmanları hem de çift katmanlı doku iskelesini nanopartiküller ile biyofonksiyonel hale getirmek için elektrosprey yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak, 95 °C'de 1 saat boyunca dsu:etanol (9:1 v/v) içerisinde %1 (w/v) PVA çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra nanopartikül içerisine eklenecek büyüme faktörleri için solüsyonlar üreticinin açıklamasına göre hazırlanmıştır. EGF için; 500 ug EGF 500ult trehaloz da çözünerek ve 20 ult lik alikotlanmıştır. 10ug TGFβ3 100ult BSA da çözünerek ve 10ult alikotlanmış ve çalışma zamanına kadar -20°C'de saklanmıştır. Büyüme faktörlü solüsyonlar; 2 ayrı %1 PVA solüsyonu içerisine EGF (100 ng/mL) ve TGFβ3 (100 ng/mL) (v:v) ihtiva edecek şekilde hafifçe pipetaj yapılarak hazırlanmıştır. Sadece *in vitro* kültürün ilk haftasında yüksek dozda TGFβ3 (100 ng/ml) verilmesinin, düzenli dozajda (10 ng/ml) sürekli TGFβ3 takviyesi verilen yapılara kıyasla, doku iskelesi üzerinde insan MKH'lerin 9. haftaya kadar benzer miktarda kıkırdak matrisi birikimine yol açtığı bildirilmiştir [48].

Elektrospreyleme için deneysel parametreler 21-25 kV voltaj aralığı, 0,1-0,2 mL/saat akış hızı aralığı, 18-gauge iğne ile toplayıcı arasında 15 cm mesafe olacak şekilde optimize edilmiştir. Öncelikle 3B basılmış hidrojel toplayıcıya yerleştirilerek yaklaşık 2 saat boyunca hidrojel grupları EGF'li solüsyon kullanılarak nanopartiküller ile kaplanması sağlanmıştır. İşlem sonucunda

karakterize edilecek 2 farklı grup elde edilmiştir. Bunlar; GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF'dir.

Daha sonra aynı işlem nanofiberlere TGFβ3'lü solüsyonu kullanılarak uygulanmıştır. İşlem sonucunda karakterize edilecek 2 farklı grup elde edilmiştir. Bunlar; PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3'dir.



Şekil 3.4 Katmanların üretimi ile ilgili görseller: (A) Chitubox görsel, (B) DLP 3B basımı, (C) elektro-eğirme ile nanofiber üretimi, (D) elektrosprey ile nanopartikül kaplama işlemi

3.7 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Hem hidrojel grubunun CIP, PVA, GelMA, GelMA-CIP, GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hem de nanofiber grubunun COL, PVA, PCL, PCL-COL, PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 kimyasal yapısını karakterize etmek için Fourier-transform kızılötesi spektroskopisi kullanılmıştır. FTIR spektrumları 4 cm^{-1} çözünürlükte ve $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ tarama aralığında toplanmıştır.

3.8 Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

GelMA/PCL, GelMA-CIP/PCL-COL, GelMA@PVA/PCL@PVA, GelMA-CIP@PVA/PCL-COL@PVA, GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGF β 3 ve GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 örnekleri (her biri ~3 mg) alüminyum tepsilere yerleştirilerek ve 10°C/dakika azot gazı altında 20-300°C arasında ısıtılarak diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak termal olarak karakterize edilmiştir.

3.9 Doku İskelelerinin Morfolojik Özellikleri

GelMA, GelMA-CIP hidrojelleri, PCL, PCL-COL nanofiberleri, GelMA/PCL ve GelMA-CIP/PCL-COL iskeleleri ve elektrosprey ile kaplanmış çift katmanlı doku iskelesinin GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 yüzey morfolojileri bir taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Numuneler bir spreylama makinesi kullanılarak 60 saniye boyunca altınla kaplanarak elektriksel alan kazandırılmıştır. Örneklerin yüzey morfolojilerinin yanı sıra gözenek, fiber ve partikül çaplarının histogramları da çıkarılmıştır. Hidrojellerin ortalama gözenek çapı ve nanofiberlerin ortalama fiber çapı Image J yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Çapları ölçmek için SEM görüntülerinden en az 100 gözenek çapı ve 100 fiber çapı kullanılmıştır.

Ayrıca GelMA-CIP hidrojel üzerindeki @PVA-EGF nanopartiküllerin ortalama partikül çapı ve PCL-COL@PVA-TGF β 3 nanofiberin ortalama fiber çapı Image J yazılımı kullanılarak en az 100 partikül çapı ve 100 fiber çapı ölçülerek SEM görüntülerinden belirlenmiştir.

3.10 Doku İskelelerinin Mekanik Özellikleri

GelMA@PVA-EGF, GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojelleri, PCL@PVA-TGF β 3, PCL-COL@PVA-TGF β 3 nanofiberleri, GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGF β 3, GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGF β 3 çift katmanlı doku iskelelerin mekanik özellikleri mekanik test makinesi kullanılarak incelenmiştir.

Basınç testi hidrojel numunelerine uygulanmış; test için 6 mm yüksekliğinde ve 8 mm çapında silindirik hidrojeller basılmıştır. Basınç testleri dakikada 1 mm hızla ve %50 maksimum gerinime kadar gerçekleştirilmiştir.

Nanofiber ve çift katmanlı doku iskele numuneleri üzerinde çekme testi gerçekleştirilmiştir. Çekme testlerinden önce, 10×50 mm nanofiber numunelerin kalınlığı dijital bir mikrometre kullanılarak ölçülmüştür. Çekme deneyleri $5 \text{ kN} \pm \%0,5$ yük hücresi ile 5 mm dk^{-1} hızda ve $1 \text{ } \mu\text{m}$ yer değiştirme çözünürlüğünde oda sıcaklığında (23°C) gerçekleştirilmiştir.

3.11 Doku İskelelerinin Şişme Davranışı

Şişme ölçümleri; hidrojellerin, nanofiberlerin ve çift katmanlı iskelelerin su alma kapasitelerini belirlemek için pH 7,4'te PBS'de gerçekleştirilmiştir. Test sırasında, hidrojellerin ve nanofiberlerin başlangıç ağırlıkları (W_0) ilk gün tartılarak kaydedilmiştir. Numuneler daha sonra 2 ml PBS içeren Eppendorf tüplerine aktarılmış ve bir termal çalkalayıcıda 37°C 'de tutulmuştur. Belirli bir süre sonra (hidrojeller için 5, 15, 30, 45, 60 ve 90 dakika; nanofiberler için 1, 3, 5, 12 ve 24 saat; çift katmanlı iskeleler için 5, 15, 30, 45, 60 ve 90 dakika), numuneler fazla sıvıdan çıkarılarak numunelerin ıslak ağırlığı (W_w) tartılmıştır. Doku iskelelerinin şişme oranları (S) denklem (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$S = \frac{W_w - W_0}{W_0} \times 100 \quad (3.2)$$

3.12 Doku İskelelerinin Şişme Kinetiği

Hidrojel katmanlarındaki şişme kinetiğinin modellenmesi, hidrojel katmanlarındaki suyun difüzyonunu, şişme hızını ve şişmeyi etkileyen diğer kuvvetleri anlamak için çok önemlidir. Şişebilir ve retiküle polimerler için bir uygulama olan Fick yasası, şişme kinetiğinin en yaygın kullanılan temsili modellemesidir. Dengedeki doku iskelesinin ağırlığı (W_e) denklem (3.3) kullanılarak hesaplanmıştır. Bu denklemde; n , çözünen madde taşıma modunun üs karakteristiğidir ve k belirli bir hız sabitidir.

$$\frac{W_w}{W_e} = kt^n \quad (3.3)$$

$n = 0,5$, yarı-Fickian difüzyon mekanizması kullanılarak salınmayı temsil eder. Burada çözünen madde polimerden dışarı yayılır ve dinamik şişme ile ilişkili makromoleküler gevşemelere maruz kalsa bile yarı-Fickian difüzyon mekanizması

kullanılarak salınır. $n > 0,5$ olduğunda Fickian olmayan çözünen madde difüzyonu gözlenir. Psödo-case-II çözünen madde taşınımı $n = 1$ olarak adlandırılır. Fick yasası, hidrojellerin şişme davranışını modellemek için genişletilir. Se dengedeki şişmeyi, k'_s - k_s hız sabitlerini, n -m üsleri temsil eder. *MATLAB R2023*, doğrudan kinetikle ilgili olan model katsayıları S_e , k_s ve m 'yi elde etmek için kullanılmıştır. S_e , hidrojellerin maksimum şişmesi ile ilgilidir, k_s ve m , kinetik hakkında doğrudan bilgi verir. Daha düşük k_s ve daha yüksek m değerleri dengeye daha hızlı ulaşıldığını gösterir. Denklemler (3.4) ve (3.5) entegre edilmiştir.

$$\frac{dS(t)}{dt} = k'_s (S_e - S(t))^n \quad (3.4)$$

$$S(t) = S_e - k_s t^{-m} \quad (3.5)$$

3.13 Doku İskelelerinin Bozunma Davranışı

Hidrolitik bozunma testi içinde şişme analizinde kullanılan grupların aynısı kullanılmış ve pH 7,4'te PBS ile muamele edilmeden önceki başlangıç ağırlıkları (W_0) ilk gün ölçülmüştür. Numunelerin PBS ile belirlenen periyotlarda muamelesinden sonra PBS'den uzaklaştırılarak kurutulan (24 saat boyunca 40°C etüvde) doku iskelelerinin kuru ağırlıkları (W_d) olarak hesaplanmıştır. Hem hidrojel grubunun hem de nanofiber grubunun bozunma testi 1, 7, 14, 21. günlerde hesaplanmıştır. Bozunma değeri (B), aşağıdaki denklem (3.6) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$B = \frac{W_0 - W_d}{W_0} \times 100 \quad (3.6)$$

3.14 *In vitro* CIP Salınım Çalışması

GelMA-CIP hidrojellerinden CIP'nin salım profili PBS (pH 7,4) incelenmiştir. İlk olarak, CIP'in farklı konsantrasyonlardaki (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 µg/mL) doğrusal kalibrasyon eğrisi 190-400 nm dalga boyu aralığında belirlenmiştir. CIP miktarı salım analizi için ise 1 mL PBS (pH 7,4) içinde 37°C'de termal çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Hidrojel katmandaki CIP miktarı önceden belirlenmiş periyotlarda (0,25,

0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 ve 48 saat), 278 nm'de UV-vis spektrofotometresi ile absorbansı ölçülerek tespit edilmiştir. Her periyottan sonra numuneler salım çalışmalarının devamı için taze PBS ile değiştirilmiştir.

3.15 *In vitro* EGF ve TGFβ3 Salınım Çalışması

Büyüme faktörlerinin *in vitro* salım profilini değerlendirmek için GelMA@PVA-EGF, GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel ve PCL@PVA-TGFβ3, PCL-COL@PVA-TGFβ3 nanofiberlerinden 3 mg numune hazırlanarak 2 ml PBS (pH 7,4) içerisinde 37°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Önceden belirlenen zaman periyotlarında (1, 4, 14, 21 ve 28. günlerde), her numuneden 2 ml salım çözeltisi toplanmış daha sonra numunelerin üzerine 2 ml taze PBS eklenmiştir. Toplanan solüsyonlar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Toplanan solüsyonlardaki büyüme faktör seviyeleri, üreticinin talimatlarına göre EGF ELISA ve TGFβ3 ELISA kiti ile ölçülmüştür.

3.16 *In vitro* Salım Kinetikleri

Hidrojellerin EGF salınım kinetiği ve nanofiberlerin TGFβ3 salınım kinetiği de *MATLAB R2023a* kullanılarak araştırıldı. Büyüme faktörü salınım kinetiğinde en yaygın kullanılan modeller salınım verilerine uygulandı. Formüllerde, Q kümülatif ilaç salınımıdır (%), Q_0 ilk ilaç salınımıdır, K bireysel modeller için hız sabitidir ve t zamandır. Aşağıdaki sıfırıncı derece (Denklem 3.7), birinci derece (Denklem 3.8-3.9), Korsmeyer-Peppas (Denklem 3.10) ve Higuchi (Denklem 3.11) denklemleri verilmiştir.

$$Q = Q_0 + Kt \quad (3.7)$$

$$\frac{d(100 - Q)}{dt} = -K(100 - Q) \quad (3.8)$$

$$Q = 100 - (100 - Q_0) e^{-Kt} \quad (3.9)$$

$$Q = K \log(t) + Q_0 \quad (3.10)$$

$$Q = Q_0 + K t^{0.5} \quad (3.11)$$

3.17 Performans Ölçümleri

Model performansı, R^2 ve hataların karesinin ortalamasının karekökü (RMSE) değerlerinin hesaplanmasıyla değerlendirildi. R^2 , model ile veriler arasındaki korelasyon derecesini verirken, RMSE, model tahminleri ile gerçek değerler arasındaki ortalama farkı ölçerek hedef değeri tahmin etmedeki doğruluğun bir değerlendirmesini sağlar (Denklemler 3.12-3.13). Burada y_i deneysel veridir, $\hat{y}_i$ deneysel veri için model tarafından hesaplanan değerdir, $\bar{y}$ tüm deneysel verilerin ortalamasıdır ve m örnek sayısıdır. Son olarak, elde edilen modeller ve performansları birbirleriyle karşılaştırılarak en iyi performans gösteren model, deneysel belirsizlikleri vurgulamak için %95 tahmin sınırlarıyla gösterilmiştir.

$$R^2 = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y})^2} \right] \quad (3.12)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}{m}} \quad (3.13)$$

3.18 *In vitro* Antimikrobiyal Aktivite

GelMA-CIP hidrojenlerinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853'e karşı antibakteriyel aktivitesi Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853'ün bir gecelik kültürleri Mueller-Hinton agar plakalarına yayılmıştır. 6 mm'lik dilimlere kesilen GelMA-CIP hidrojenleri UV ışığında (254 nm) 1 saat sterilizasyonu yapıldıktan sonra daha sonra agar plakalarına yerleştirilerek ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. CIP içeren disk (5µg) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Zon çapları ölçülerek diskler etrafındaki inhibisyon zonları belirlenmiştir. Antimikrobiyal analiz sonucunda belirlenen en etkili ilaç konsantrasyonuna göre ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.19 Sitouyumluluk Çalışmaları

3.19.1 Hücre Canlılığı

Biyouyumluluğu değerlendirmek için insan KİMKH'ler kullanılmıştır. Hücreler, 2 mM L-glutamin, 1x penisilin-streptomisin-fungizon ve %10 fetal sığır serumu eklenmiş DMEM/F-12 ortamında büyütülmüştür. Hücreler, %5 CO₂ içeren 37°C'de nemli bir inkübatörde tutulmuştur. ISO 10993-5 standartlarına ("Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirmesi-Bölüm5: *in vitro* sitotoksosite testleri") göre sitotoksositeyi değerlendirmek için, çift katmanlı iskeleler (5 mm çapında) üretilmiş ve 24 saat boyunca 37°C'de 1 mL kültür ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, ekstraktlar toplanarak ve sterilizasyon için 0,22 µm polietersülfon (PES) membranlar kullanılıp filtrelenmiştir. KİMKH'ler, 96 kuyulu plakalara kuyu başına 1×10^4 hücre yoğunluğunda ekilmiş ve 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe bir gece boyunca yapışmaya bırakılmıştır. Kültür ortamı daha sonra 100 µL filtrelenmiş iskele özütü ile değiştirilmiştir. Aynı koşullar altında inkübe edilen, işlem görmemiş kültür ortamına sahip bir grup kontrol olarak görev yapmıştır. Hücre canlılığı, 1, 4 ve 7 günlük aralıklarla MTT testi ile değerlendirilmiştir. Her aralıkta, her kuyuya 10 µL MTT çözeltisi (son konsantrasyon: 0,5 mg/mL) eklenmiş ve ardından 37°C'de 4 saatlik bir inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyonun ardından MTT çözeltisi çıkarılarak, formazan kristallerini çözmek için 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiştir. 570 nm'deki absorbans bir ELISA plaka okuyucusu ile ölçülmüştür. Hücre canlılığı aşağıdaki 3.4 denklemi kullanılarak belirlenmiştir:

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{\text{Optik Yoğunluk}_{570} \text{ Numune}}{\text{Optik Yoğunluk}_{570} \text{ Kontrol}} \times 100 \quad (3.14)$$

Burada, optik yoğunluk numune 570, 570 nm'de gruplara uygulanan doku iskelesi özütü numunelerinin absorbansıdır; optik yoğunluk kontrol 570, 570 nm'de kontrol grubunun absorbansıdır.

3.19.2 3B Hücre Kültüründe Floresan Mikroskobu Analizleri

Hücre yapışmasını ve dağılımını değerlendirmek için, KİMKH'lar çift katmanlı doku iskelesinin her katmanına ekilerek ve 7 gün boyunca kültürlenmiştir. 7. günde, örnekler PBS (7,4) ile durulanarak daha sonra oda sıcaklığında 15 dakika boyunca %4 para formaldehitte sabitlenmiştir. Hücreler daha sonra 10 dakika boyunca %0,1

Triton X-100 ile permeabilize edilerek nükleer görüntüleme için DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile boyanmıştır. PBS (7,4) yıkamasının ardından, örnekler doku iskele katmanları boyunca hücre yapışmasını, büyümesini ve dağılımını incelemek için bir floresan mikroskobu ile fotoğraflanmıştır.

3.19.3 3B Hücre Kültüründe SEM Analizi

7. günde, KİMKH'lar ve doku iskele örneklerinin, hücre morfolojisi ve yapışmasını değerlendirmek için SEM incelemesi yapılmıştır. Örnekler, hücresel bileşenlerin çapraz bağlanmasını kolaylaştırmak için oda sıcaklığında 2 saat boyunca %2,5 glutaraldehit ile sabitlenmiştir. Sabitlemeden sonra, örnekler PBS ile yıkanarak ve her biri 10 dakika boyunca bir dizi etanol konsantrasyonunda (%30, %50, %70, %90 ve %100) kademeli olarak dehidrate edilmiştir. Dehidrate edilen örnekler, iletkenliği artırmak için püskürtme ile ince altın kaplanmış, hücre-doku iskelesi etkileşimlerini ve yüzey morfolojisini incelemek için görüntülenmiştir.

3.19.4 Histolojik Analiz

Histolojik analiz için doku iskelesi katmanlarındaki ECM üretimi değerlendirilmiştir. 14. günde, GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katmanları, hücresel dağılımı ve morfolojiyi değerlendirmek için hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanmıştır. Glikozaminoglikan (GAG) birikimini ve matris gelişimini değerlendirmek için PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 katmanlarında 1., 14. ve 28. günlerde Alcian mavisi ile boyama yapılmıştır. Doku iskeleleri sabitlenerek doğrudan boyanmıştır. Doku iskele örnekleri PBS ile yıkanarak daha sonra oda sıcaklığında 30 dakika boyunca %4 paraformaldehit içinde sabitlenmiştir. GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katmanları hematoksilin içinde 5 dakika inkübe edilmiştir, ardından musluk suyu ile yıkanmıştır ve ardından 2 dakika boyunca eozin ile karşıt boyama yapılmıştır. Fazla lekeler yıkama yoluyla ortadan kaldırılmıştır. PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 katmanlarında ise, fazla boyayı ortadan kaldırmak için damıtılmış suyla yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca %1'lik Alcian mavisi solüsyonunda (pH 2,5) inkübe edilmiştir. Boyalı doku iskeleleri, her iki katmandaki hücresel bağlanmayı, dağılımı ve ECM oluşumunu değerlendirmek için ters ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ts2) kullanılarak incelenmiştir.

3.20 İstatiksel Analiz

İstatistiksel analiz çalışmalara uygun olacak şekilde *GraphPad Prism 9.3.0* yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler en az üç kopya olarak gerçekleştirilmiş ve veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir.

DSC ve Şişme denge karşılaştırılma verilerinin istatistiksel analizi, Tukey'nin çoklu karşılaştırma testi tek yönlü ANOVA ile gerçekleştirilmiştir. Mekanik analizler için istatistiksel analiz, eşleştirilmemiş t testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şişme, bozunma ve sito-uyumluluk verilerinin istatistiksel analizi, Tukey'nin çoklu karşılaştırma testi iki yönlü ANOVA ile gerçekleştirilmiştir. Gösterilen grafiklerde p değerini belirtmek için uygun semboller kullanılmıştır: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kimyasal Özellikler

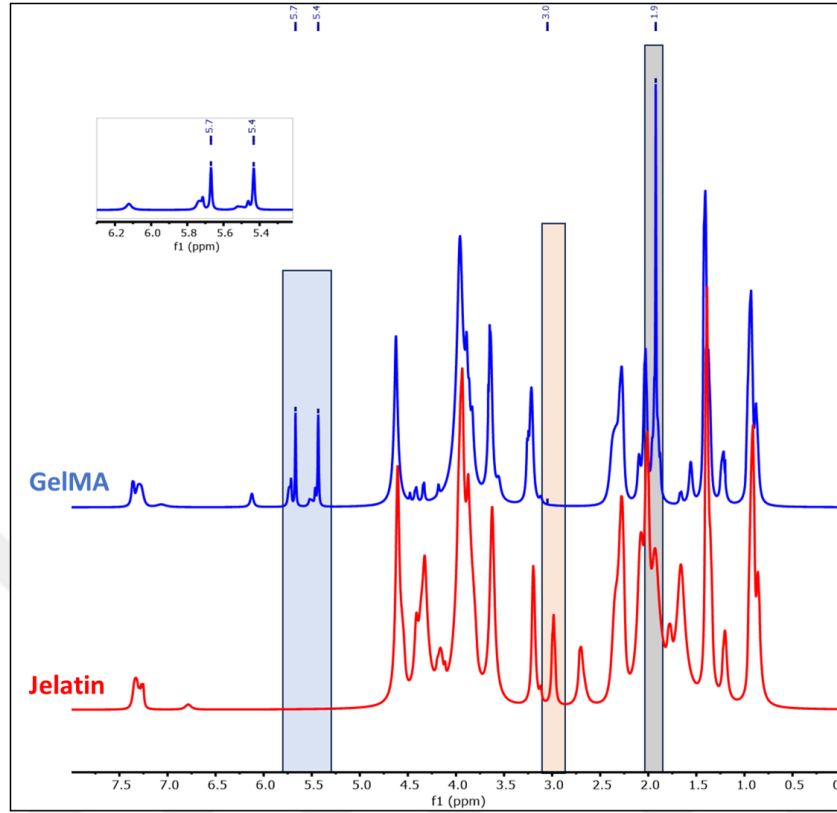
4.1.1 GelMA'nın Metakrilatlanma Derecesinin Belirlenmesi

MA'nın ana hedefi polipeptit omurgasındaki reaktif amin grupları olduğundan [222] GelMA'nın DS'sini belirlemek için $^1\text{H-NMR}$ ve TNBS analizi yapılmıştır. DS'in, jelatinin farklı hayvansal kaynaklarına ve bunların ekstraksiyon sürecine, jelatin/MA konsantrasyon oranına, çözücü türü, sıcaklık, reaksiyon pH'sı ve süre gibi reaksiyon koşullarına bağlıdır [223].

$^1\text{H-NMR}$ analizi *MestReNova* yazılımı (v12.0.2) kullanılarak, metakriloil gruplarıyla jelatinin başarılı bir şekilde ikame edildiğini doğrulamak için yapılmıştır (Şekil 4.1). Analizden önce otomatik faz ve temel doğrulama yapılarak ve kimyasal kayma, döteryum oksit çözücü pikinin 4,79 ppm değerine referansla düzeltilmiştir. Analiz sonucunda jelatinin yapısındaki lizin amino asidindeki fonksiyonel amino gruplarının metakrile edildiği doğrulanmıştır. 6,1 ppm de gözlenen pik, hidroksil grupları aracılığıyla metakrilatizasyonun meydana geldiğine atfedilir [157]. Metakrilizasyondan kaynaklanan metakrilamid greftlerinin akrilik protonları (2H) piklerine atfedilen pikler 5,4 ve 5,7 ppm gözlenmiştir. Metakrilamidin metil protonlarının (3H) piklerine atfedilen pikler 1,9 ppm gözlenmiştir. Jelatin içindeki lizin metilene (2H) ait 3,06 ve 2,90 ppm kayma değerlerindeki tepe, metakrilasyon ile yok olmuştur [224]. DS hesaplaması için fenilalanin sinyalleri (7,41 - 7,25) referans alınarak GelMA'da lizin metilen alan değeri 0 olarak elde edildiğinden DS değeri %100 olarak hesaplanmıştır.

TNBS sonuçlarına göre, $90,4 \pm 2,9$ Gelatin'nin amino grupları reaksiyona girmiştir. $^1\text{H-NMR}$ analizine göre TNBS'de daha düşük DS değerinin; $^1\text{H-NMR}$

spektrum sinyalinde kalan serbest lizin gruplarının etkili bir şekilde belirlenememesine atfedilmektedir [158], [225].



Şekil 4.1 Jelatin ve GelMA örneklerinin ^1H -NMR spektrumları. 5,7 ppm, 5,4 ppm ve 1,9 ppm'de gözlenen pikler proteinde metakrilasyonun varlığını gösterirken GelMA'daki 3,0 ppm'deki pikin jelatine göre yok olması lizin gruplarının yok olmasına işaret etmektedir

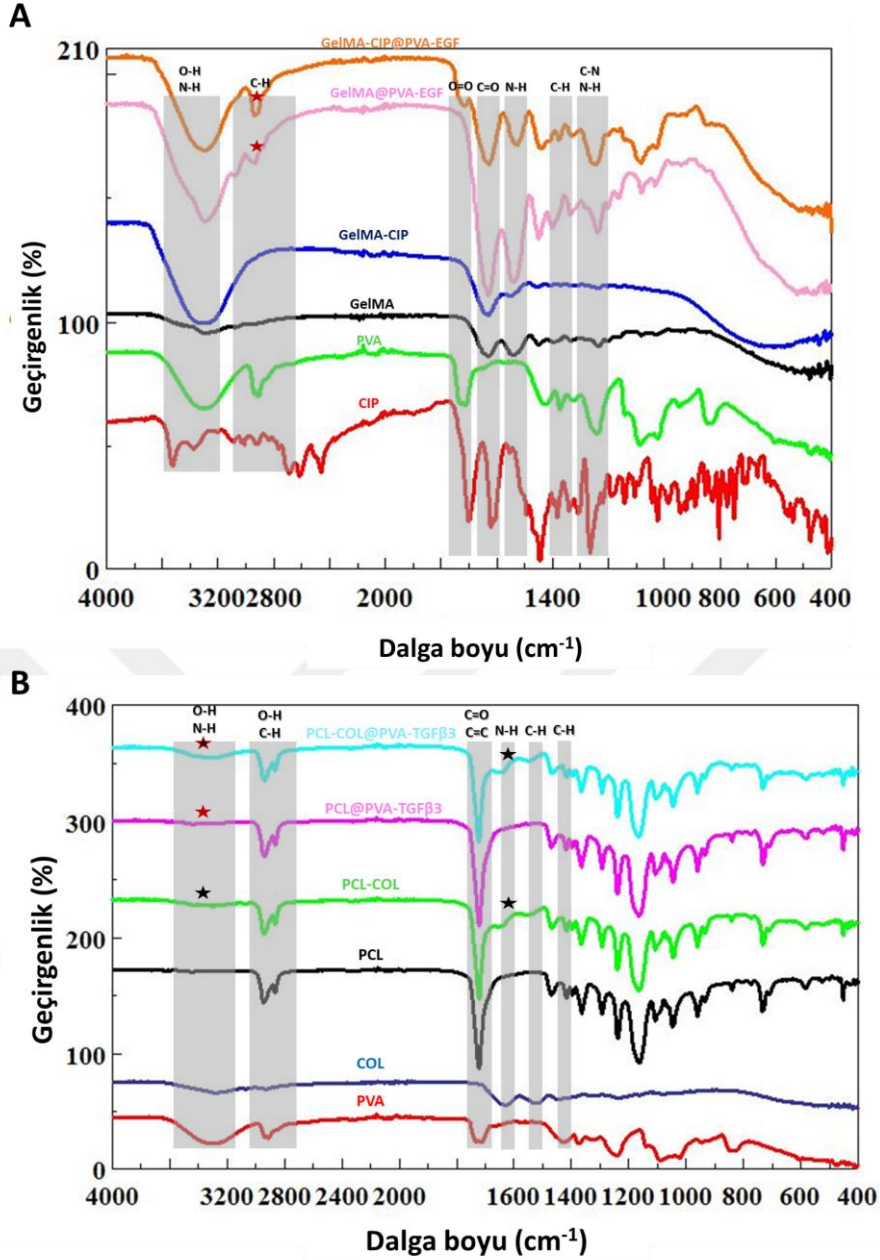
4.1.2 FTIR Analizi

FTIR analizi biyomalzemenin kimyasal bileşimini karakterize ederek doku mühendisliği uygulamalarında potansiyelini ortaya koymada önemlidir. Çalışmamızda kullanılan hidrojel, nanofiberler ve çift katmanlı doku iskelesinin yapısındaki CIP, PVA, EGF ve TGF β 3 varlığı doğrulanarak, biyomalzemelerdeki fonksiyonel gruplar ve kimyasal etkileşimler hakkında değerli bilgilere ulaşılmıştır (Şekil 4.2).

GelMA spektrumu için, 3294 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1537 cm^{-1} ve 1234 cm^{-1} 'deki karakteristik bantlar sırasıyla peptit bağlarının (N-H gerilmesi) ve -OH fonksiyonel grupları, C=O germe grupları, N-H bükülme grupları, C-N gerilmesine ve N-H bükülmesine karşılık gelen piklere atfedilebilir [226]. CIP spektrumu için, OH gruplarının gerilme titreşimini ve moleküller arası hidrojen bağını karakterize eden

3350 ve 3300 cm^{-1} arasında belirgin tepe noktasına atfedilebilir. 1000 ila 1700 cm^{-1} arasında çok çeşitli çift bağlı fonksiyonel grupların varlığına atfedilebilir. 1650 ve 1600 cm^{-1} arasındaki pik, kinolonlara ait olan antibiyotiği karakterize edilebilir. 1400 ila 1350 cm^{-1} arasındaki pik ise C-O temsil edebilir. 1250 ile 1200 cm^{-1} 'deki pik karboksilik asidin varlığı O-H grubunun eğilme titreşimine atfedilebilir [227]. Saf PVA spektrumu için, 3290 cm^{-1} , 2908 cm^{-1} , 1714 cm^{-1} ve 1427 cm^{-1} 'deki karakteristik bantlar sırasıyla O-H gerilmesi, alkil gruplarının C-H gerilmesi, C=C ve C-H bükülme titreşimine atfedilebilir [228], [229]. GelMA spektrumuyla karşılaştırıldığında GelMA@PVA-EGF'nin spektrumunda önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu, GelMA hidrojelindeki düşük yüzey kaplamasına atfedilebilir. Ayrıca GelMA@PVA-EGF'in ve GelMA-CIP@PVA-EGF'in spektrumunda hem GelMA'ya hem de PVA özel piklerin varlığı elektrosprey ile kaplamanın başarısını gösterir.

PCL spektrumu için 2943 cm^{-1} , 2866 cm^{-1} , 1712 cm^{-1} 'deki karakteristik bantlar sırasıyla O-H gerilmesi, C-H gerilmesi ve C=O esterin karbonil grubunun yapısındaki gerilime atfedilebilir [230]. Kolajen spektrumu, 3285 cm^{-1} 'de N-H gerilmesiyle, 1628 cm^{-1} ve 1524 cm^{-1} 'de N-H düzlem içi bükülme ve C-N gerilme pikine atfedilebilir [231]. Aynı durum PCL ve PCL-COL spektrumlarıyla PCL@PVA-TGF β 3 ve PCL-COL@ PVA-TGF β 3'ün karşılaştırılmasında da önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu, fiberlerin düşük yüzey kaplamasına atfedilebilir. Büyüme faktörü nanopartiküller ile kaplanan grupların spektrumları incelendiğinde tepe noktalarında hafif kaymalar görülmüş fakat büyüme faktörlerinin karakteristik pikleri tespit edilememiştir. Bu da nanopartiküllerinin düşük varlığına atfedilebilir. Şekil 4.2 A ve B'de kırmızı yıldızlar PVA varlığına yorumlanabilir. Şekil 4.2 B'deki siyah yıldızlar COL varlığına yorumlanabilir. Hem PVA ile kaplamanın hem de COL ve PCL'in kompozitinin başarıyla gerçekleştirildiğine atfedilebilir. FTIR sonuçları kompozit haline getirilen tüm malzemelerin (GelMA-CIP, GelMA@PVA-EGF, GelMA-CIP@PVA-EGF, PCL-COL, PCL@PVA-TGF β 3, PCL-COL@PVA-TGF β 3) karakteristik özelliklerini taşıdığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.2 FTIR spektrumları: (A) hidrojel katman, (B) nanofiber katman

4.2 Termal Özellikler

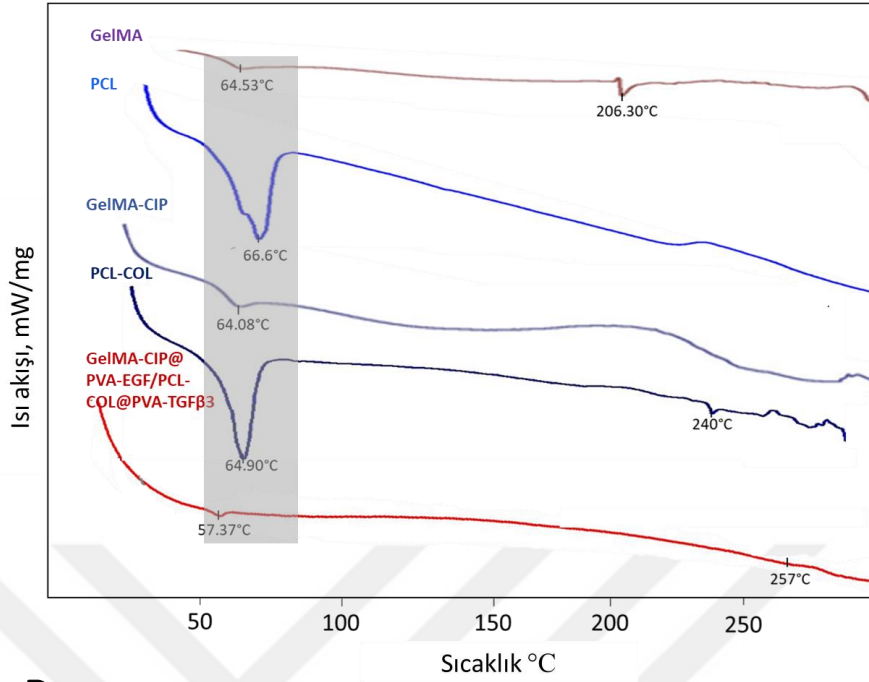
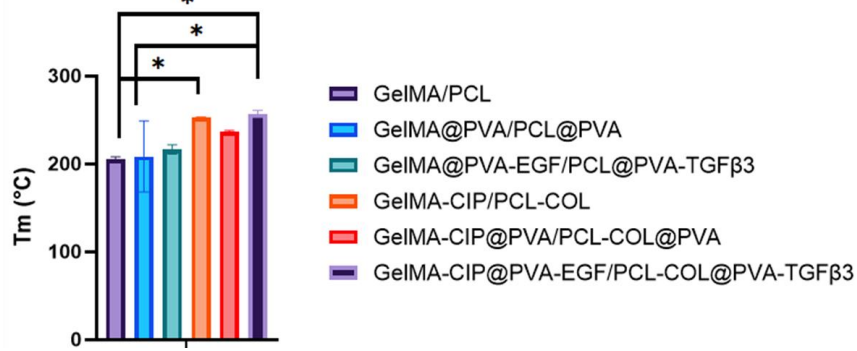
Malzemenin moleküler erime sıcaklığı (T_m) değerlendirmek için DSC kullanılmıştır. GelMA ve COL'ün fizikokimyasal özellikleri hem jelatin kaynağına hem de metakrilasyon seviyesine bağlıdır [222], [232]. GelMA ve COL malzemelerin peptit doğasına atfedilen $\sim 220,00^\circ\text{C}$ civarında örtüşen T_m değerine sahiptir [233], [234], [235]. PCL'in T_m değeri literatürde kesin bir şekilde sabittir ve $60\text{-}70^\circ\text{C}$ aralığındadır [161]. Grafikte gösterilmeyen; PVA $\sim 210\text{-}218^\circ\text{C}$ civarındaki T_m derecesine sahiptir [236], [237]. COL'ün ise literatürde beyan

edilen iki tepe noktası olduğu bunlardan ilkinin Td (denatürasyon sıcaklığına) karşılık gelirken ikincisinin ise Tm karşılık geldiği rapor edilmiştir. Td değeri için ortalama 50-150°C Tm değeri için ortalama 150-250°C [234], [235]. Td farklılıkların COL ekstraksiyon teknikleri, amino asit içeriği ve anatomideki farklılıklara bağlanabilir [232].

Şekil 4.3A'da GelMA hidrojel için 64,53°C ve 206,30°C sırasıyla nem kaybı tepesi ve Tm'den kaynaklanan iki geçiş bandına atfedilebilir. GelMA-CIP hidrojel için 64,08°C bandı nem kaybı tepesine atfedilebilir. PCL nanofiber 66,6°C Tm sahip tek bir eğri gözlenirken, PCL-COL nanofiber için 64,90°C ve 240°C iki eğri gözlenmiştir. Asetik asit içerisinde çözünerek elektro-eğirme yoluyla hazırlanmış PCL ve PCL-COL nanofiberlerin tümü PCL'in Tm'sinde nispeten düşüş gözlemlenmiştir. Böylece PCL ve COL'in amorf halde asetik asit ile karıştığı sonucuna varılabilir [238]. FTIR ve DSC çalışmasının sonuçları, COL'ün PCL içerisine başarılı bir şekilde dahil edildiğini göstermektedir.

GelMA/PCL, GelMA-CIP/PCL-COL, GelMA@PVA/PCL@PVA, GelMA-CIP@PVA/PCL-COL@PVA, GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3, GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 tüm çift katmanlı doku iskeleleri için genel olarak iki tepe noktası gözlemlenmiştir. İlk tepe noktası 52-60°C aralığındadır bu da hidrojel katman için GelMA'nın nem kaybı noktası, heliks-bobin geçişiyle birlikte su buharlaşmasına ve protein bozulmasına atfedilebilir [222], [239]. Ayrıca fiber katman için PCL'in Tm derecesine atfedilebilir.

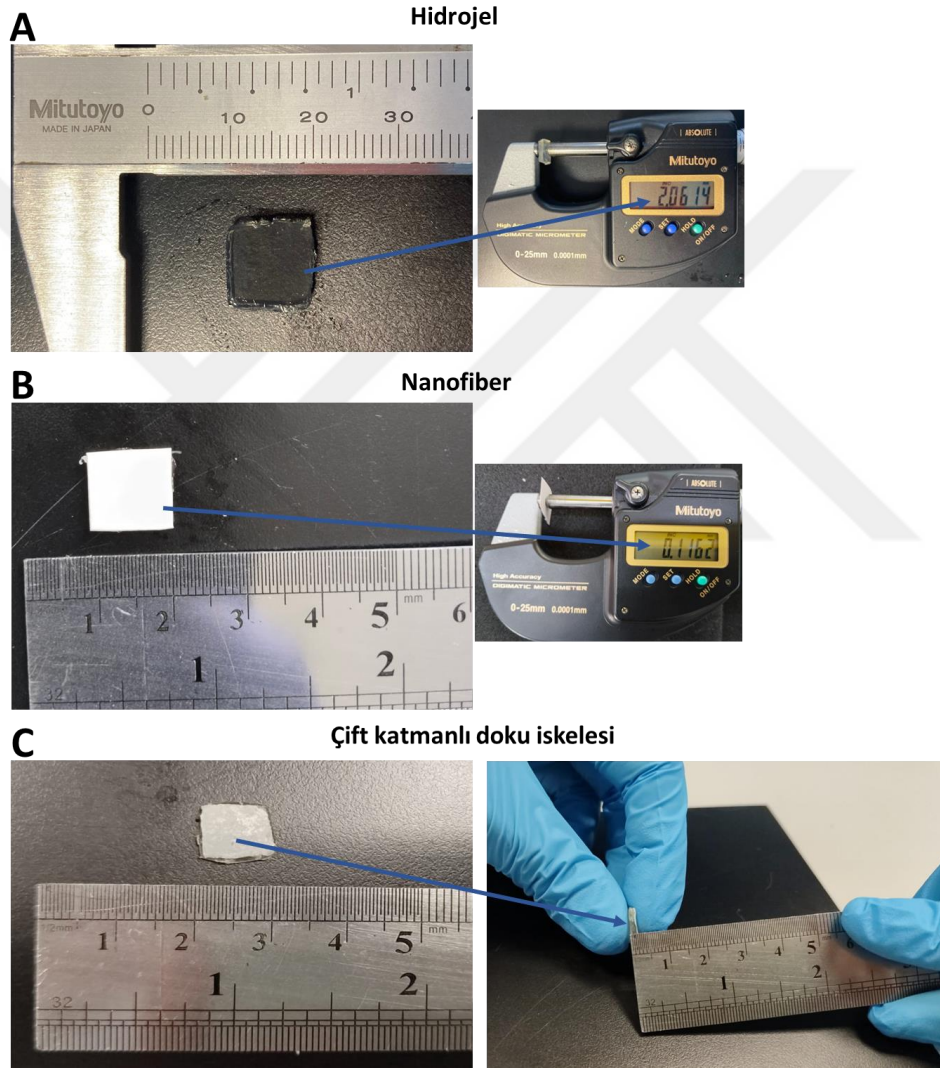
GelMA-CIP/PCL-COL çift katmanlı doku iskeleleri GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 çift katmanlı doku iskeleleri karşılaştırıldığında nispeten daha az erime sıcaklığı göstermesi, fiberler ile hidrojeller arasındaki hidrojen bağı etkileşimlerinden ve Van der Waals kuvvetlerinden kaynaklanmasına atfedilebilir [240].

A**B****C**

Şekil 4.3 DSC Eğrileri: (A) hidrojeller/nanofiberler çift katmanlı iskelenin DSC eğrileri. (B) hidrojel katmanların nem kayıp sıcaklıkları, (C) çift katmanlı doku iskelelerinin Tm'leri. Bildirilen veriler üç tekrarın ortalamalarıdır. Veriler, Tukey'nin çoklu karşılaştırma testi ve tek yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel fark, * = $p \leq 0,05$ ile gösterilir

4.3 Morfolojik Özellikler

Hidrojellerin ve nanofiberlerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi ve mikrograflar Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterilmektedir. Ayrıca, hidrojel ve nanofiber katmanlarından oluşan çift katmanlı doku iskelelerinin genel görünümü, boyutu ve kalınlığı Şekil 4.4'de gösterilmektedir. Hidrojellerdeki gözenek boyutu, bozunma profilini, ilaç taşınımını, hücre penetrasyonu ve farklılaşması dahil olmak üzere yüksek hücresel aktiviteleri etkileyen önemli bir parametredir [241].



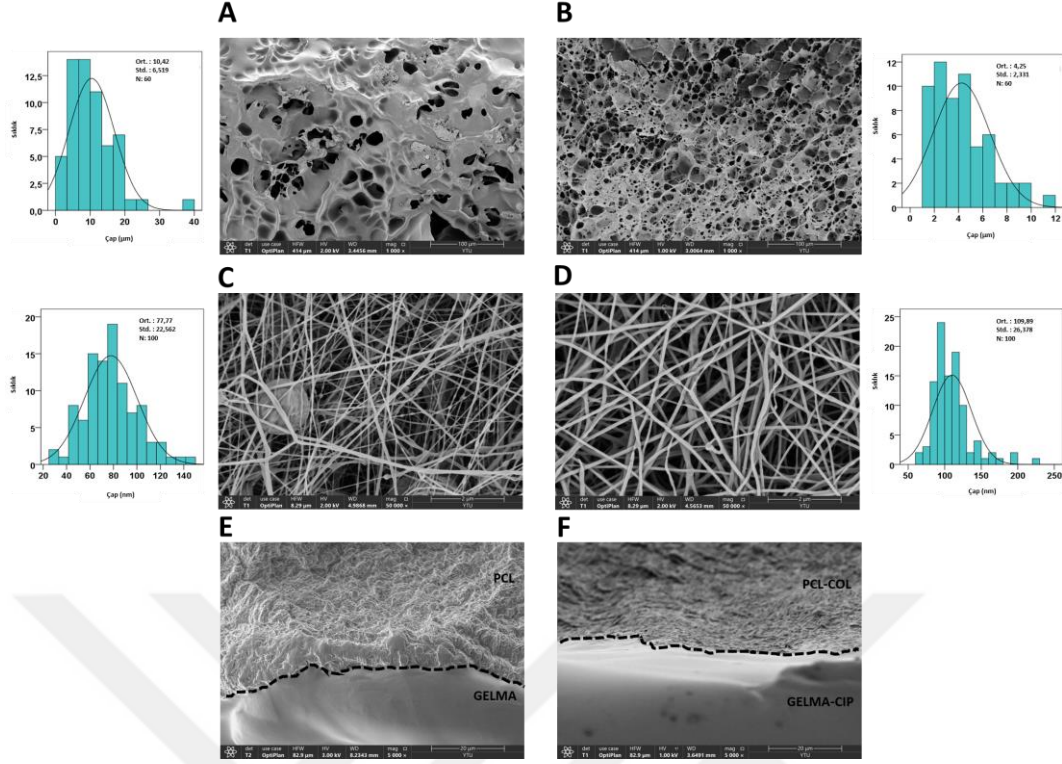
Şekil 4.4 Hidrojelin, nanofiberin ve çift katmanlı doku iskelesinin genel görünümü: (A) hidrojel katmanının boyutu ve kalınlığı, (B) nanofiber katmanının boyutu ve kalınlığı, (C) çift katmanlı doku iskelesinin boyutu ve kalınlığı

GelMA ve GelMA-CIP hidrojellerinin ortalama gözenek çapları sırasıyla $10,42 \pm 6,519 \mu\text{m}$ ve $4,26 \pm 2,331 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür (Şekil 4.5 A ve B). CIP ilavesi, GelMA hidrojelinin matris yoğunluğunu azaltarak daha gözenekli hale getirmiştir.

Bu sonuçlara göre, GelMA-CIP hidrojelinin GelMA'dan daha gözenekli bir yapıya sahip olduğu, ancak gözenek çaplarının daha küçük olduğu söylenebilir. Polimer zincirinde azalmanın neden olduğu bu durum, GelMA-CIP hidrojelinin mekanikğini değiştirmesi gerçeğine bağlanabilir. Dahası, bunun nedeni CIP çözeltisindeki HCl'nin ortamın asiditesini düşürebilmesi ve GeMA hidrojelinin omurgasındaki amin gruplarını ($-NH_2$) protonlayabilmesine atfedilebilir [242]. Bulgulara dayanarak, üretilen hidrojellerin gözenek boyutları ilaç taşıma ve doku mühendisliği iskeleleri olarak kullanılmaya uygundur [243]. Küçük gözenekler ($\sim 1-2 \mu m$) cilt yenilenmesinde epidermal hücre bağlanmasına yardımcı olduğu orta gözenekler ($\sim 2-12 \mu m$) dermal göçü desteklediği bildirilmiştir [244].

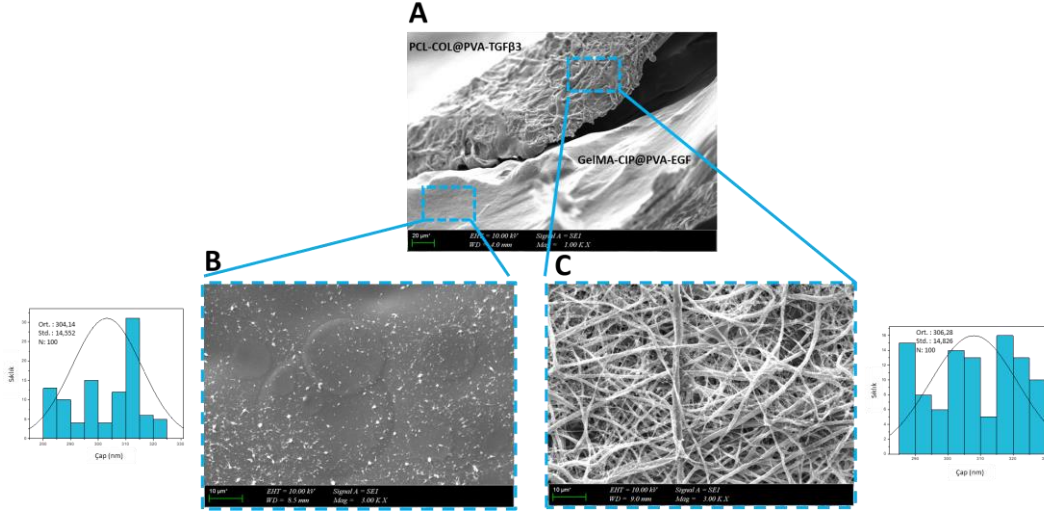
PCL ve PCL-COL yamalarının yüzey morfolojisi ve ortalama lif çapı, Şekil 4.5 C ve D'de gösterilmiştir. SEM görüntüleri, PCL ve PCL-COL liflerinin pürüzsüz bir yüzeye ve nispeten boncuksuz bir yapıya sahip düzgün bir fiber çapa sahip olduğunu göstermiştir. PCL ve PCL-COL elektro-eğrilmiş nanofiberlerin ortalama lif çapları sırasıyla $77,77 \pm 22,562 \text{ nm}$ ve $109,89 \pm 26,378 \text{ nm}$ olarak ölçülmüştür. PCL-COL çözeltisindeki polimer zincir konsantrasyonunun artırılması, nanofiber çapının artmasına neden olmuştur. Nanopartikül ile yapılan kaplamaların fiber çapını artırdığı sonucu literatürle de tutarlıdır [245], [199].

Çift katmanlı GelMA/PCL ve GelMA-CIP/PCL-COL doku iskelelerinin SEM görüntüleri Şekil 4.5 E ve F'de gösterilmiştir. Hem hidrojel katmanının hem de nanofiber katmanının birleştirildiğini göstermek için, GelMA ve GelMA-CIP hidrojellerinden oluşan katmanlar liyofilize edilmemiştir. Görüntülere dayanarak, sınır çizgisinin gösterdiği gibi hidrojel katmanının ve nanofiber katmanının birbirine başarılı bir şekilde nüfuz ettiği belirlenmiştir. Hidrojel katmanının ıslak ve nanofiber tabakası ince olduğundan, iki tabaka herhangi bir yapıştırıcı olmadan birbirine kolayca yapışmıştır. Bu durum SEM görüntülerinde görülebilir. Bu durum, GelMA ve GelMA-CIP yüzeyinde bulunan serbest amin grubu ile PCL ve PCL-COL polimerlerinin hızlı fiziksel çapraz bağlanmasıyla ilişkili olabilir [27]. Şekil 4.5 E ve F'de gösterildiği gibi, bu çalışmada önerilen çift katmanlı iskele, ECM'yi taklit etmek için uygun bir aday olarak düşünülebilir.



Şekil 4.5 Hidrojelin, nanofiberin ve çift katmanlı doku iskelesinin SEM görüntüleri: (A) GelMA hidrojel, (B) GelMA-CIP hidrojel, (C) PCL nanofiberler, (D) PCL-COL nanofiberler, (E) GelMA/PCL ve (F) GelMA-CIP/PCL-COL

Doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi tasarlanırken mümkün oldukça ECM'nin yapısını taklit etmesi hedeflenmektedir [246]. Elektrosprey kaplamadan sonra hidrojellerin, nanofiberlerin ve çift katmanlı doku iskelesinin morfolojisi SEM ile incelenmiş, mikrografları Şekil 4.6'da gösterilmektedir. SEM analizi hem çift katmanlı doku iskelesinin hem de diğer doku iskelesi katmanların düzgün bir morfolojiye sahip olduğunu, hava kabarcıkları veya kümelenmeler içermediğini doğrulamıştır. Şekil 4.5 F'de görüntülenen partikülsüz çift katmanlı doku iskelesinin Şekil 4.6 A'da görüntülenen partüküllü çift katmanlı doku iskelesinden daha pürüzsüz olması Şekil 4.6 A'da çift katmanlı doku iskelesinin partiküller ile kaplandığı anlamına gelebilir. Ayrıca hidrojel/nanofiber çift katmanlı doku iskelesinde iki katmanın duvarları ve gözenekleri boyunca birbirine nüfuz ettiği gözlemlenmiştir. Bu etkileşim, doğal ECM'ye benzeyen bir ECM ağı sağlayabilir [246]. Şekil 4.6 B'de GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katman üzerinde ortalama nanopartikül çapı $304 \pm 14,5$ nm olarak ölçülmüştür. Şekil 4.6 C'de PCL-COL@PVA- TGFβ3'ün fiber çapı ise $306 \pm 14,8$ nm olarak ölçülmüştür. Nanopartikül eklenmesi ile fiber çapında artış gözlenmiştir bu literatürle uyumludur [247].



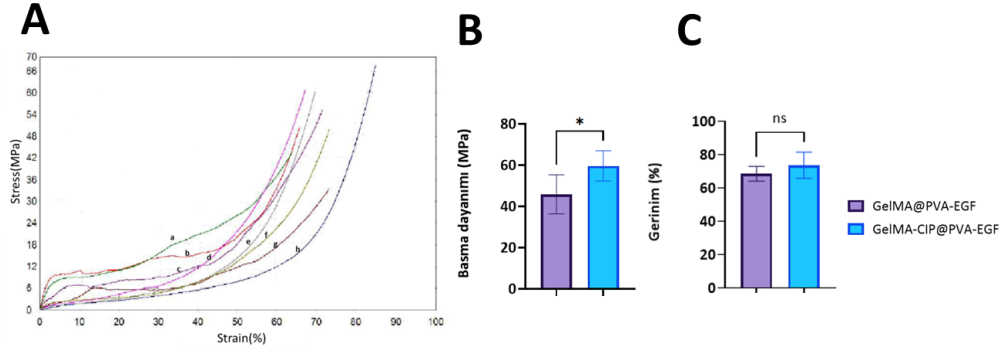
Şekil 4.6 3B yazdırılmış hidrojel ve nanofiber yamadan oluşan çift katmanlı iskelelerin SEM görüntüleri: (A) GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 çift katmanlı doku iskelesi görünümü, (B) GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katman üzerinde nanopartiküllerin görünümü ve histogramı, (C) PVA-TGFβ3 nanofiber katman üzerinde nanopartiküllerin genel görünümü ve fiber çapının histogramı

4.4 Mekanik Özellikleri

Hedeflenen dokunun mekanik özellikleri ile eşleşen doku iskelelerine sahip olmak doku rejenerasyonu için çok önemlidir [238]. Nanofiberlerin ve çift katmanlı doku iskelesinin mekanik özellikleri çekme testleri ile değerlendirilirken, hidrojellerin mekanik performansı basma analizi ile değerlendirilmiştir [30]. Hidrojeller test cihazının çeneleri arasına yerleştirilemediği ve çekme analizi yapılamadığı için basma analizi yapılmıştır. Hidrojellerin mekanik özellikleri, çapraz bağlanma derecesi, gözenek boyutu ve gözeneklilik gibi çeşitli faktörlerin birleşik etkilerine bağlıdır [27].

Şekil 4.7, hidrojellerin basınç dayanımlarının GelMA@PVA-EGF için $45,83 \pm 9,45$ MPa ve GelMA-CIP@PVA-EGF için $59,62 \pm 7,30$ MPa olduğunu göstermektedir. Hidrojellerin gerinimi (%) GelMA@PVA-EGF için $68,58 \pm 4,43$ ve GelMA-CIP@PVA-EGF için $73,69 \pm 7,87$ olarak bulunmuştur. PVA'nın ve CIP'in çapraz bağlayıcı olarak hareket ederek GelMA'ya bağlanmasına ve mekanik dayanımı artırmasına bağlanabilir [177]. GelMA-CIP@PVA-EGF'nin basınç dayanımındaki artış, defekt olan bölgeye yerleştirildiğinde dış basınca dayanabileceğinin bir göstergesi olarak alınabilir [248]. GelMA-CIP@PVA-EGF katmanının cilt fleplerine

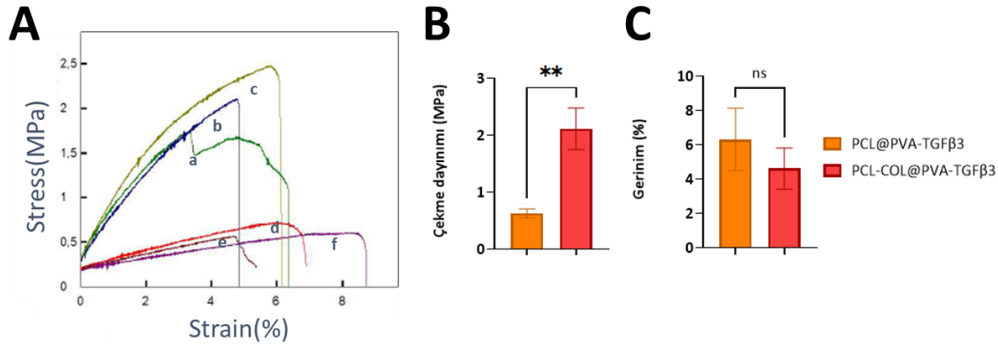
destek olacak biyomalzeme olarak kullanılabilir. Burun bölgesindeki cilt ile ilgili mekanik özellikleri hakkında çok fazla çalışma yoktur.



Şekil 4.7 GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojellerinin basınç özellikleri: (A) hidrojellere ait Stress -Strain grafiği (a,b,c,d) GelMA@PVA-EGF'ye ait pikler, (e,f,g,h) GelMA-CIP@PVA-EGF'ye ait pikler, (B) basınç dayanımı, (C) gerinim (%). Veriler Eşleştirilmemiş t testi ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 4)

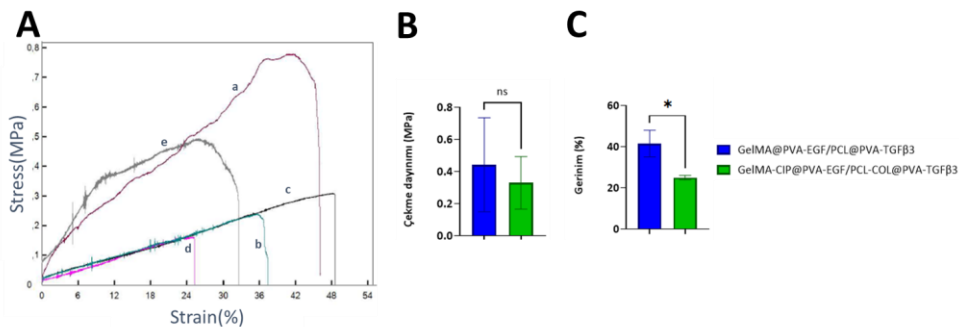
Burun kıkırdağının mekanik özellikleri, büyük ölçüde ECM bileşimindeki kolajen/GAG oranı bağlıdır. NKDM paradigması ile üretilmiş burun kıkırdağı yapıları, doğal septumun biyomekanik özelliklerini mümkün olduğunca taklit edebilmelidir. Uzun vadede burnun solunum fonksiyonuyla uyumlu ve burun kıkırdağının mekanik özelliklerini çok yakın bir şekilde taklit eden biyomalzemeler üretme çabalarına sahada hala ihtiyaç duyulmaktadır [3]. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi nanofiberlerin çekme dayanımlarının PCL@PVA-TGF β 3 için $0,630 \pm 0,078$ MPa ve PCL-COL@PVA-TGF β 3 için $2,115 \pm 0,367$ MPa bulunmuştur. PCL-COL@PVA-TGF β 3 çekme dayanımındaki önemli artış, COL'ün yüksek uzama kapasitesi sayesinde yüklemeye karşı enerjiyi emme yeteneği olarak yorumlanabilir [249]. Ayrıca, COL'ün PCL'ye bağlanması ile lif çapını artmış olduğu böylece mekanik davranışa olumlu katkıda bulunduğu düşünülmektedir [176]. Nanofiberlerin gerilme %'si PCL@PVA-TGF β 3 için $\%6,320 \pm 1,825$ ve PCL-COL@PVA-TGF β 3 için $\%4,621 \pm 1,202$ bulunmuştur. Literatürde insan burun septum kıkırdağının mukavemeti, yaş ve cinsiyet farklılıklarına bağlı olarak araştırılmış ve $1,90 \pm 0,24$ MPa olarak bildirilmiştir [87]. Çalışmamızda çift katmanlı doku iskelesinin nazal kıkırdak benzeri greft yapı olarak tasarlanmış, PCL-COL@PVA-TGF β 3 nanofiber katmanının çekme mukavemeti değeri literatürdeki bu değere oldukça yakındır. Ayrıca kıkırdak dokusunun çekme mukavemetinin $1,1-2,5$ MPa arası olduğu bildirilmiştir [250]. PCL-COL@PVA-TGF β 3 doku iskelesinin kıkırdak benzeri yapıların çekme mukavemetine yakın olduğu

varsayılabilir. Ayrıca bu bulgulara dayanarak kıkırdak hasarlarının onarımına katkı sağlamak amacıyla PCL-COL nanofiberlerin @PVA-TGFβ3 nanopartiküle kaplanarak biyofonksiyonel hale getirilmesi mekanik özelliklerini ve fizyolojik stabilitesini değiştirebildiği çıkarımı yapılabilir.



Şekil 4.8 Nanofiberlerin çekme özellikleri: (A) nanofiberlere ait Stress -Strain grafiği (a,b,c) PCL-COL@PVA-TGFβ3'e ait pikler, (d,e,f) PCL@PVA-TGFβ3'e ait pikler, (B) çekme dayanımı (MPa), (C) gerinim (%). Veriler Eşleştirilmemiş t testi ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, ** = $p \leq 0,01$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, $n = 3$)

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi çift katmanlı doku iskelesinin çekme mukavemeti GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3 için $0,443 \pm 0,293$ MPa ve GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 için $0,328 \pm 0,164$ MPa olarak bulunmuştur. Gerinim % ise GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3 için $41,512 \pm 6,441$ ve GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 için $25,007 \pm 1,095$ olarak bulunmuştur. Hidrojel gruplarına nanofiberlerin eklenmesiyle mekanik performansın arttığı gözlemlenmiştir. Nanofiberin hidrojellerin mekanik bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunduğu sonucuna varılabilir [251].



Şekil 4.9 Çift katlı doku iskelesinin çekme özellikleri: (A) çift katlı doku iskelesine ait Stress -Strain grafiği (a,b,c) GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3 ait pikler, (d,e) GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 ait pikler, (B) çekme dayanımı (MPa) ve (C) gerinim (%). Veriler Eşleştirilmemiş t testi ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, $n = 3$)

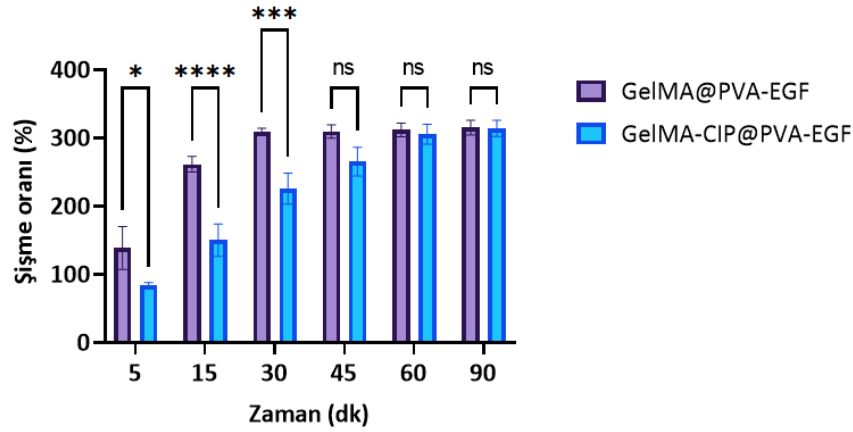
Tablo 4.1 Hidrojellerin, nanofiberlerin ve çift katmanlı doku iskelelerin mekanik özellikleri

Doku iskeleleri	Basınç dayanımı (MPa)	Çekme dayanımı (MPa)	Gerinim (%)
GelMA@PVA-EGF	45,834±9,44	-	68,580 ±4433
GelMA-CIP@PVA-EGF	59,628±7,309	-	73,696 ±7,874
PCL@PVA-TGFβ3	-	0,630±0,078	6,320±1,825
PCL-COL@PVA-TGFβ3	-	2,115±0,367	4,621±1,202
GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3	-	0,443±0,293	41,512±6,441
GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3	-	0,328±0,164	25,007±1,095

4.5 Şişme Özellikleri

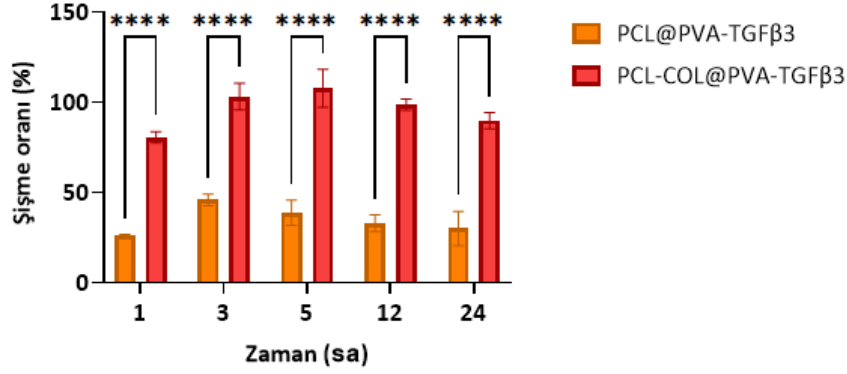
Hidrojel şişme kapasitesi, yükün salınmasını kolaylaştırmak açısından kritiktir [252]. GelMA hidrojelinin metakrilasyon derecesi, fotobaşlatıcı miktarı, gözenek boyutu ve çözücü tipindeki değişiklikler şişme özelliğini etkiler [253]. Şişme davranışlarını araştırmak için GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF kaplı hidrojeller PBS çözeltisinde bekletilmiş ve 90 dakika boyunca zamanla kütle değişimleri ölçülmüştür. Hidrojellerin kütleleri (Şekil 4.10) ilk 5 dakika içinde önemli ölçüde artmıştır. GelMA@PVA-EGF (~%315) ve GelMA-CIP@PVA-EGF (~%314) 90. dakikada şişme dengesine ulaşmıştır. Şişme dengesine ulaştıklarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu fakat kütlece şişme oranındaki fark, hidrofobik amino asitlerin azalması ile şişme oranı çok olanların şişme oranı az olanlara göre daha hidrofilik olduğu çıkarımı yapılabilir [222]. CIP antibiyotik solüsyonu içeriğindeki HCl varlığı ile GelMA-CIP@PVA-EGF'in GelMA@PVA-EGF'e göre pH'ı farklı olabilir buda hidrojellerin şişme yeteneğini etkileyebilir [254]. Genellikle şişme oranlarının, nötr ve bazik şişme koşullarında daha düşük pH değerlerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir [252]. Şekil 4.10'daki sonuçlar bu bilgiyi doğrular nitelikte gözükmemektedir.

Sonuçlar hidrojel grupların mekanik analizi ile de uyumludur basma mukavemeti daha yüksek olan GelMA-CIP@PVA-EGF şişme yüzdesi daha düşüktür. Geliştirilen doku iskelesi kontrollü şişme davranışı göstermektedir ve cilt dokusu rejenerasyonu için uygun olduğu anlamına gelebilir [36].



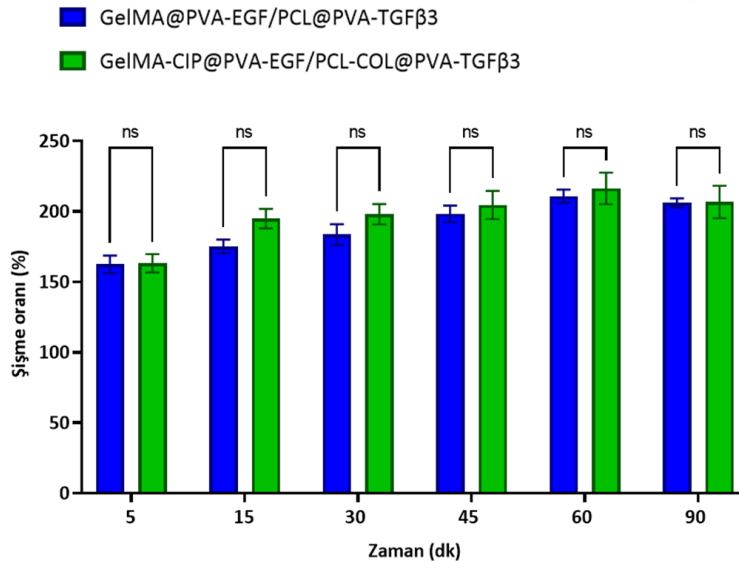
Şekil 4.10 GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katmanların farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki şişme davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi çift yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism* 9 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3)

Fiberlerin şişme ve bozunma özelliklerinin belirlenmesi doku iskelesinin tedavi edeceği bölgede tedavi koşulları sağlanana kadar yapısının bozulmadan kalması için oldukça kritiktir. Şişme davranışlarını araştırmak için PCL@PVA-TGF β 3 ve PCL-COL@PVA-TGF β 3 nanofiberler belirlenen periyotlarda PBS çözeltisinde bekletilmiş ve 24 saat boyunca zamanla kütle değişimleri ölçülmüştür. Şekil 4.11'deki sonuçlara göre; PCL@PVA-TGF β 3 (~%46) 3. saatin sonunda, PCL-COL@PVA-TGF β 3 (~%108) nanofiberlerin 5. saatin sonunda şişme dengesine ulaştığı gözlenmiştir. Hidrofobik özellikte ki PCL'in hidrofilik özellikte ki PVA nanopartiküller ile kaplanması ve COL ilavesi ile daha hidrofilik yapı kazanmış olabilir [255]. Hidrofilik karakter kazanmış PCL@PVA'nın gözenekli fiber yapısının da suyu tutma konusunda yardımcı bir kapasite sergilediği yorumu yapılabilir [256], [41].



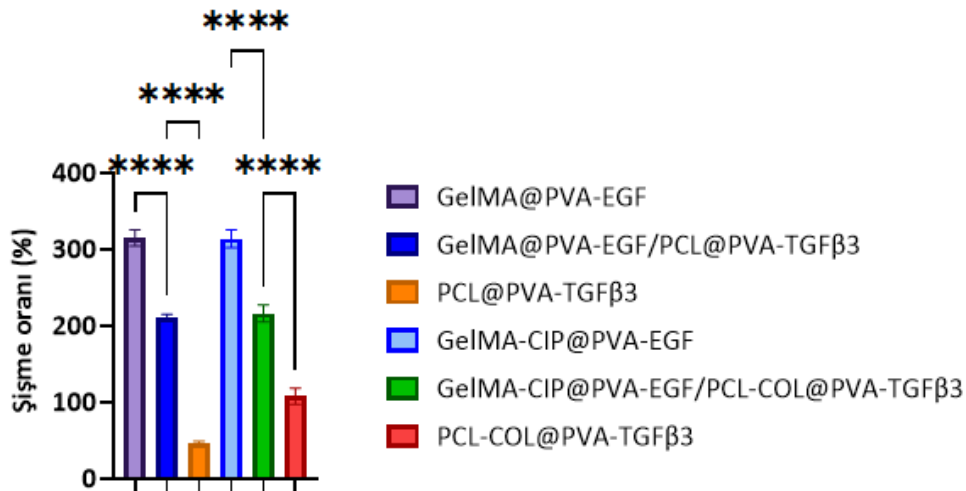
Şekil 4.11 PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 nanofiber katmanların farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki şişme davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi çift yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3)

GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3 ve GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 çift katmanlı doku iskelesinin şişme davranışları Şekil 4.12'de gösterildiği gibi GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3 (~%211) ve GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 (~%216) 60. dakikada şişme dengesine ulaşmıştır.



Şekil 4.12 GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3 ve GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 çift katmanlı doku iskelesinin farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki şişme davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi çift yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, n = 3)

GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3 (~%211), GelMA@PVA-EGF (~%315) hidrojelinden düşük şişme oranına PCL@PVA-TGFβ3 (~%46) nanofiberinden yüksek şişme oranına sahip olduğu görülmektedir. Son olarak GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 (~%216), GelMA-CIP@PVA-EGF (~%314) hidrojelinden düşük, PCL-COL@PVA-TGFβ3 (~%108) nanofiberinden yüksek şişme dengesine sahiptir. Çift katmanlı doku iskelelerinin kendi aralarında şişme dengesi açısından önemli farkları yoktu fakat sadece hidrojel grupları ve sadece fiber ile karşılaştırıldığında hidrojel gruplarından düşük nanofiber gruplarından yüksek şişme dengesine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13). Daha düşük şişme dengesine sahip doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin daha yüksek olduğu [225] bu durum daha yüksek çapraz bağlanma yoğunluğa atfedilebilir [257]. Ayrıca hidrojel ve nanofiberler arasında oluşan fiziksel ve kimyasal çapraz bağlanmaya atfedilebilir [246], [28]. Çift katmanlı doku iskelesinin daha fazla hidrojen bağının bulunması ve bununla hidrojin şişmesini kısıtladığı yorumuna varılabilir. Böylece çift katmanlı doku iskelesinin mekanik ve şişme davranışı sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu sonucuna varılabilir.

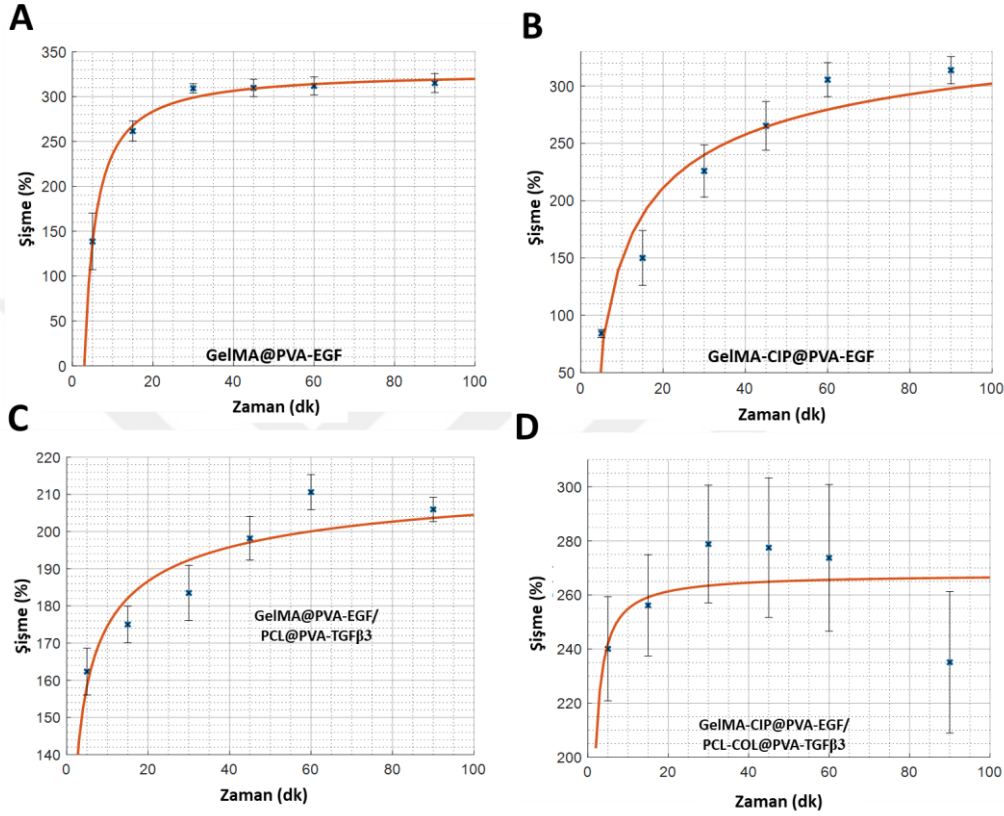


Şekil 4.13 Şişme dengesine ulaştığında tüm doku iskelelerinin karşılaştırılması. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi tek yönlü ANOVA ile GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (**** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, $n = 3$)

4.6 Şişme Kinetikleri

Hidrojel ve çift katmanlı doku iskelesi için şişmenin kinetik analizi gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan model parametreleri ve performansları Tablo 4.2'de raporlanmıştır. Parametreler hidrojeller için Fickian difüzyon davranışını

göstermektedir. Se değerlerinin deneysel denge değerlerinden biraz daha yüksek olduğuna dikkat edilmelidir. Bunun nedeni, Se'nin $t \rightarrow \infty$ iken modelin yaklaştığı yatay asimptotu temsil etmesidir. Geliştirilen tüm modellerin performans ölçütleri, bunların bu çalışmanın deneysel aralığı içinde geçerli olduğunu göstermektedir. Modeller ayrıca Şekil 4.14 A-D deneysel verilerle karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.14 Deneysel veriler ile modellerin karşılaştırmalı şişme kinetikleri: (A-B) hidrojel grupların modeller ile oluşturulan farklı zaman aralıklarındaki şişme yetenekleri, (C-D) çift katmanlı doku iskele gruplarının modeller ile oluşturulan farklı zaman aralıklarındaki şişme yetenekleri

Tablo 4.2 Şişme kinetiklerinin model parametreleri ve performans metrikleri

Doku iskelesi	Model parametreleri			Performans ölçümleri	
	Se (%)	ks (dk ^m)	m	R ²	RMSE
GelMA@PVA-EGF	327,97	1022,80	1,0458	0,9932	7,4125
GelMA-CIP@PVA-EGF	400,42	639,38	0,4066	0,9317	30,727
GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3	223,81	125,47	0,4064	0,8536	9,3081

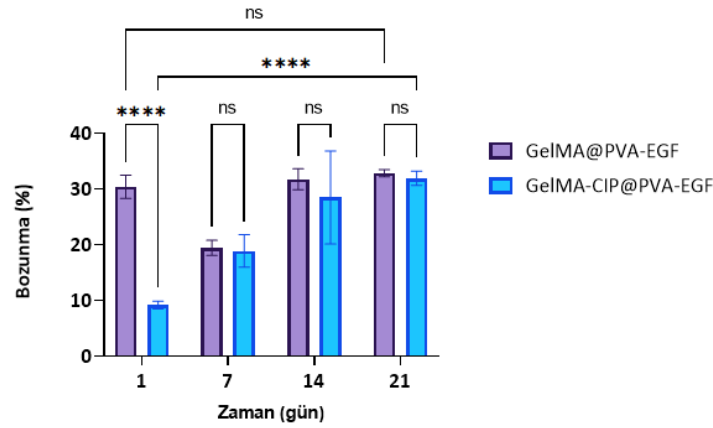
Tablo 4.2 Şişme kinetiklerinin model parametreleri ve performans metrikleri (devamı)

Doku iskelesi	Model parametreleri			Performans ölçümleri	
	S_e (%)	k_s (dk ^m)	m	R^2	RMSE
GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@ PVA-TGFβ3	216,55	175,50	0,7411	0,9362	5,9619

4.7 Bozunma Özellikleri

Doku iskelesinin bozunumu, implant bölgesindeki doku rejenerasyonu ile en azından kısmen uyuşmalıdır [36].

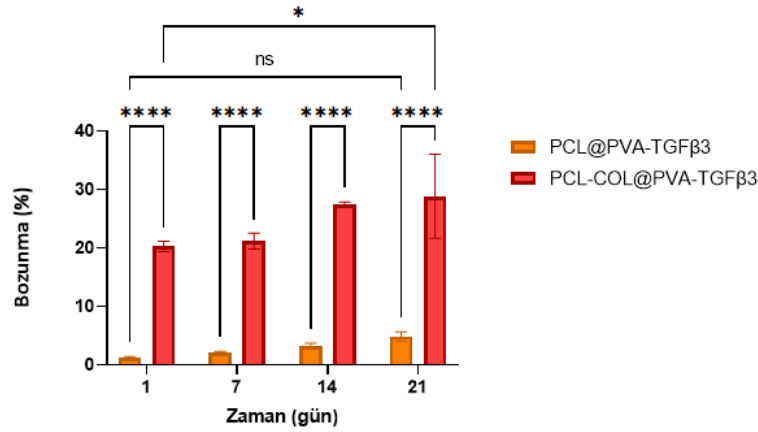
Hidrolitik degradasyon davranışlarını araştırmak için GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF kaplı hidrojeller PBS çözeltisinde 21 gün 37°C'de inkübe edilerek belirli periyotlarda bozulma davranışları incelenmiştir (Şekil 4.15). GelMA@PVA-EGF hidrojeli 21 gün sonunda ~%33 bozulma oranı gösterirken GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojeli ~%32 bozulma oranı göstermiştir. Hidrolitik bozunma oldukça yavaş bir bozunma olduğu için, GelMA@PVA-EGF 1. Gün ile 21. Gün arasında bozunma yüzdesi olarak istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 21 günün sonunda GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF arasında bozunma yüzdesi açısından yine anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Fakat GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojelin 1 ve 21 gün arasında istatistiksel olarak anlamlı olan yaklaşık 3 kat fazla bozunma yüzdesi farkı oluşmuştur. Şişme ve bozunma deneylerini kısmen birbirini doğrular nitelikte olduğu sonucuna varılabilir. Çapraz bağların varlığı bozunma süresini artırarak rejeneratif süreci daha destekleyebilir [258]. Bu da daha yoğun şişen hidrojellerin daha düşük bozunma yüzdesi gösterdiği anlamına gelebilir [259].



Şekil 4.15 GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katmanların farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki bozunma davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi iki yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism* 9 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, $n = 3$)

Bozunma oranının yapısal organizasyona bağlı olduğu PCL'in; sünger, lif, film ve disk ile üretilmiş formlarında uzun vadeli (18-36 ay) hidrolitik bozunma oranını önemli ölçüde etkilemediği rapor edilmiştir [260]. Çalışmamızda hidrolitik degradasyon davranışlarını araştırmak için PCL@PVA-TGF- β 3 ve PCL-COL@PVA-TGF- β 3 nanofiberler belirlenen periyotlarda PBS çözeltisinde bekletilmiş ve 21 gün boyunca zamanla kütle değişimleri ölçülmüştür. Şekil 4.16'daki sonuçlara göre; PCL@PVA-TGF β 3 (~%5) nanofiberlerin PCL-COL@PVA-TGF- β 3 (~%29) nanofiberlerden düşük oranlarda degradasyona uğradığı gözlenmiştir. PCL kristalin ve COL amorf bir polimer olduğundan, amorf bölge hidrolitik bozunma sırasında kristalin bölgeden daha hızlı ayrışır buda daha hızlı bozunmayı açıklayabilir [249]. Ayrıca hidrofobik PCL, COL ve PVA ile daha hidrofilik karakter kazanmış doku iskeleleri sıvı alımı ile daha esnek hale gelerek fiber boyutlarında değişiklikler meydana gelmiş olabilir bu da hidroliz sürecini güçlendirebilir [261].

Böylece nanofiber grupların mekanik özellikleri ile şişme ve degradasyon özellikleri birbirini doğrular nitelikte olduğu çıkarımı yapılabilir.

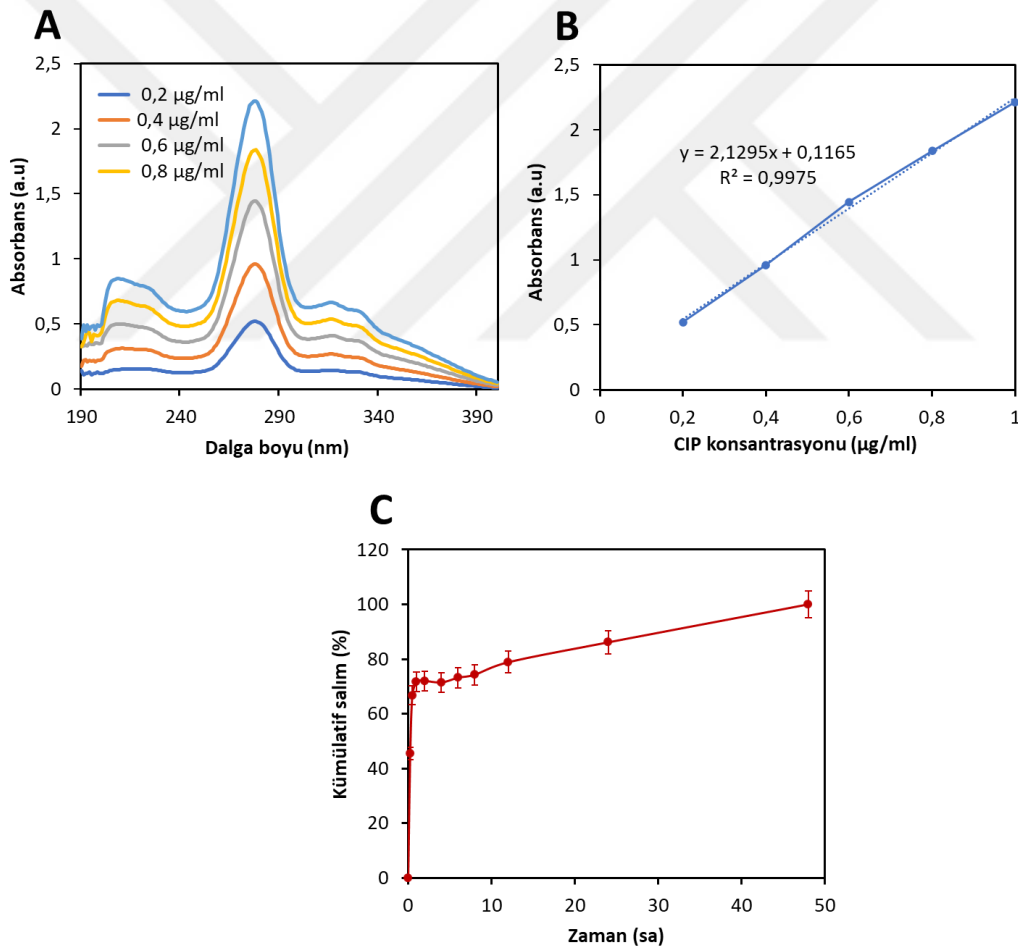


Şekil 4.16 PCL@PVA-TGF- β 3 ve PCL-COL@PVA-TGF- β 3 nanofiber katmanların farklı zaman aralıklarında PBS içinde inkübasyondan sonraki bozunma davranışı. Veriler Tukey'in çoklu karşılaştırma testi iki yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, $n = 3$)

4.8 *In vitro* CIP ve Büyüme Faktörleri Salınım Çalışması

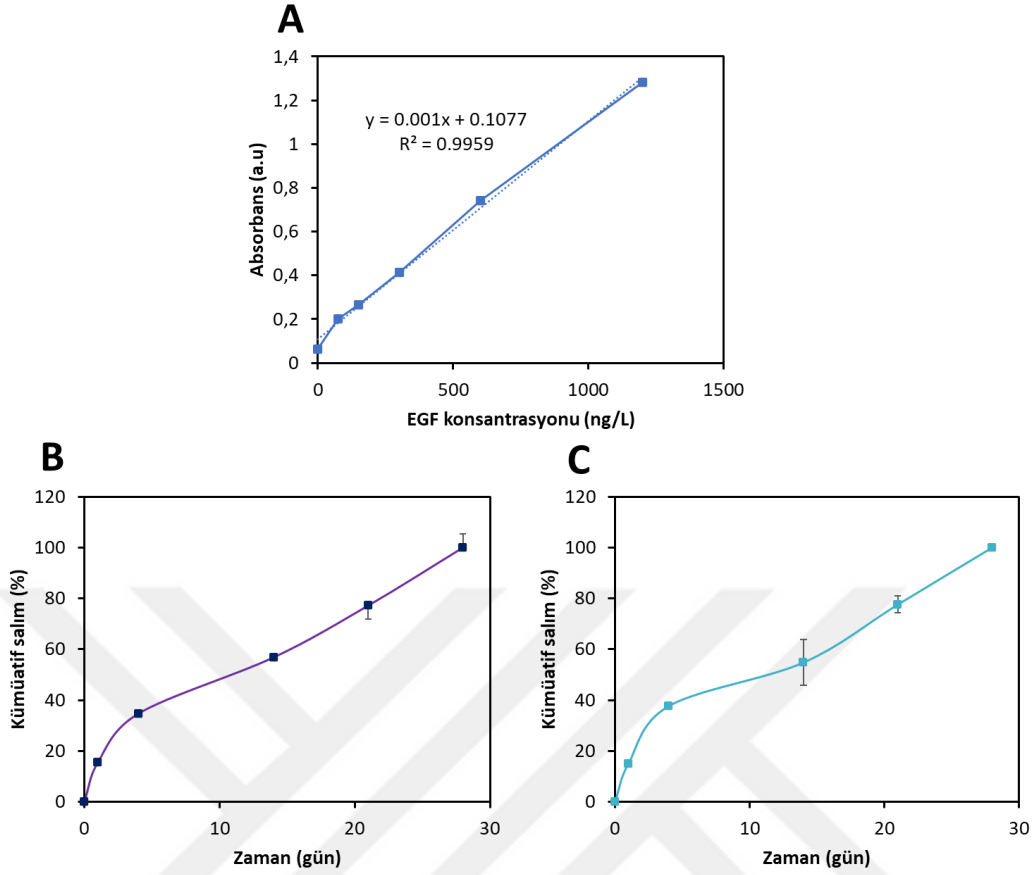
In vitro ilaç salım çalışmaları, GelMA-CIP hidrojellerinden CIP'in salım davranışını araştırmak için gerçekleştirilmiştir. Canlı organizmaların fizyolojik koşullarını taklit etmek için, test 48 saat boyunca PBS'de (pH 7,4, 37 °C) gerçekleştirilmiştir. Salınan CIP'i tespit etmek için 278 nm'de UV absorbansı kullanılmıştır. 0,2 ila 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CIP konsantrasyon aralığında elde edilen UV spektrumları çizilerek, CIP absorbans değerlerinden ($R^2 = 0,9975$) doğrusal bir standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.17 A ve B). GelMA-CIP hidrojellerinin Şekil 4.17 C'de gösterildiği gibi iki kademeli salım eğrisi görülmektedir. Bundan dolayı ilk 1. saat de CIP'in $72 \pm 0,042$ 'nin patlama salınımı (burst release) gözlenmiştir. Böylece salınımında ilk patlama görülmüştür. Akabinde hidrojele çapraz bağlanmış olan CIP bağların kırılmasına müteakip 48. saatin sonuna kadar ilacın yavaş salınımın gerçekleştiği ve %100'nün salındığı görülmüştür. İlacın ilk patlamasının ardından 48 saat boyunca CIP'in sürekli salınımı takip etmiştir. CIP'in GelMA hidrojelden hızlı salım yapmasının birden fazla nedeni olabilir. GelMA hidrojel solüsyonuna eklenen CIP'in bir kısmı hidrojel içerisinde kimyasal olarak bağlanmış bir kısmı ise fiziksel bağlar ile hidrojele yüklenmiş olabilir, buda çift aşamalı salınımın sebebi olabilir [262]. Yani ilk aşamada fiziksel bağlar ile bağlanan CIP'in salınımı gerçekleşmiş daha sonra hidrojel ile kimyasal bağlanan CIP'in salınımı gerçekleşmiş olabilir.

GelMA-CIP hidrojelin morfolojik inceleme sonucunda yüzeyindeki gözenek sayısının çok fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durumun hızlandırılmış ilaç salınımına neden olabileceği düşünülebilir. Başka bir neden çok az antibiyotik kullanılması olabilir. Aslında, Vigata ve ark. ilaç salınım süresinin ilaç miktarıyla doğru orantılı olabileceğini göstermiştir [263]. İlaç salınım süresini artırmak için ilacın hidrojele farklı formülasyonlarda yüklenmesi denenebilir. Örneğin, Khalil ve ark. CIP içeren misel geliştirerek ilacın %80'ini 12 saatte salındığını rapor etmişlerdir [264]. Ribeiro ve ark. CIP ve β -siklodekstrin kompleksi ile hazırlanan nanofiberleri kriyo-kesme yöntemi ile GelMA hidrojellerine dahil ederek kompleksi içermeyen gruplara göre ilk günün sonunda önemli ölçüde daha yüksek ilaç salınımı gözlemlediklerini bildirmişlerdir [265].



Şekil 4.17 GelMA-CIP hidrojellerinin *in vitro* ilaç salım profili: (A) farklı konsantrasyonlarda CIP'nin emilim spektrumları, (B) CIP'nin kalibrasyon eğrisi, (C) GelMA-CIP hidrojellerinden CIP salım davranışı

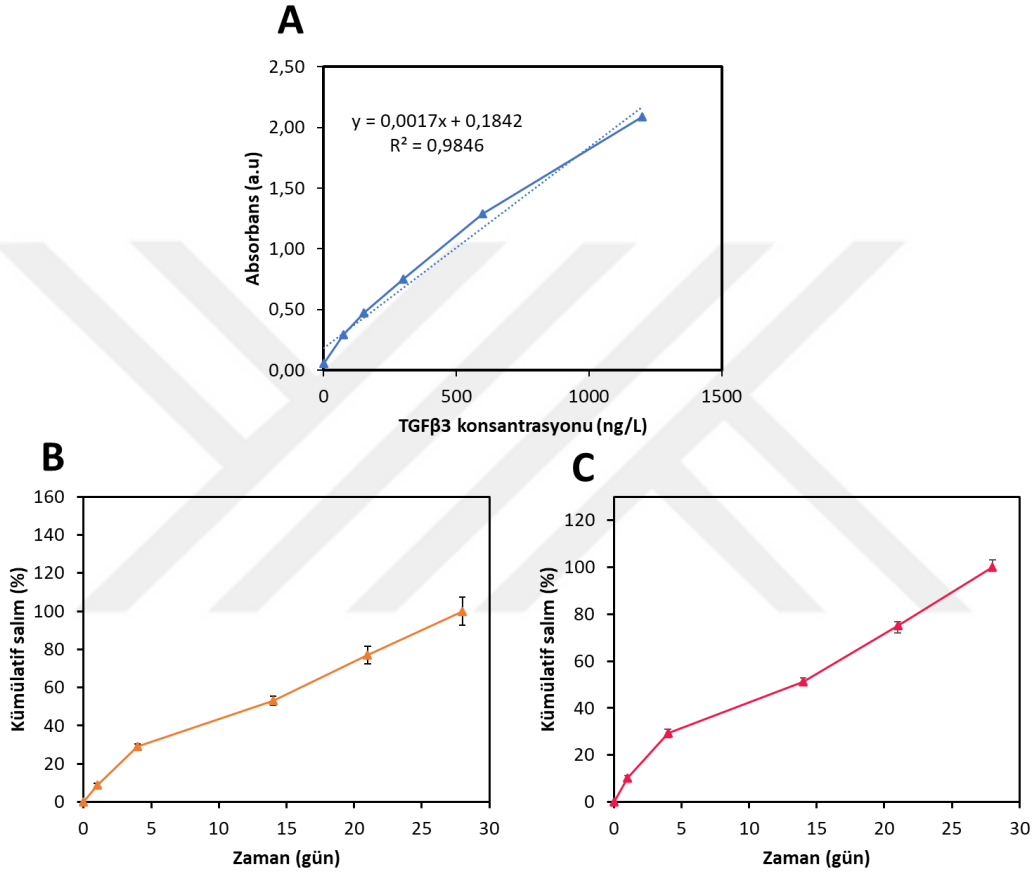
EGF için absorbans değerlerinden elde edilen doğrusal bir standart kalibrasyon eğrisi ($R^2=0,9959$), Şekil 4.18 A'da gösterilmektedir. Şekil 4.18 B ve C'de sunulduğu gibi, ilk 14 gün içerisinde GelMA@PVA-EGF $56,85 \pm 0,46$ ve GelMA-CIP@PVA-EGF $54,81 \pm 9$ patlama salınımının ardından stabil bir salınım görülmüştür. 28 günlük inkübasyonun ardından hidrojellerin EGF'i tamamen (%100) serbest bıraktığı gözlenmiştir. GelMA hidrojelleri, büyüme faktörleriyle poliyonik kompleksler oluşturma yeteneğine sahip olduğundan sürekli büyüme faktörü salınımına neden olabilir [177]. EGF ile epidermal oluşumu ve cilt yara iyileşmesindeki etkinliğini arttırmak için hidrojel @PVA-EGF kombinasyonu uygun olabilir [266]. Ayrıca 4 haftalık sürekli salınım da PVA ile partiküllize edilmesinin de büyük önemi vardır. Çünkü büyüme faktörünün partiküllü formlarında salım süresi hem daha uzun ve stabil hem de patlama salınımı daha az olduğu benzer çalışmalar da rapor edilmiştir [267]. Hidrojelleri kaplayan PVA içerisindeki EGF'in KİMKH'lerin farklılaşması için yeterli zaman sağlayacağı düşünülebilir. Sonuçlara göre istikrarlı ve sürdürülebilir bir şekilde 28 gün boyunca salınım yapması, 14-21 gün içinde epitelizasyona uğrayan insan MKH'leri [46] için yeterli bir süre sağlayacağı öngörülmektedir. Şişme ve bozunma davranışının yük salınımında da etkili olduğu bilinmektedir [252]. GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojellerinin GelMA@PVA-EGF'e göre kısmen daha yavaş salınım davranışı göstermesinin daha yavaş şişme ve bozunma davranışı göstermesine atfedilebilir.



Şekil 4.18 GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojellerinde *in vitro* büyüme faktörlerinin salım profilleri: (A) EGF’in doğrusal kalibrasyon eğrisi, (B) GelMA@PVA-EGF hidrojellerinden kümülatif salım grafiği, (C) GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojellerinden kümülatif salım grafiği

Benzer sonuçlar TGFβ3’ün salım çalışması içinde geçerlidir. TGFβ3 için absorbans değerlerinden elde edilen doğrusal bir standart kalibrasyon eğrisi ($R^2=0,9846$), Şekil 4.19 A’da gösterilmektedir. Şekil 4.19 B ve C’de sunulduğu gibi, ilk 14 gün içerisinde PCL@PVA-TGFβ3 %53,07 ± 2,55 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 %51,13 ± 1,9 patlama salınımının ardından stabil bir salınım görülmüştür. 28 günlük inkübasyonun ardından nanofiberlerin TGFβ3’ü tamamen (%100) serbest bıraktığı tespit edilmiştir. Bulgularımıza benzer şekilde Jing ve ark. [49] yapmış olduğu çalışmada nanofiberdeki kolajen miktarının artmasıyla salım yüzdesinde düşüş olabileceği rapor edilmiştir. Buda COL’lü nanofiberlerin sade PCL’e göre nispeten daha az salım yüzdesi göstermesine atfedilebilir. Ayrıca her iki grupta salım profillerinin nispeten farklı olmasının elektro-eğrilmiş doku iskelelerin gözenek boyutundaki değişikliklerden kaynaklandığı düşünülebilir [268].

Bulgulara göre her iki grubunda, istikrarlı ve sürdürülebilir bir şekilde 28 gün salınımının KİMKH'lerin kondrojenik farklılaşması için yeterli zaman sağlayacağı çıkarımı yapılabilir. Çünkü insan MKH'leri 2-3 hafta içinde kondrojenik farklılaşmaya uğrayabilir [48], [134]. Böylece TGFβ3'ün kontrollü salınımında her iki grubun kıkırdak uygulamaları için kullanılması açısından uygun olduğu düşünülebilir [49], [269].



Şekil 4.19 PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 nanofiberlerinde *in vitro* büyüme faktörlerinin salım profilleri: (A) TGFβ3'ün doğrusal kalibrasyon eğrisi, (B) PCL@PVA-TGFβ3 nanofiberlerinde kümülatif salım grafiği, (C) PCL-COL@PVA-TGFβ3 nanofiberlerinde kümülatif salım grafiği

Sonuç olarak; @PVA-EGF ve @PVA-TGFβ3 polimerik nanopartiküllerin terapötik proteinleri uzun bir süre boyunca etkili bir şekilde serbest bırakma yeteneği gösterdiği yorumu yapılabilir. Çünkü EGF'in fizyolojik pH ve sıcaklıkta kanda kalım süresinin 1 dakikadan az ve TGFβ3'ün ise aktif formunun kanda kalım süresinin 2-3 dakika kadar olduğu bildirilmiştir [124], polimerik nanopartiküller ile bu sürenin artırılabilirdiği literatürde olduğu gibi çalışmamızla da doğrulanmıştır [123], [177]. Bu kontrollü salınım mekanizması, doku mühendisliği, yara

iyileşmesi ve ilaç salım sistemleri gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda avantaj sağlayabilir.

4.9 Salım Kinetikleri

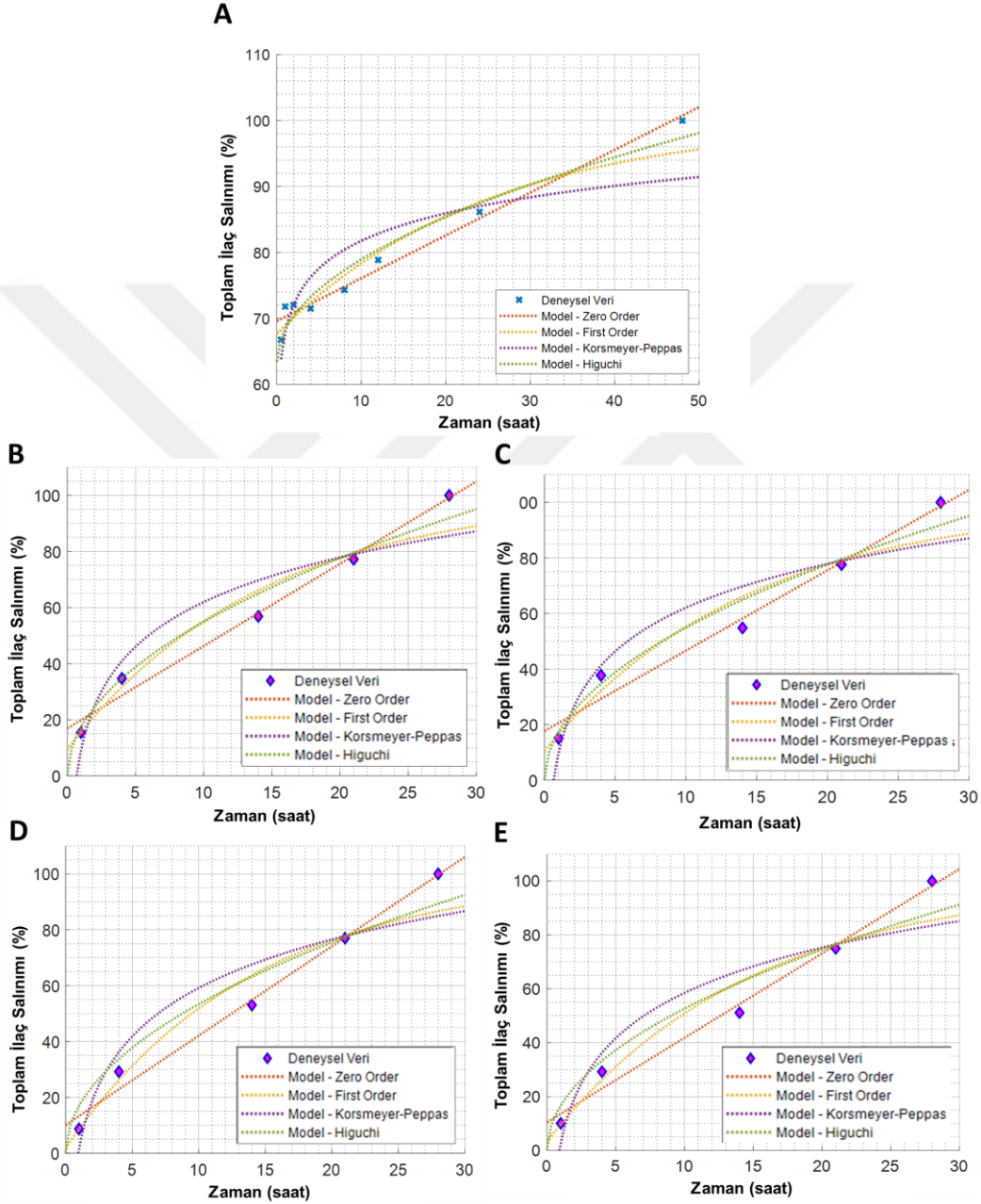
Biyoaktif ajanların kontrollü salınımı ile biyoetkinliği artırabilir ve klinik kullanımı kolaylaştırılabilir. İlaç salınımı; ilaç çözünenlerinin polimerik sistemdeki başlangıç pozisyonundan polimerin dış yüzeyine ve ardından salınım ortamına göç ettiği süreci ifade eder. Bu süreç, çözünenlerin fizikokimyasal özellikleri, malzemenin yapısal özellikleri, salınım ortamı ve bu faktörler arasındaki olası etkileşimler gibi birden fazla karmaşık faktörden etkilenir [270].

Çeşitli formülasyonlardan biyoaktif maddelerin salınım kinetiğini analiz etmek için matematiksel modeller kullanmak, belirli bir zaman diliminde salınan büyüme faktörlerinin hızını ve kapsamını anlamak için çok önemlidir. Zaman içinde salınan kümülatif büyüme faktörlerini (%) belirlemek için, en çok kullanılan dört matematiksel model (sıfırıncı derece, birinci derece, Korsmeyer-Peppas ve Higuchi modelleri) deneysel verilere uygulanmıştır. Tablo 4.3’de, modeller için model parametreleri ve performans göstergeleri bildirilmiştir.

Elde edilen modeller ayrıca Şekil 4.20’de deneysel verilerle karşılaştırılmalı olarak grafikler halinde gösterilmiştir. Antibiyotik salım kinetiği incelendiğinde sıfırıncı derece modelin en yüksek R^2 ve en düşük RMSE değerlerine sahip olması nedeniyle diğer modellerden daha iyi performans gösterdiği görülmüştür. Ancak, sıfırıncı derece modelin salınım periyodunun başlangıcında doğrusal olmayanlığa karşı duyarlılıktan yoksun olduğu bu nedenle, 1 saatten düşük süreler için Higuchi modelinin kullanımının daha uygun olduğu görülmektedir.

Büyüme faktörlerine ait sonuçlar incelendiğinde ise sıfırıncı derece modelin her bir doku iskelesi için en yüksek R^2 ve en düşük RMSE değerlerine sahip olması nedeniyle diğer modellerden daha iyi performans gösterdiği görülmüştür. Ancak, sıfırıncı derece modelin salınım periyodunun başlangıcında doğrusal olmayanlığa karşı duyarlılıktan yoksun olduğu bu nedenle, 5 günden az zaman değerleri için birinci derece modellerin kullanımının daha uygun olduğu görülmektedir. Genel olarak, deneysel sonuçlar, GelMA@PVA-EGF, GelMA-CIP@PVA-EGF, PCL@PVA-TGF β 3, PCL-COL@PVA-TGF β 3 malzemeleri için büyüme faktörleri

salınım kinetiğinin en doğru temsili olarak sıfırıncı derece modelini güçlü bir şekilde desteklemektedir. Ayrıca, Case II difüzyonunun hem antibiyotik hem de büyüme faktörleri salınımı için baskın mekanizma olduğunu göstermektedir [270]. Büyüme faktörlerinin difüzyon hızının polimer gevşeme sürecinden daha hızlı olduğuna atfedilebilir [271].



Şekil 4.20 Deneysel veriler ile modellerin karşılaştırmalı salım kinetikleri: (A) GelMA-CIP için salım kinetiği (B-C) GelMA@PVA-EGF ve GelMA-CIP@PVA-EGF için salınım kinetiği eğrileri, (D-E) PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 için salınım kinetiği eğrileri

Tablo 4.3 GelMA-CIP doku iskelelerinden antibiyotiğin, GelMA@PVA-EGF, GelMA-CIP@PVA-EGF, PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 doku iskelelerinden büyüme faktörlerinin salınımının matematiksel model sonuçları

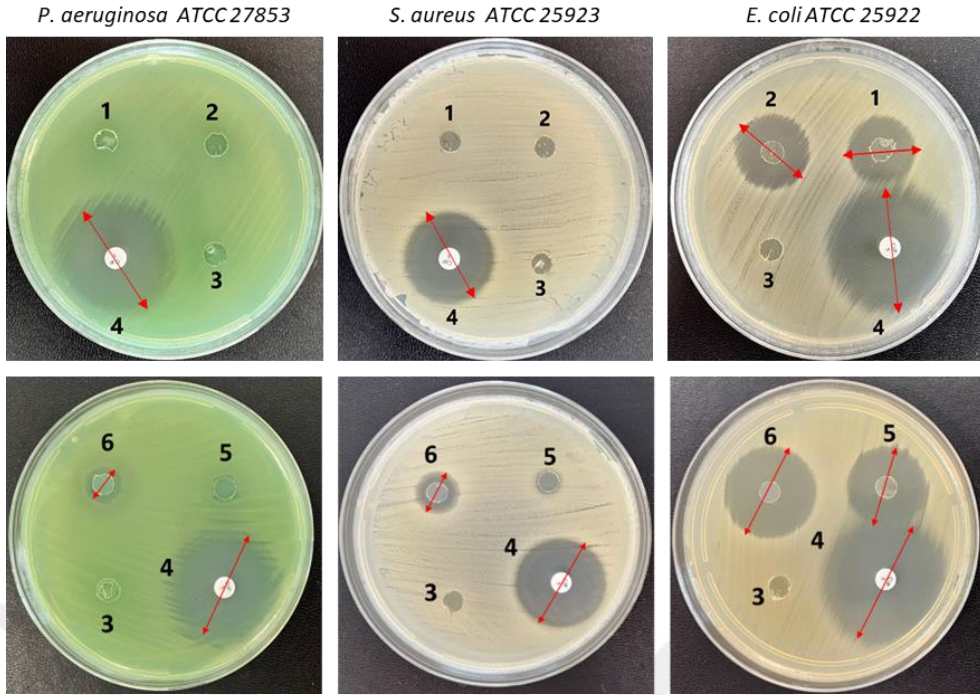
Doku iskelesi	Modeller	Parametreler		Performans ölçümleri	
		K (%)	Q ₀ (%)	R ²	RMSE
GelMA-CIP	Sıfırıncı derece	0,6488 1/sa	69,6149	0,9776	1,7362
	Birinci derece	0,0401 1/sa	67,6554	0,9432	2,7613
	Korsmeyer-Peppas	6,0167	67,9072	0,7790	5,4487
	Higuchi	4,9017 1/sa ^{0.5}	63,4442	0,9534	2,5015
GelMA@PVA-EGF	Sıfırıncı derece	2,934 1/gün	16,956	0,9866	4,4682
	Birinci derece	0,0703 1/gün	9,4822	0,9418	9,3173
	Korsmeyer-Peppas	22,980	9,0489	0,8985	12,306
	Higuchi	17,363 1/gün ^{0.5}	0,0000	0,9685	5,9341
GelMA-CIP@PVA-EGF	Sıfırıncı derece	2,892 1/gün	17,716	0,9738	6,2082
	Birinci derece	0,0692 1/gün	10,599	0,9258	10,444
	Korsmeyer-Peppas	22,718	9,784	0,8920	12,5940
	Higuchi	17360 1/gün ^{0.5}	0,0000	0,9576	6,8377
PCL@PVA-TGFβ3	Sıfırıncı derece	3,1979 1/gün	10,099	0,9879	4,6255
	Birinci derece	0,0712 1/gün	1,8491	0,9429	10,058
	Korsmeyer-Peppas	25,030	1,5168	0,8985	13,408
	Higuchi	16,877 1/gün ^{0.5}	0,0000	0,9428	8,7149

Tablo 4.3 GelMA-CIP doku iskelelerinden antibiyotiğin, GelMA@PVA-EGF, GelMA-CIP@PVA-EGF, PCL@PVA-TGFβ3 ve PCL-COL@PVA-TGFβ3 doku iskelelerinden büyüme faktörlerinin salınımının matematiksel model sonuçları (devamı)

Doku iskelesi	Modeller	Parametreler		Performans ölçümleri	
		K (%)	Q ₀ (%)	R ²	RMSE
PCL-COL@PVA-TGFβ3	Sıfırıncı derece	3,1323 1/gün	10,489	0,9870	4,7008
	Birinci derece	0,0677 1/gün	3,3464	0,9309	10,844
	Korsmeyer-Peppas	24,249	2,6395	0,8782	14,395
	Higuchi	16,656 1/gün ^{0.5}	0,0000	0,9358	9,0486

4.10 *In vitro* Antibakteriyel Analiz

Çift katmanlı iskelenin GelMA-CIP katmanında antimikrobiyal analiz gerçekleştirildi. GelMA ve GelMA-CIP hidrojel­leri (30, 100, 250 ve 500 µl antibiyotik solüsyonu içeren) pozitif kontrole kıyasla oluşturulan zon sayısı açısından izlendi. Antibakteriyel sonuçlara göre, GelMA-CIP (500 µl) etrafındaki inhibisyon zonu tüm bakterilere karşı aktivite gösterdi. 30, 100, 250 µl CIP ve boş GelMA, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite göstermedi (Şekil 4.21). GelMA ve GelMA-CIP hidrojellerinden belirlenen inhibisyon zon çapları Tablo 4.4'de ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



Şekil 4.21 GelMA ve GelMA-CIP'in (30, 100, 250 ve 500 μ l) *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi

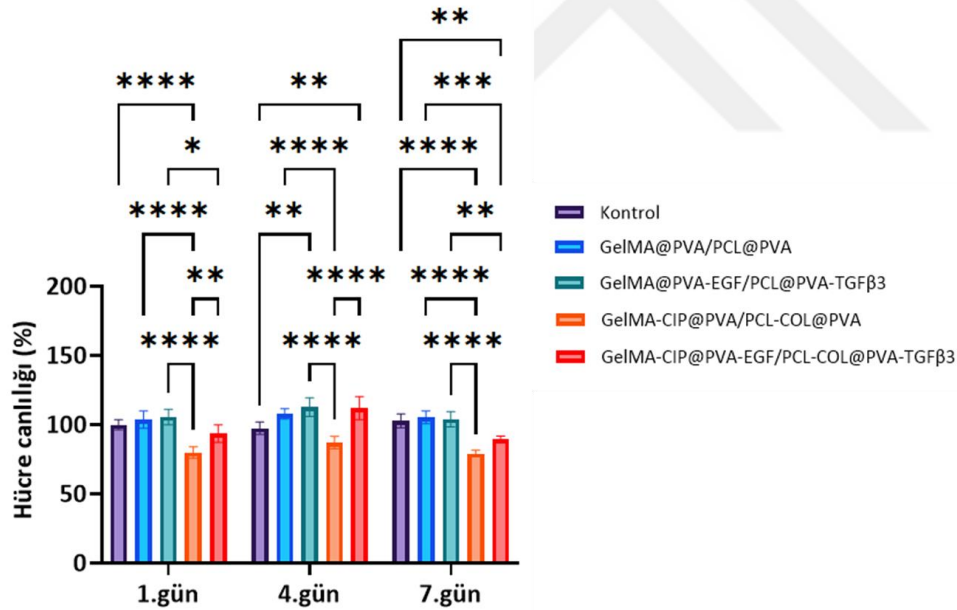
Tablo 4.4 GelMA ve GelMA-CIP'in (30, 100, 250 ve 500 μ l) *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı inhibisyon zon çapları (mm)

	1 (30 μ l CIP)	2 (100 μ l CIP)	3 (GelMA)	4 (CIP disk) (5 μ g)	5 (250 μ l CIP)	6 (500 μ l CIP)
<i>P. aeruginosa</i> 27853	-	-	-	35	-	12
<i>S. aureus</i> 25923	-	-	-	27	-	13
<i>E. coli</i> 25922	20	23	-	36	25	28

4.11 Sitouyumluluk

Hücre canlılığı %'si 1, 4 ve 7 gün boyunca hücrelerle inkübe edilen çift katmanlı doku iskelelerinde MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar negatif kontrolle karşılaştırılmıştır. KİMKH çift katmanlı doku iskeleler ile ISO 10993-5'e göre sitotoksik olmadığı kabul edilen ortalama %70'in üzerinde hücre canlılığı gösterdiği görülmüştür. Büyüme faktörü ihtiva eden grupların ihtiva etmeyenlere göre daha yüksek canlılık yüzdesi gösterdiği Şekil 4.22'de görülmektedir. Doku iskelelerinin biyoaktif moleküllerle zenginleştirilmesi, artan hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşmasına yol açarak biyoyumumluluğu desteklediği bilinmektedir [120]. Bu

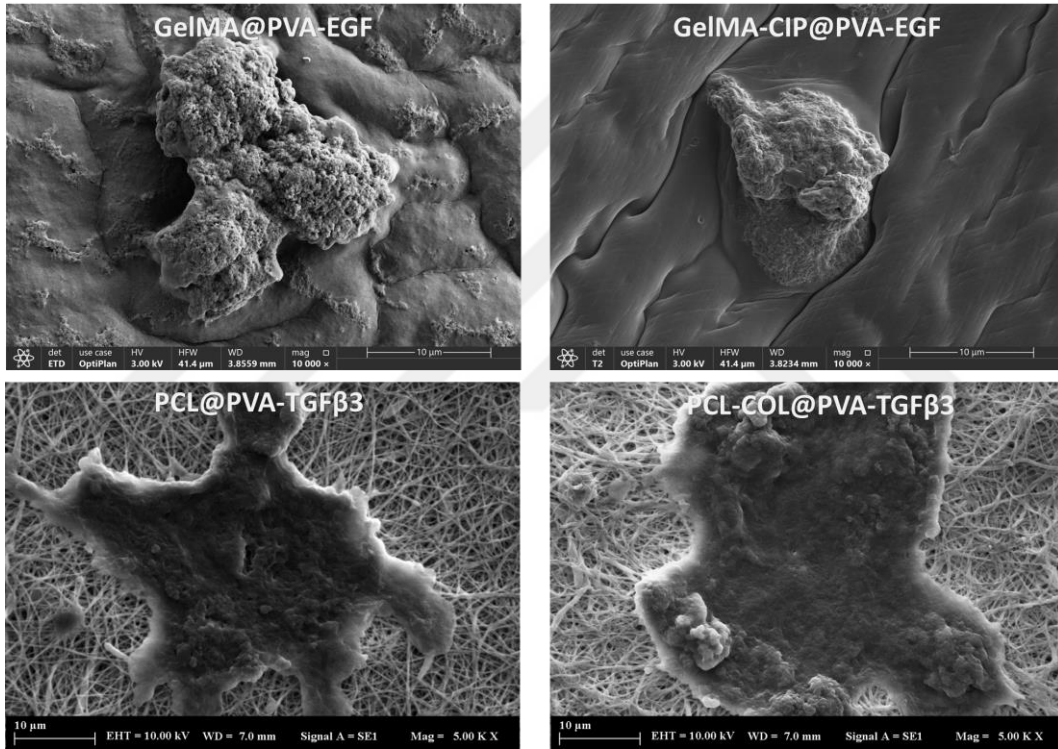
durum sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğuna yorumlanabilir. GelMA@PVA/PCL@PVA çift katmanlı doku iskelesi 7. günün sonunda %105 hücre canlılığı gösterirken GelMA@PVA-EGF/PCL@PVA-TGFβ3 %104 hücre canlılığı göstermiştir. GelMA-CIP@PVA/PCL-COL@PVA çift katmanlı doku iskelesi 7. günün sonunda %79 hücre canlılığı gösterirken GelMA-CIP@PVA-EGF/PCL-COL@PVA-TGFβ3 %89 hücre canlılığı göstermiştir. GelMA hidrojel gruplarının @PVA-EGF ile modifiye edilmesi ile KİMKH'ler üzerinde proliferasyonu ve hücre göçünün artırılması gibi biyolojik performansını geliştirmekte etkili olabilir [272]. Ayrıca TGFβ3'ün fiberlere dahil edilmesiyle hücrelerinin hızlı bir şekilde çoğalması ve hücre büyümesi için destek sağlamasına atfedilebilir [49]. CIP'li grupların CIP ihtiva etmeyen gruplara göre daha az canlılık yüzdesi göstermesi antibiyotik ajanların hücre canlılığı ve yapışması üzerindeki olumsuz etkisi, hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri üzerindeki etkisiyle bağlantılı olmasına atfedilebilir [273]. Ayrıca CIP'in konsantrasyonuna bağlı olarak kök hücreler üzerinde sitotoksik ve anti-proliferasyon aktivitesi olduğu rapor edilmiştir [274].



Şekil 4.22 1., 4. ve 7. günlerde MTT sonuçları. Veriler Tukey'nin çoklu karşılaştırma testi çift yönlü ANOVA ile *GraphPad Prism 9* yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$; sunulan veriler ortalama standart sapma $\pm$ SD, $n = 3$)

Kültürlü yamalar üzerindeki KİMKH morfolojisi ve büyümesi 7. günde SEM ile incelenmiştir. Şekil 4.23'de görülebileceği gibi, KİMKH'ler hem GelMA bazlı hidrojel katmanların hem de PCL bazlı nanofiber katmanların yüzeylerine yapışarak yayılmıştır fakat nanofiber gruplara daha iyi yayıldığı gözlenmektedir.

Bunun sebebi, fiberlerin ECM benzeri yapılar olması ve KİMKH'lerin bu yüzeye daha iyi yayılması olduğu düşünülmektedir. PCL-COL nanofiber katmanda PCL nanofiber katmana göre KİMKH'ler daha yayımlı gözlemlenmiştir. Bu durumun hücrelerin membranlarında bulunan integrin proteini ile COL bağlanarak yayıldığı çıkarımı yapılabilir [275]. Çünkü doğal bir polimer olan COL'i hücrelerin tanımlaması kolaydır çünkü hücreler doğal polimerlerdeki amino asitler ve sakkaritler için bağlanma bölgelerine sahiptir. [137]. Ayrıca kolajen, jelatin ve diğerleri), doğal ECM'ye olan yüksek benzerlikleri nedeniyle hücrelerin daha iyi yapışması, göçü, çoğalması ve farklılaşması için uygun bir mikro ortam sunabilir [276].

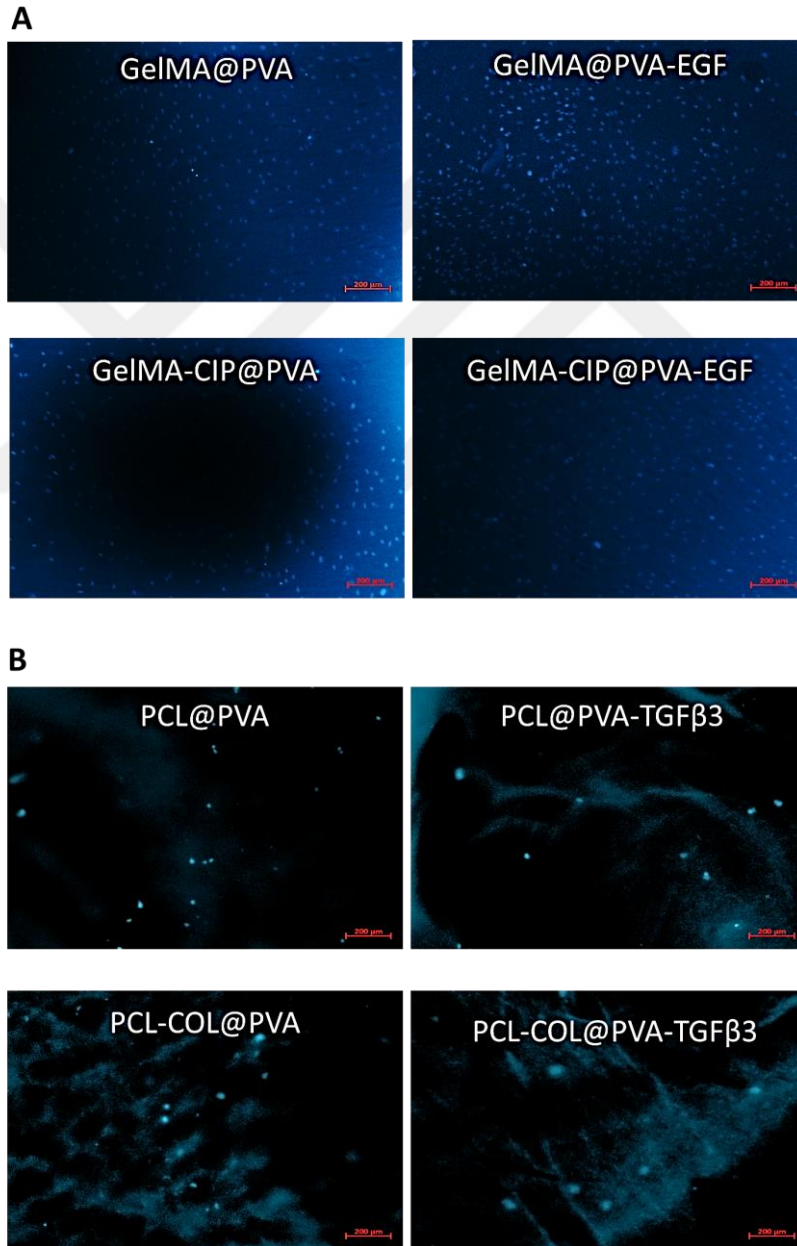


Şekil 4.23 Hidrojeller ve nanofiberlerin KİMKH ile *in vitro* kültürün 7. gününde morfolojilerin SEM görüntüleri

KİMKH ile kültürlenen hidrojel ve nanofiberlere, hücrelerin sağlıklı çekirdeklerle tutunmasını [277] araştırmak için, 7. günde DAPI testi kullanılmıştır. Şekil 4.24'den de anlaşılacağı üzere çift katmanlı doku iskelesi katmanlarına MKH'lerin tutunması ve çoğalması gözlemlenmiştir.

Hidrojel katmandaki ve nanofiber katmandaki gözeneklilik doku gelişimini ve yenilenmesini kolaylaştıran hücre infiltrasyonunu ve dağılımında önemli bir rol oynayabilir. Dolayısıyla çift katmanlı doku iskelesindeki gözenekli yapı hücrelerin büyümesi ve bölünmesi için alan sağlayarak hücre çoğalmasını etkileyebilir.

Üretilen her katmanın hücresel aktiviteler için uygun gözenek yapısında olduğunu MTT, SEM ve DAPI çalışmalarının uyumu ile de ortaya konmaktadır. Çünkü gözenekler hücre canlılığını korumak için yeterli oksijen ve besin difüzyonunu sağlar ve ayrıca hücre farklılaşmasını etkileyebilir [152].

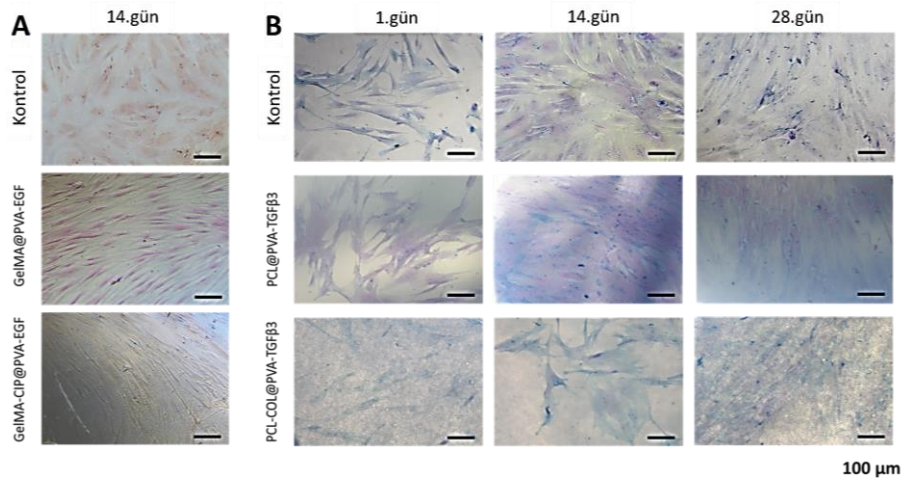


Şekil 4.24 Floresan mikroskopi görüntüleri: (A) hidrojeller üzerindeki KİMKH hücre çekirdeğinin 7. günde DAPI boyama görüntüleri, (B) nanofiberler üzerindeki KİMKH hücre çekirdeğinin 7. günde DAPI boyama görüntüleri

4.12 Histolojik Analiz

Şekil 4.25 A'da 14. günde hidrojel üzerindeki hücreler kontrole göre iğ biçimli hücre şeklini almıştır. KİMKH'lerin, uygun koşullar altında *in vitro* fibroblast benzeri hücrelere farklılaşabileceğine atıf olabilir [46].

MKH'ler uygun büyüme faktörlerinin varlığında pelet kültürlerinde, çeşitli doğal ve/veya sentetik doku iskele materyallerinde kıkırdağa özgü bir matris biriktirerek (GAG) kondrojeneze uğrar [48]. Nanofiber katman üzerindeki KİMKH'lerin etrafında sülfatlanmış proteoglikan açısından zengin ECM oluşumunu değerlendirmek için Alcian mavisi boyama işlemi gerçekleştirilmiştir [277]. Sonuçların Şekil 4.25 B'de gösterildiği gibi, 28 günlük kültürlenme süresi boyunca fiberlerde kontrol gruba göre emilen mavi boyanın yoğunluğunun artması bir ilerleme olduğuna atfedilebilir [277]. COL ve TGFβ3 grubunda renk yoğunluğunun daha çok olmasının sebebi hem COL hem de TGFβ3'ün birlikte farklılaşmayı daha fazla desteklediğine atfedilebilir [278]. Sonuç olarak kolajen gibi pro-yapışkan diziler içeren protein bazlı biyomalzemenin PCL polimeri ile geliştirilmiş doku iskelesinin yüzeyinin yararlı bağlanma bölgeleriyle zenginleştirildiği çıkarımı yapılabilir. Çünkü birçok hücre tipi gibi insan KİMKH'lerin de tanıdığı hücre zarındaki integrin reseptörleri aracılığıyla hücre bağlanmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik edebilir [120]. Görüntülere göre, tüm katmanların KİMKH büyümesi, çoğalması ve farklılaşması için uygun malzemeler olduğu çıkarımı yapılabilir.



Şekil 4.25 KİMKH ile kültürlenmiş hidrojel ve nanofiberlerin farklılaşma yetenekleri: (A) KİMKH ile kültürlenmiş hidrojellerin 14. günde H&E boyama görüntüsü, (B) KİMKH ile kültürlenmiş nanofiberlerin 1., 14., ve 28. günde Alcian mavi boyama görüntüsü

5 SONUÇ

Tez kapsamında burun patolojilerinde kullanılma potansiyeli olan biyomimetik ve biyofonksiyonel çift katmanlı doku iskelesi tasarımı ve üretimi bildirilmektedir. Bu kapsamda ilk olarak çift katmanlı doku iskelesi tasarımı yapılarak üretimde kullanılacak biyomalzemeler ve üretim metotları belirlenmiştir. Biyomalzeme seçiminde ve doku iskelesi üretiminde hem cilt malzemesine hem de nazal kıkırdığa en yakın mekanik özellikler sergileyecek ürünlerin seçimine özenle dikkat edilmiştir ki biyomimetik parametreler sağlanabilsin. Ayrıca biyofonksiyonelleşme için seçilen metodunda hem mekanik özellikleri iyileştirmesine hem de salım kinetiğine katkıda bulunması hedeflenmiştir. Öncelikle GelMA hidrojellerin 3B baskıda üretilmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için sıgır derisinden elde edilen jelatinden GelMA sentezi yapılmıştır. Akabinde sentezlenen GelMA'nın metakrilatlanma derecesinin belirlenmesi için ¹H-NMR ve TNBS olmak üzere iki farklı analiz yapılmıştır. Sonuçlar sırasıyla %100 ve %90,4 ± 2,9 ile birbirine yakın çıkmış sentezin başarılı olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra hidrojinin antibakteriyel özellikte olması için hidrojele farklı konsantrasyonlarda CIP ilavesi yapılmış *in vitro* antibakteriyel analiz ile uygun konsantrasyonun 500 µl CIP ihtiva eden GelMA solüsyonu olduğuna karar verilmiştir. Çünkü 500 µl CIP ihtiva eden GelMA hidrojinin *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu doğrulanmıştır. Cilt örtüsü destekleyici doku iskelesi olarak üretilmesi hedeflenen GelMA-CIP'in, DLP 3B baskısı için CAD modeli çizilmiş ve .stl formatında DLP yazıcıda hidrojellerin üretimi sağlanmıştır. Akabinde 3B baskılanan GelMA-CIP hidrojellerinin elektrosprey kullanılarak @PVA-EGF polimerik nanopartikülleri ile biyofonksiyonel hale getirilmesi sağlanmıştır. Eş zamanlı olarak PCL-COL nanofiber katmanın elektro-eğirme metodu kullanılarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu doku iskelesi de elektrosprey kullanılarak @PVA-TGFβ3 polimerik nanopartikülleri ile biyofonksiyonel hale

getirilmiştir. Daha sonra doku iskelesine karakterizasyon analizi yapılmıştır. Kimyasal analiz için FTIR ve termal analiz için ise DSC bakılmıştır. Sonuçlar tüm kimyasalların varlığını, istenilen kompozitlerin gerçekleştirildiğini doğrular. Hem çift katmanlı doku iskelesinin hem de bu iskeleyi oluşturan diğer iki katmanın tek tek morfolojik incelemeleri SEM analizi ile yapılmıştır. Sonuçlara göre uygun gözenek yapısında ve morfolojide katmanlar üretilip, birbirlerine nüfus etmiş şekilde birleştirilmiştir. GelMA ve GelMA-CIP hidrojellerinin ortalama gözenek çapları sırasıyla $10,42 \pm 6,519 \mu\text{m}$ ve $4,26 \pm 2,331 \mu\text{m}$ bulunmuştur. PCL ve PCL-COL nanofiberlerin ortalama lif çapları sırasıyla $77,77 \pm 22,562 \text{ nm}$ ve $109,89 \pm 26,378 \text{ nm}$ olarak ölçülmüştür. GelMA-CIP@PVA-EGF hidrojel katman üzerinde ortalama nanopartikül çapı $304 \pm 14,5 \text{ nm}$ olarak ölçülerek, PCL-COL@PVA-TGF β 3'ün fiber çapı ise $306 \pm 14,8 \text{ nm}$ olarak hesaplanmıştır. Partikül ile kaplamanın fiber çapında artış göstermesi kaplamayı doğrular niteliktedir. Tüm ölçümler DM çalışmalarında kullanılmak üzere ECM'yi taklit edebilen bir yapı adayını olma potansiyelini ortaya koymaktadır. Öncelikle hidrojel katmanına basma analizi, nanofiber katmana ve çift katmanlı doku iskelelerine yapılan çekme analizlerin sonuçları elde edilen ürünlerin mekanik özelliklerinin cilt ve burun kırıkta greftleri olarak kullanıma uygunluğunu göstermektedir.

Akabinde mekanik analizlerde mukavemeti yüksek çıkan her grubun aynı zamanda şişme ve bozunma kapasitelerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Dolayısıyla mekanik ve fiziksel bulgular birbirleri ile orantılı olduğu gözlemlenmiştir.

In vitro salım çalışmalarına göre CIP ilk 1 saatte patlama salınım göstermiştir. Fakat birinci saatin sonunda $72 \pm 0,042$ patlama salınımının ardından 48 saat sonunda ilacın %100'ü salınmıştır. Büyüme faktörlerinin her ikisi de ilk 14 gün içerisinde patlama salınımı (GelMA@PVA-EGF $56,85 \pm 0,46$, GelMA-CIP@PVA-EGF $54,81 \pm 9$, PCL@PVA-TGF β 3 $53,07 \pm 2,55$ ve PCL-COL@PVA-TGF β 3 $51,13 \pm 1,9$) ardından 28 günün sonunda büyüme faktörlerinin %100'ü salınmıştır. Sonuçlara göre hem antibakteriyel özellikte hidrojel katman hem de KİMKH farklılaşması için yeterli sürede salınım yapan hidrojel ve nanofiber katmanlara sahip çift katmanlı doku iskelesi olduğu öngörülmektedir.

Hedeflediğimiz çift katmanlı doku iskelesine KİMKH inkübe etmenin daha faydalı olduğunu literatürdeki DM paradigmasından yola çıkarak belirledikten sonra yapılan sitouyumluluk çalışmalarında ISO 10993-5'e göre tüm gruplarda %70 üzeri

canlılık alınmış ve çift katmanlı doku iskelesinin sitotoksik etkisi olmadığı görülmüştür. Ayrıca SEM ve floresan mikroskop görüntülere göre, tüm katmanların KİMKH büyümesi ve çoğalması için uygun malzemeler olduğu çıkarımı yapılabilir. Son olarak hidrojel ve nanofiber katmanların farklı büyüme faktörleri ile biyofonksiyonel hale getirilmesindeki asıl amacın KİMKH'sinin her katmanda farklı hücre hattına farklılaşmasını sağlamak olduğu için histolojik boyamalarla GelMA-CIP katmanda fibroblast benzeri hücre, PCL-COL katmanda ise GAG birikime yönelik görseller gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasının devamı olacak öneriler;

- ❖ Histolojik analizi nicel olarak destekleyecek epitel farklılaşmasının takibi için CK-18 ve EGFR, kıkırdak farklılaşmasının takibi için Sox-9 ve COL2 genlerinin gen ekspresyonu analizi yapılabilir.
- ❖ CIP etkisini artırmak için farklı formülasyonlarda ve miktarlarda GelMA'ya katkılanabilir.
- ❖ Hem epitel hem de kıkırdak doku gelişiminin takibi hayvan deneyleri ile gözlemlenebilir.

Sonuç olarak nazal DM alanında 3B baskılanmış hidrojellerin ve elektro-eğirilmiş malzemelerin tek başına uygulanmasının sınırları çift katmanlı biyomimetik-biyofonksiyonel doku iskelesinin kullanımıyla aşılmaya çalışılmıştır. Böylece çok karmaşık yapıya sahip burun rekonstrüksiyonu için kullanılabilecek DM ürünü greft olabileceği öngörülmektedir

- [1] Y. Liu, G. Zhou, and Y. Cao, "Recent progress in cartilage tissue engineering—our experience and future directions," *Engineering*, vol. 3, no. 1, pp. 28-35, 2017.
- [2] W. Jia et al., "Nasal cartilage tissue engineering materials based on 3D bioprinting: Seed cells and dECM," *Applied Materials Today*, vol. 40, p. 102364, 2024.
- [3] D. Vertu-Ciolino et al., "Challenges in Nasal Cartilage Tissue Engineering to Restore the Shape and Function of the Nose," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2024.
- [4] S. C. Freeman, D. A. Karp, and C. I. Kahwaji, "Physiology, nasal," 2018.
- [5] A. Oseni, C. Crowley, M. Lowdell, M. Birchall, P. E. Butler, and A. M. Seifalian, "Advancing nasal reconstructive surgery: the application of tissue engineering technology," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 6, no. 10, pp. 757-768, 2012.
- [6] M. Salihoglu, E. Cekin, A. Altundag, and E. Cesmeci, "Examination versus subjective nasal obstruction in the evaluation of the nasal septal deviation," *Rhinology*, vol. 52, no. 2, pp. 122-126, 2014.
- [7] M. P. Valencia and M. Castillo, "Congenital and acquired lesions of the nasal septum: a practical guide for differential diagnosis," *Radiographics*, vol. 28, no. 1, pp. 205-223, 2008.
- [8] S. H. Andrews et al., "Strategies to mitigate variability in engineering human nasal cartilage," *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, p. 6490, 2017.
- [9] P. J. Belmont Jr, B. J. McCrisky, R. N. Sieg, R. Burks, and A. J. Schoenfeld, "Combat wounds in Iraq and Afghanistan from 2005 to 2009," *Journal of trauma and acute care surgery*, vol. 73, no. 1, pp. 3-12, 2012.
- [10] J. L. Arnholt, "Thermal Injuries," *Otolaryngol. Neck Combat Casualty Care*, nd, 2015.
- [11] W. E. Brown, L. Lavernia, B. J. Bielajew, J. C. Hu, and K. A. Athanasiou, "Human nasal cartilage: Functional properties and structure-function relationships for the development of tissue engineering design criteria," *Acta Biomaterialia*, vol. 168, pp. 113-124, 2023.
- [12] S.-S. Lee et al., "A novel 3D histotypic cartilage construct engineered by supercritical carbon dioxide decellularized porcine nasal cartilage graft and chondrocytes exhibited chondrogenic capability in vitro," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 18, no. 10, p. 2217, 2021.

- [13] S. P. Temizkan and R. Temizkan, "Dünyada ve Türkiye’de medikal turizm kapsamında plastik ve estetik cerrahi uygulamaların hizmet pazarlaması karması perspektifinden değerlendirilmesi," *Journal of Gastronomy Hospitality and Travel*, vol. 3, no. 2, pp. 284-298, 2020.
- [14] R. J. Rohrich and J. Ahmad, "Rhinoplasty," *Plastic and reconstructive surgery*, vol. 128, no. 2, pp. 49e-73e, 2011.
- [15] F. J. Menick, "Nasal reconstruction," *Plastic and reconstructive surgery*, vol. 125, no. 4, pp. 138e-150e, 2010.
- [16] H.-G. Yi et al., "Three-dimensional printing of a patient-specific engineered nasal cartilage for augmentative rhinoplasty," *Journal of tissue engineering*, vol. 10, p. 2041731418824797, 2019.
- [17] J. S. Chang, S. S. Becker, and S. S. Park, "Nasal reconstruction: the state of the art," *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, vol. 12, no. 4, pp. 336-343, 2004.
- [18] L. Lavernia, W. E. Brown, B. J. Wong, J. C. Hu, and K. A. Athanasiou, "Toward tissue-engineering of nasal cartilages," *Acta biomaterialia*, vol. 88, pp. 42-56, 2019.
- [19] L. Ruiz-Cantu, A. Gleadall, C. Faris, J. Segal, K. Shakesheff, and J. Yang, "Multi-material 3D bioprinting of porous constructs for cartilage regeneration," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 109, p. 110578, 2020.
- [20] K. Patel and K. Brandstetter, "Solid implants in facial plastic surgery: potential complications and how to prevent them," *Facial Plastic Surgery*, vol. 32, no. 05, pp. 520-531, 2016.
- [21] X. Lan et al., "In vitro maturation and in vivo stability of bioprinted human nasal cartilage," *Journal of Tissue Engineering*, vol. 13, p. 20417314221086368, 2022.
- [22] P. K. Farahani, "Application of Tissue Engineering and Biomaterials in Nose Surgery," *JPRAS Open*, 2023.
- [23] M. Griffin, B. Leung, Y. Premakumar, M. Szarko, and P. Butler, "Comparison of the mechanical properties of different skin sites for auricular and nasal reconstruction," *Journal of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, vol. 46, no. 1, p. 33, 2017.
- [24] A. O. Oseni, P. E. Butler, and A. M. Seifalian, "Nasal reconstruction using tissue engineered constructs: an update," *Annals of plastic surgery*, vol. 71, no. 2, pp. 238-244, 2013.
- [25] H. Yilmaz, I. F. Abdulazez, S. Gursoy, Y. Kazancioglu, and C. B. Ustundag, "Cartilage Tissue Engineering in Multilayer Tissue Regeneration," *Annals of Biomedical Engineering*, pp. 1-34, 2024.
- [26] P. E. Simon, K. Lam, D. Sidle, and B. K. Tan, "The Nasal Keystone Region," *JAMA Facial Plastic Surgery*, 2013.
- [27] M. Hajiabbas, I. Alemzadeh, and M. Vossoughi, "A porous hydrogel-electrospun composite scaffold made of oxidized alginate/gelatin/silk fibroin for tissue engineering application," *Carbohydrate polymers*, vol. 245, p. 116465, 2020.

- [28] M. Zhang et al., "Electrospun nanofiber/hydrogel composite materials and their tissue engineering applications," *Journal of Materials Science & Technology*, 2023.
- [29] T. Xu et al., "Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications," *Biofabrication*, vol. 5, no. 1, p. 015001, 2012.
- [30] S. P. Miguel, C. S. Cabral, A. F. Moreira, and I. J. Correia, "Production and characterization of a novel asymmetric 3D printed construct aimed for skin tissue regeneration," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 181, pp. 994-1003, 2019.
- [31] C. J. Thrasher, J. J. Schwartz, and A. J. Boydston, "Modular elastomer photoresins for digital light processing additive manufacturing," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 9, no. 45, pp. 39708-39716, 2017.
- [32] W. L. Ng et al., "Vat polymerization-based bioprinting—process, materials, applications and regulatory challenges," *Biofabrication*, vol. 12, no. 2, p. 022001, 2020.
- [33] F. Zhou et al., "Rapid printing of bio-inspired 3D tissue constructs for skin regeneration," *Biomaterials*, vol. 258, p. 120287, 2020.
- [34] Y. Hong et al., "A strongly adhesive hemostatic hydrogel for the repair of arterial and heart bleeds," *Nature communications*, vol. 10, no. 1, p. 2060, 2019.
- [35] S. Zare, M. Eskandani, S. Vandghanooni, H. Hossainpour, and M. Jaymand, "Ciprofloxacin-loaded chitosan-based nanocomposite hydrogel containing silica nanoparticles as a scaffold for bone tissue engineering application," *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, vol. 7, p. 100493, 2024.
- [36] S. Tripathi, B. N. Singh, D. Singh, G. Kumar, and P. Srivastava, "Optimization and evaluation of ciprofloxacin-loaded collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering," *3 Biotech*, vol. 11, no. 4, p. 160, 2021.
- [37] Z. Galliger, C. D. Vogt, H. R. Helms, and A. Panoskaltsis-Mortari, "Extracellular matrix microparticles improve GelMA bioink resolution for 3D bioprinting at ambient temperature," *Macromolecular materials and engineering*, vol. 307, no. 10, p. 2200196, 2022.
- [38] D. Dippold et al., "Novel approach towards aligned PCL-Collagen nanofibrous constructs from a benign solvent system," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 72, pp. 278-283, 2017.
- [39] M. Alves da Silva et al., "Cartilage tissue engineering using electrospun PCL nanofiber meshes and MSCs," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 12, pp. 3228-3236, 2010.
- [40] N. Siddiqui, S. Asawa, B. Birru, R. Baadhe, and S. Rao, "PCL-based composite scaffold matrices for tissue engineering applications," *Molecular biotechnology*, vol. 60, pp. 506-532, 2018.
- [41] Y. She et al., "3D Printed Biomimetic PCL Scaffold as framework interspersed with collagen for long segment tracheal replacement," *Frontiers in cell and developmental biology*, vol. 9, p. 33, 2021.

- [42] Y. Ito, "Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering," *Soft matter*, vol. 4, no. 1, pp. 46-56, 2008.
- [43] U. R. Goessler et al., "In-vitro analysis of the expression of TGFβ²-superfamily-members during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes during dedifferentiation in cell culture," *Cell Mol Biol Lett*, vol. 10, no. 2, pp. 345-362, 2005.
- [44] J. X. Xue, Y. Y. Gong, G. D. Zhou, W. Liu, Y. Cao, and W. J. Zhang, "Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by acellular cartilage sheets," *Biomaterials*, vol. 33, no. 24, pp. 5832-5840, 2012.
- [45] A. Mendelson, J. M. Ahn, K. Paluch, M. C. Embree, and J. J. Mao, "Engineered nasal cartilage by cell homing: a model for augmentative and reconstructive rhinoplasty," *Plastic and reconstructive surgery*, vol. 133, no. 6, pp. 1344-1353, 2014.
- [46] V. Păunescu et al., "In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage," *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 11, no. 3, pp. 502-508, 2007.
- [47] X. Li et al., "EGF and curcumin co-encapsulated nanoparticle/hydrogel system as potent skin regeneration agent," *International journal of nanomedicine*, pp. 3993-4009, 2016.
- [48] L. Bian, D. Y. Zhai, E. Tous, R. Rai, R. L. Mauck, and J. A. Burdick, "Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF-β³ from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo," *Biomaterials*, vol. 32, no. 27, pp. 6425-6434, 2011.
- [49] H. Jing et al., "Restoring tracheal defects in a rabbit model with tissue engineered patches based on TGF-β³-encapsulating electrospun poly (l-lactic acid-co-ε-caprolactone)/collagen scaffolds," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, vol. 46, no. sup1, pp. 985-995, 2018.
- [50] M. Zamani, M. P. Prabhakaran, and S. Ramakrishna, "Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials," *International journal of nanomedicine*, pp. 2997-3017, 2013.
- [51] H. Choukaife, A. A. Doolaanea, and M. Alfatama, "Alginate nanoformulation: Influence of process and selected variables," *Pharmaceuticals*, vol. 13, no. 11, p. 335, 2020.
- [52] S. Chen, Y. Wang, J. Lai, S. Tan, and M. Wang, "Structure and properties of gelatin methacryloyl (GelMA) synthesized in different reaction systems," *Biomacromolecules*, vol. 24, no. 6, pp. 2928-2941, 2023.
- [53] B. Felice, M. P. Prabhakaran, M. Zamani, A. P. Rodríguez, and S. Ramakrishna, "Electrosprayed poly (vinyl alcohol) particles: preparation and evaluation of their drug release profile," *Polymer International*, vol. 64, no. 12, pp. 1722-1732, 2015.
- [54] M. Alfatama, Y. Shahzad, and H. Choukaife, "Recent advances of electrospray technique for multiparticulate preparation: Drug delivery applications," *Advances in Colloid and Interface Science*, p. 103098, 2024.

- [55] D. Ding and Q. Zhu, "Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 92, pp. 1041-1060, 2018.
- [56] J. Raghunath, J. Rollo, K. M. Sales, P. E. Butler, and A. M. Seifalian, "Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage," *Biotechnology and applied biochemistry*, vol. 46, no. 2, pp. 73-84, 2007.
- [57] G. P. Verma, "Cartilage and Bone. Fundamentals of Histology.," *New age international*, vol. Chapter 5, 2001.
- [58] A. Preitschopf et al., "Chondrogenic differentiation of amniotic fluid stem cells and their potential for regenerative therapy," (in eng), *Stem Cell Rev*, vol. 8, no. 4, pp. 1267-74, Dec 2012, doi: 10.1007/s12015-012-9405-4.
- [59] V. C. Mow, A. Ratcliffe, and A. Robin Poole, "Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures," *Biomaterials*, vol. 13, no. 2, pp. 67-97, 1992.
- [60] R. Vasita and D. S. Katti, "Nanofibers and their applications in tissue engineering," *International Journal of nanomedicine*, vol. 1, no. 1, pp. 15-30, 2006.
- [61] J. A. Buckwalter and H. J. Mankin, "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions," (in eng), *Instr Course Lect*, vol. 47, pp. 477-86, 1998. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571449>.
- [62] J. Buckwalter and H. Mankin, "Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation," *Instructional course lectures*, vol. 47, pp. 487-504, 1997.
- [63] K. J. Anderson, M. Henneberg, and R. Norris, "Anatomy of the nasal profile," *Journal of anatomy*, vol. 213, no. 2, pp. 210-216, 2008.
- [64] J. L. Sobiesk and S. Munakomi, "Anatomy, head and neck, nasal cavity," 2019.
- [65] C. Clinic. "Nose." <https://my.clevelandclinic.org/health/body/21778-nose> accessed.
- [66] R. Jankowski et al., "The olfactory fascia: an evo–devo concept of the fibrocartilaginous nose," *Surgical and Radiologic Anatomy*, vol. 38, no. 10, pp. 1161-1168, 2016.
- [67] R. G. Patel, "Nasal anatomy and function," *Facial plastic surgery*, vol. 33, no. 01, pp. 003-008, 2017.
- [68] J. R. Yu et al., "Current and future perspectives on skin tissue engineering: key features of biomedical research, translational assessment, and clinical application," *Advanced healthcare materials*, vol. 8, no. 5, p. 1801471, 2019.
- [69] G. Singh and A. Chanda, "Mechanical properties of whole-body soft human tissues: a review," *Biomedical Materials*, vol. 16, no. 6, p. 062004, 2021.
- [70] K. S. Wu, W. W. Van Osdol, and R. H. Dauskardt, "Mechanical properties of human stratum corneum: effects of temperature, hydration, and chemical treatment," *Biomaterials*, vol. 27, no. 5, pp. 785-795, 2006.

- [71] Y. Yuan and R. Verma, "Measuring microelastic properties of stratum corneum," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 48, no. 1, pp. 6-12, 2006.
- [72] A. N. Annaidh, K. Bruyère, M. Destrade, M. D. Gilchrist, and M. Otténio, "Characterization of the anisotropic mechanical properties of excised human skin," *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 5, no. 1, pp. 139-148, 2012.
- [73] M. Ottenio, D. Tran, A. N. Annaidh, M. D. Gilchrist, and K. Bruyère, "Strain rate and anisotropy effects on the tensile failure characteristics of human skin," *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 41, pp. 241-250, 2015.
- [74] M. Popko, R. Bleys, J. De Groot, and E. H. Huizing, "Histological structure of the nasal cartilages and their perichondrial envelope I. The septal and lobular cartilage," *Rhinology*, vol. 45, no. 2, p. 148, 2007.
- [75] P. Baddam, T. Kung, A. B. Adesida, and D. Graf, "Histological and molecular characterization of the growing nasal septum in mice," *Journal of Anatomy*, vol. 238, no. 3, pp. 751-764, 2021.
- [76] T. B. Pham, R. L. Sah, K. Masuda, and D. Watson, "Human Septal Cartilage Tissue Engineering: Current Methodologies and Future Directions," *Bioengineering*, vol. 11, no. 11, p. 1123, 2024.
- [77] Z. Bagher, N. Asgari, P. Bozorgmehr, S. K. Kamrava, R. Alizadeh, and A. Seifalian, "Will tissue-engineering strategies bring new hope for the reconstruction of nasal septal cartilage?," *Current Stem Cell Research & Therapy*, vol. 15, no. 2, pp. 144-154, 2020.
- [78] P. Baddam, F. Bayona-Rodriguez, S. M. Campbell, H. El-Hakim, and D. Graf, "Properties of the nasal cartilage, from development to adulthood: a scoping review," *Cartilage*, vol. 13, no. 1, p. 19476035221087696, 2022.
- [79] B. J. Bielajew, J. C. Hu, and K. A. Athanasiou, "Collagen: quantification, biomechanics and role of minor subtypes in cartilage," *Nature Reviews Materials*, vol. 5, no. 10, pp. 730-747, 2020.
- [80] P. K. Holden, L. H. Liaw, and B. J. F. Wong, "Human nasal cartilage ultrastructure: characteristics and comparison using scanning electron microscopy," *The Laryngoscope*, vol. 118, no. 7, pp. 1153-1156, 2008.
- [81] C. Zhang, G. Wang, and Y. An, "Achieving Nasal Septal Cartilage In Situ Regeneration: Focus on Cartilage Progenitor Cells," *Biomolecules*, vol. 13, no. 9, p. 1302, 2023.
- [82] R. A. Brand, "Joint contact stress: a reasonable surrogate for biological processes?," *The Iowa orthopaedic journal*, vol. 25, p. 82, 2005.
- [83] N. Bailie, B. Hanna, J. Watterson, and G. Gallagher, "A model of airflow in the nasal cavities: Implications for nasal air conditioning and epistaxis," *American journal of rhinology & allergy*, vol. 23, no. 3, pp. 244-249, 2009.
- [84] C. Li et al., "Investigation of the abnormal nasal aerodynamics and trigeminal functions among empty nose syndrome patients," in *International forum of allergy & rhinology*, 2018, vol. 8, no. 3: Wiley Online Library, pp. 444-452.

- [85] Y.-J. Zeng, X.-p. Sun, J. Yang, W.-h. Wu, X.-h. Xu, and Y.-p. Yan, "Mechanical properties of nasal fascia and periosteum," *Clinical Biomechanics*, vol. 18, no. 8, pp. 760-764, 2003.
- [86] N. Rotter et al., "Age-related changes in the composition and mechanical properties of human nasal cartilage," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 403, no. 1, pp. 132-140, 2002.
- [87] J. D. Richmon et al., "Tensile biomechanical properties of human nasal septal cartilage," *American journal of rhinology*, vol. 19, no. 6, pp. 617-622, 2005.
- [88] J. D. Richmon, A. Sage, V. W. Wong, A. C. Chen, R. L. Sah, and D. Watson, "Compressive biomechanical properties of human nasal septal cartilage," *American journal of rhinology*, vol. 20, no. 5, pp. 496-501, 2006.
- [89] Z. Alkan et al., "Tensile characteristics of costal and septal cartilages used as graft materials," *Archives of facial plastic surgery*, vol. 13, no. 5, pp. 322-326, 2011.
- [90] M. Griffin, Y. Premakumar, A. Seifalian, M. Szarko, and P. Butler, "Biomechanical characterisation of the human nasal cartilages; implications for tissue engineering," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 27, pp. 1-6, 2016.
- [91] T. Aziz, V. L. Biron, K. Ansari, and C. Flores-Mir, "Measurement tools for the diagnosis of nasal septal deviation: a systematic review," *Journal of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, vol. 43, no. 1, p. 11, 2014.
- [92] S. P. Most and S. F. Rudy, "Septoplasty: basic and advanced techniques," *Facial plastic surgery clinics of North America*, vol. 25, no. 2, pp. 161-169, 2017.
- [93] W. Heppt and W. Gubisch, "Septal surgery in rhinoplasty," *Facial Plastic Surgery*, vol. 27, no. 02, pp. 167-178, 2011.
- [94] E. Caimi, A. Balza, S. Vaccari, V. Bandi, F. Klinger, and V. Vinci, "Optimizing Postoperative Care in Rhinoplasty and Septoplasty: A Review of the Role of Nasal Packing and Alternatives in Complication Management," *Aesthetic Plastic Surgery*, pp. 1-6, 2024.
- [95] B. Shi and H. Huang, "Computational technology for nasal cartilage-related clinical research and application," *International Journal of Oral Science*, vol. 12, no. 1, p. 21, 2020.
- [96] M. Bussi, F. Palonta, and S. Toma, "Grafting in revision rhinoplasty," *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, vol. 33, no. 3, p. 183, 2013.
- [97] J. P. Gunter, A. Landecker, and C. S. Cochran, "Frequently used grafts in rhinoplasty: nomenclature and analysis," *Plastic and reconstructive surgery*, vol. 118, no. 1, pp. 14e-29e, 2006.
- [98] J. R. Himeles and D. Ratner, "Cartilage tissue engineering for nasal alar and auricular reconstruction: A critical review of the literature and implications for practice in dermatologic surgery," *Dermatologic Surgery*, vol. 49, no. 8, pp. 732-742, 2023.

- [99] K. Ohara, K. Nakamura, and E. Ohta, "Chest wall deformities and thoracic scoliosis after costal cartilage graft harvesting," *Plastic and reconstructive surgery*, vol. 99, no. 4, pp. 1030-1036, 1997.
- [100] J. H. Wee et al., "Autologous vs irradiated homologous costal cartilage as graft material in rhinoplasty," *JAMA facial plastic surgery*, vol. 19, no. 3, pp. 183-188, 2017.
- [101] C. Jacquemoud, K. Bruyère-Garnier, and M. Coret, "Methodology to determine failure characteristics of planar soft tissues using a dynamic tensile test," *Journal of biomechanics*, vol. 40, no. 2, pp. 468-475, 2007.
- [102] T. Schmidt, Y. Xiang, X. Bao, and T. Sun, "A paradigm shift in tissue engineering: from a top-down to a bottom-up strategy," *Processes*, vol. 9, no. 6, p. 935, 2021.
- [103] Y. Cao, S. Sang, Y. An, C. Xiang, Y. Li, and Y. Zhen, "Progress of 3D printing techniques for nasal cartilage regeneration," *Aesthetic Plastic Surgery*, pp. 1-18, 2022.
- [104] L. Geris and I. Papantoniou, "The third era of tissue engineering: reversing the innovation drivers," *Tissue Engineering Part A*, vol. 25, no. 11-12, pp. 821-826, 2019.
- [105] M. Kaviani and B. Geramizadeh, "Basic aspects of skin tissue engineering: cells, biomaterials, scaffold fabrication techniques, and signaling factors," *Journal of Medical and Biological Engineering*, vol. 43, no. 5, pp. 508-521, 2023.
- [106] F. Fayyazbakhsh and M. C. Leu, "A brief review on 3D bioprinted skin substitutes," *Procedia Manufacturing*, vol. 48, pp. 790-796, 2020.
- [107] A. A. Chaudhari et al., "Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review," *International journal of molecular sciences*, vol. 17, no. 12, p. 1974, 2016.
- [108] L. L. Chiu, W. T. To, J. M. Lee, and S. D. Waldman, "Scaffold-free cartilage tissue engineering with a small population of human nasoseptal chondrocytes," *The Laryngoscope*, vol. 127, no. 3, pp. E91-E99, 2017.
- [109] C. Chung and J. A. Burdick, "Engineering cartilage tissue," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, no. 2, pp. 243-262, 2008.
- [110] B. Johnstone et al., "Tissue engineering for articular cartilage repair—the state of the art," *Eur Cell Mater*, vol. 25, no. 248, p. e67, 2013.
- [111] J. P. Vacanti and R. Langer, "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation," *The lancet*, vol. 354, pp. S32-S34, 1999.
- [112] J. Gao, J. Yao, and A. Caplan, "Stem cells for tissue engineering of articular cartilage," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 221, no. 5, pp. 441-450, 2007.
- [113] J. Dominice, C. Levasseur, S. Larno, X. Ronot, and M. Adolphe, "Age-related changes in rabbit articular chondrocytes," *Mechanisms of ageing and development*, vol. 37, no. 3, pp. 231-240, 1986.

- [114] G. Schulze-Tanzil, "Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair," (in eng), *Ann Anat*, vol. 191, no. 4, pp. 325-38, Oct 2009, doi: 10.1016/j.aanat.2009.05.003 S0940-9602(09)00070-3 [pii].
- [115] A. J. Detterline, S. Goldberg, B. R. Bach, Jr., and B. J. Cole, "Treatment options for articular cartilage defects of the knee," (in eng), *Orthop Nurs*, vol. 24, no. 5, pp. 361-6; quiz 367-8, Sep-Oct 2005, doi: 00006416-200509000-00012 [pii].
- [116] H. Obokata and C. A. Vacanti, "Stem Cells in Tissue Engineering," in *Principles of tissue engineering*: Elsevier, 2014, pp. 595-608.
- [117] S.-I. Motegi and O. Ishikawa, "Mesenchymal stem cells: The roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth," *Journal of Dermatological Science*, vol. 86, no. 2, pp. 83-89, 2017.
- [118] Y. Wu, L. Chen, P. G. Scott, and E. E. Tredget, "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis," *Stem cells*, vol. 25, no. 10, pp. 2648-2659, 2007.
- [119] G. Saini, N. Segaran, J. L. Mayer, A. Saini, H. Albadawi, and R. Oklu, "Applications of 3D bioprinting in tissue engineering and regenerative medicine," *Journal of clinical medicine*, vol. 10, no. 21, p. 4966, 2021.
- [120] K. Klimek and G. Ginalska, "Proteins and peptides as important modifiers of the polymer scaffolds for tissue engineering applications—a review," *Polymers*, vol. 12, no. 4, p. 844, 2020.
- [121] J. E. Babensee, L. V. McIntire, and A. G. Mikos, "Growth factor delivery for tissue engineering," *Pharmaceutical research*, vol. 17, pp. 497-504, 2000.
- [122] M. Qu et al., "Stimuli-responsive delivery of growth factors for tissue engineering," *Advanced healthcare materials*, vol. 9, no. 7, p. 1901714, 2020.
- [123] R. R. Chen and D. J. Mooney, "Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering," *Pharmaceutical research*, vol. 20, pp. 1103-1112, 2003.
- [124] X. Ren, M. Zhao, B. Lash, M. M. Martino, and Z. Julier, "Growth factor engineering strategies for regenerative medicine applications," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 7, p. 469, 2020.
- [125] E. Rinderknecht and R. E. Humbel, "The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 253, no. 8, pp. 2769-2776, 1978.
- [126] M. Gümüşderelioğlu, S. Dalkıranoğlu, R. S. T. Aydın, and S. Çakmak, "A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix," *Journal of biomedical materials research Part A*, vol. 98, no. 3, pp. 461-472, 2011.
- [127] J. X. Wan, Z. H. Zou, D. Y. You, J. Cui, and Y. B. Pan, "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiation into tubular epithelial-like cells in vitro," *Cell biochemistry and function*, vol. 30, no. 2, pp. 129-138, 2012.
- [128] X. Du, L. Cai, J. Xie, and X. Zhou, "The role of TGF-beta3 in cartilage development and osteoarthritis," *Bone research*, vol. 11, no. 1, p. 2, 2023.

- [129] I. Pastar et al., "Epithelialization in wound healing: a comprehensive review," *Advances in wound care*, vol. 3, no. 7, pp. 445-464, 2014.
- [130] P. Rousselle, F. Braye, and G. Dayan, "Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 146, pp. 344-365, 2019.
- [131] R. Hazrati, S. Davaran, P. Keyhanvar, S. Soltani, and E. Alizadeh, "A Systematic Review of Stem Cell Differentiation into Keratinocytes for Regenerative Applications," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 20, no. 1, pp. 362-393, 2024.
- [132] H.-W. Fang, "Trends and challenges of cartilage tissue engineering," *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, vol. 21, no. 03, pp. 149-155, 2009.
- [133] P. K. Farahani, "Application of tissue engineering and biomaterials in nose surgery," *Jpras Open*, vol. 40, pp. 262-272, 2024.
- [134] L. A. Solchaga, K. J. Penick, and J. F. Welter, "Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks," *Mesenchymal stem cell assays and applications*, pp. 253-278, 2011.
- [135] J. C. Courtenay, R. I. Sharma, and J. L. Scott, "Recent advances in modified cellulose for tissue culture applications," *Molecules*, vol. 23, no. 3, p. 654, 2018.
- [136] F. J. O'brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Materials today*, vol. 14, no. 3, pp. 88-95, 2011.
- [137] M. L. Chinta, A. Velidandi, N. P. P. Pabbathi, S. Dahariya, and S. R. Parcha, "Assessment of properties, applications and limitations of scaffolds based on cellulose and its derivatives for cartilage tissue engineering: A review," *International journal of biological macromolecules*, vol. 175, pp. 495-515, 2021.
- [138] C. Bertsch et al., "Biomimetic bilayered scaffolds for tissue engineering: from current design strategies to medical applications," *Advanced healthcare materials*, vol. 12, no. 17, p. 2203115, 2023.
- [139] M. Rahmati et al., "Electrospinning for tissue engineering applications," *Progress in Materials Science*, vol. 117, p. 100721, 2021.
- [140] P. Deb, A. B. Deoghare, A. Borah, E. Barua, and S. D. Lala, "Scaffold development using biomaterials: a review," *Materials Today: Proceedings*, vol. 5, no. 5, pp. 12909-12919, 2018.
- [141] A. Prasad, "State of art review on bioabsorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering," *Materials Today: Proceedings*, vol. 44, pp. 1391-1400, 2021.
- [142] S. S. Shahriar et al., "Next-generation 3D scaffolds for nano-based chemotherapeutics delivery and cancer treatment," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 12, p. 2712, 2022.
- [143] D. W. Hutmacher, "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 12, no. 1, pp. 107-124, 2001.

- [144] B. C. Simionescu and D. Ivanov, "Natural and synthetic polymers for designing composite materials," in *Handbook of bioceramics and biocomposites*: Springer, 2016, pp. 233-286.
- [145] S. Gautam and S. Ambwani, "Tissue engineering: new paradigm of biomedicine," *Biosciences Biotechnology Research Asia*, vol. 16, no. 3, pp. 521-532, 2019.
- [146] F. Baino, G. Novajra, and C. Vitale-Brovarone, "Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 3, p. 202, 2015.
- [147] S. Liu et al., "Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications," *Military Medical Research*, vol. 10, no. 1, p. 16, 2023.
- [148] G. Choi and H. J. Cha, "Recent advances in the development of nature-derived photocrosslinkable biomaterials for 3D printing in tissue engineering," *Biomaterials research*, vol. 23, no. 1, p. 18, 2019.
- [149] W. Ye et al., "3D printing of gelatin methacrylate-based nerve guidance conduits with multiple channels," *Materials & Design*, vol. 192, p. 108757, 2020.
- [150] Y. Chen et al., "Comparison of globular albumin methacryloyl and random-coil gelatin methacryloyl: Preparation, hydrogel properties, cell behaviors, and mineralization," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 204, pp. 692-708, 2022.
- [151] A. T. Young, O. C. White, and M. A. Daniele, "Rheological properties of coordinated physical gelation and chemical crosslinking in gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels," *Macromolecular bioscience*, vol. 20, no. 12, p. 2000183, 2020.
- [152] R. N. Ghosh et al., "An insight into synthesis, properties and applications of gelatin methacryloyl hydrogel for 3D bioprinting," *Materials Advances*, vol. 4, no. 22, pp. 5496-5529, 2023.
- [153] B. H. Lee, N. Lum, L. Y. Seow, P. Q. Lim, and L. P. Tan, "Synthesis and characterization of types A and B gelatin methacryloyl for bioink applications," *Materials*, vol. 9, no. 10, p. 797, 2016.
- [154] C. Peyret et al., "Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogel Scaffolds: Predicting Physical Properties Using an Experimental Design Approach," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 17, p. 13359, 2023.
- [155] N. Monteiro et al., "Photopolymerization of cell-laden gelatin methacryloyl hydrogels using a dental curing light for regenerative dentistry," *Dental materials*, vol. 34, no. 3, pp. 389-399, 2018.
- [156] N. E. Fedorovich, M. H. Oudshoorn, D. van Geemen, W. E. Hennink, J. Alblas, and W. J. Dhert, "The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels," *Biomaterials*, vol. 30, no. 3, pp. 344-353, 2009.
- [157] H. Shirahama, B. H. Lee, L. P. Tan, and N.-J. Cho, "Precise tuning of facile one-pot gelatin methacryloyl (GelMA) synthesis," *Scientific reports*, vol. 6, no. 1, p. 31036, 2016.

- [158] C. Claaßen et al., "Quantification of substitution of gelatin methacryloyl: best practice and current pitfalls," *Biomacromolecules*, vol. 19, no. 1, pp. 42-52, 2018.
- [159] Y.-S. Lim, Y.-J. Ok, S.-Y. Hwang, J.-Y. Kwak, and S. Yoon, "Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications," *Marine drugs*, vol. 17, no. 8, p. 467, 2019.
- [160] P. Phutane, D. Telange, S. Agrawal, M. Gunde, K. Kotkar, and A. Pethe, "Biofunctionalization and applications of polymeric nanofibers in tissue engineering and regenerative medicine," *Polymers*, vol. 15, no. 5, p. 1202, 2023.
- [161] S. S. Karapehlivan et al., "Fabrication and In Vitro Characterization of Polycaprolactone/Graphene Oxide/Collagen Nanofibers for Myocardial Repair," *Macromolecular Materials and Engineering*, p. 2300189, 2023.
- [162] A. Cipitria, A. Skelton, T. Dargaville, P. Dalton, and D. Hutmacher, "Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, no. 26, pp. 9419-9453, 2011.
- [163] R. Sreena and A. J. Nathanael, "Biodegradable biopolymeric nanoparticles for biomedical applications-challenges and future outlook," *Materials*, vol. 16, no. 6, p. 2364, 2023.
- [164] N. M. Ranjha and S. Khan, "Chitosan/poly (vinyl alcohol) based hydrogels for biomedical applications: a review," *J. Pharm. Altern. Med*, vol. 2, no. 1, pp. 30-41, 2013.
- [165] M. I. Echeverria Molina, K. G. Malollari, and K. Komvopoulos, "Design challenges in polymeric scaffolds for tissue engineering," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, p. 617141, 2021.
- [166] M. Jiménez, L. Romero, I. A. Domínguez, M. d. M. Espinosa, and M. Domínguez, "Additive manufacturing technologies: an overview about 3D printing methods and future prospects," *Complexity*, vol. 2019, no. 1, p. 9656938, 2019.
- [167] Y. Bozkurt and E. Karayel, "3D printing technology; methods, biomedical applications, future opportunities and trends," *Journal of Materials Research and Technology*, vol. 14, pp. 1430-1450, 2021.
- [168] J. R. C. Dizon, A. H. Espera Jr, Q. Chen, and R. C. Advincula, "Mechanical characterization of 3D-printed polymers," *Additive manufacturing*, vol. 20, pp. 44-67, 2018.
- [169] K. Tappa and U. Jammalamadaka, "Novel biomaterials used in medical 3D printing techniques," *Journal of functional biomaterials*, vol. 9, no. 1, p. 17, 2018.
- [170] G. Taormina, C. Sciancalepore, M. Messori, and F. Bondioli, "3D printing processes for photocurable polymeric materials: technologies, materials, and future trends," *Journal of applied biomaterials & functional materials*, vol. 16, no. 3, pp. 151-160, 2018.

- [171] S. Kidalov, A. Voznyakovskii, A. Vozniakovskii, S. Titova, and Y. Auchynnika, "The Effect of Few-Layer Graphene on the Complex of Hardness, Strength, and Thermo Physical Properties of Polymer Composite Materials Produced by Digital Light Processing (DLP) 3D Printing," *Materials*, vol. 16, no. 3, p. 1157, 2023.
- [172] X. Mo, L. Ouyang, Z. Xiong, and T. Zhang, "Advances in digital light processing of hydrogels," *Biomedical Materials*, vol. 17, no. 4, p. 042002, 2022.
- [173] W. Zhu, X. Ma, M. Gou, D. Mei, K. Zhang, and S. Chen, "3D printing of functional biomaterials for tissue engineering," *Current opinion in biotechnology*, vol. 40, pp. 103-112, 2016.
- [174] D. Cafiso et al., "3D printing of fully cellulose-based hydrogels by digital light processing," *Sustainable Materials and Technologies*, vol. 32, p. e00444, 2022.
- [175] Y. Dong et al., "A high-performance GelMA–GelMA homogeneous double-network hydrogel assisted by 3D printing," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 10, no. 20, pp. 3906-3915, 2022.
- [176] H. Yılmaz et al., "Development of bilayer tissue-engineered scaffolds: combination of 3D printing and electrospinning methodologies," *Biomedical Materials*, 2024.
- [177] T. Bedir et al., "Three-Dimensional-Printed GelMA-KerMA Composite Patches as an Innovative Platform for Potential Tissue Engineering of Tympanic Membrane Perforations," *Nanomaterials*, vol. 14, no. 7, p. 563, 2024.
- [178] G. Menassol et al., "Gelatin–collagen photo-crosslinkable 3D matrixes for skin regeneration," *Biomaterials Science*, vol. 12, no. 7, pp. 1738-1749, 2024.
- [179] Y. Tang et al., "Advances in preparation and application of antibacterial hydrogels," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 21, no. 1, p. 300, 2023.
- [180] P. C. Sharma, A. Jain, S. Jain, R. Pahwa, and M. S. Yar, "Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects," *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, vol. 25, no. 4, pp. 577-589, 2010.
- [181] D. M. Campoli-Richards, J. P. Monk, A. Price, P. Benfield, P. A. Todd, and A. Ward, "Ciprofloxacin: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use," *Drugs*, vol. 35, pp. 373-447, 1988.
- [182] M. LeBel, "Ciprofloxacin: chemistry, mechanism of action, resistance, antimicrobial spectrum, pharmacokinetics, clinical trials, and adverse reactions," *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, vol. 8, no. 1, pp. 3-30, 1988.
- [183] J.-F. Schlender et al., "A physiologically-based pharmacokinetic model to describe ciprofloxacin pharmacokinetics over the entire span of life," *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 57, pp. 1613-1634, 2018.

- [184] T. Thai, B. H. Salisbury, and P. M. Zito, "Ciprofloxacin," in StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing, 2023.
- [185] A. Bajpai and R. Gupta, "Magnetically mediated release of ciprofloxacin from polyvinyl alcohol based superparamagnetic nanocomposites," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 22, pp. 357-369, 2011.
- [186] V. Nardello-Rataj and L. Leclercq, "Encapsulation of biocides by cyclodextrins: toward synergistic effects against pathogens," *Beilstein journal of organic chemistry*, vol. 10, no. 1, pp. 2603-2622, 2014.
- [187] G. K. Sharma and N. R. James, "Electrospinning: The Technique and Applications," in *Recent Developments in Nanofibers Research*: Intechopen, 2022.
- [188] M. P. Arrieta, A. Leonés Gil, M. Yusef, J. M. Kenny, and L. Peponi, "Electrospinning of PCL-based blends: Processing optimization for their scalable production," *Materials*, vol. 13, no. 17, p. 3853, 2020.
- [189] C. Wang et al., "Fabrication of electrospun polymer nanofibers with diverse morphologies," *Molecules*, vol. 24, no. 5, p. 834, 2019.
- [190] A. Kurowska et al., "Layered PCL scaffolds modified with bioactive additives fabricated by electrospinning and 3D-printing for the nasal bone and cartilage defects," *Materials & Design*, vol. 233, p. 112255, 2023.
- [191] I. Rajzer et al., "Electrospun polycaprolactone membranes with Zn-doped bioglass for nasal tissues treatment," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 30, pp. 1-11, 2019.
- [192] S. San-Marina, A. Sharma, S. G. Voss, J. R. Janus, and G. S. Hamilton, "Assessment of scaffolding properties for chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells in nasal reconstruction," *JAMA facial plastic surgery*, vol. 19, no. 2, pp. 108-114, 2017.
- [193] S. Gautam et al., "Surface modification of PCL-gelatin-chitosan electrospun scaffold by nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering," *Materials Today Communications*, vol. 34, p. 105237, 2023.
- [194] H. Kim et al., "Improved chondrogenic performance with protective tracheal design of Chitosan membrane surrounding 3D-printed trachea," *Scientific reports*, vol. 11, no. 1, pp. 1-8, 2021.
- [195] M. Lashkari et al., "Cell-based wound dressing: Bilayered PCL/gelatin nanofibers-alginate/collagen hydrogel scaffold loaded with mesenchymal stem cells," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 239, p. 124099, 2023.
- [196] H. Ding, Y. Cheng, X. Niu, and Y. Hu, "Application of electrospun nanofibers in bone, cartilage and osteochondral tissue engineering," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 32, no. 4, pp. 536-561, 2020.
- [197] S. M. Doodmani, A. Bagheri, O. Natouri, A. Nobakht, and S. Saghebasl, "Electrospinning-netting of spider-inspired polycaprolactone/collagen nanofiber-nets incorporated with Propolis extract for enhanced wound healing applications," *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 131452, 2024.

- [198] X. Lu et al., "Construction of PCL-collagen@ PCL@ PCL-gelatin three-layer small diameter artificial vascular grafts by electrospinning," *Biomedical Materials*, vol. 18, no. 1, p. 015008, 2022.
- [199] P. Huo, X. Han, W. Zhang, J. Zhang, P. Kumar, and B. Liu, "Electrospun nanofibers of polycaprolactone/collagen as a sustained-release drug delivery system for artemisinin," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 8, p. 1228, 2021.
- [200] Z. Xie et al., "Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing," *Acta biomaterialia*, vol. 9, no. 12, pp. 9351-9359, 2013.
- [201] S. K. Boda, X. Li, and J. Xie, "Electrospraying an enabling technology for pharmaceutical and biomedical applications: A review," *Journal of aerosol science*, vol. 125, pp. 164-181, 2018.
- [202] A. Jaworek, A. Sobczyk, and A. Krupa, "Electrospray application to powder production and surface coating," *Journal of Aerosol Science*, vol. 125, pp. 57-92, 2018.
- [203] H. Wang et al., "Electrospun poly (methyl methacrylate) nanofibers and microparticles," *Journal of materials science*, vol. 45, pp. 1032-1038, 2010.
- [204] A. Í. Morais et al., "Fabrication of polymeric microparticles by electrospray: the impact of experimental parameters," *Journal of functional biomaterials*, vol. 11, no. 1, p. 4, 2020.
- [205] R. Sable, P. Maity, and K. Kapat, "Applications of Electrospraying in Tissue Repair and Regeneration," 2024.
- [206] W. Jia et al., "A multicrosslinked network composite hydrogel scaffold based on dlp photocuring printing for nasal cartilage repair," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 121, no. 9, pp. 2752-2766, 2024.
- [207] D. Zhang et al., "A TGF-loading hydrogel scaffold capable of promoting chondrogenic differentiation for repairing rabbit nasal septum cartilage defect," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10, p. 1057904, 2022.
- [208] L. Huber et al., "In situ regeneration of nasal septal defects using acellular cartilage enhanced with platelet-derived growth factor," *Journal of Tissue Engineering*, vol. 13, p. 20417314221114423, 2022.
- [209] X. Lan et al., "Bioprinting of human nasoseptal chondrocytes-laden collagen hydrogel for cartilage tissue engineering," *The FASEB Journal*, vol. 35, no. 3, p. e21191, 2021.
- [210] S. Sang et al., "BC enhanced photocurable hydrogel based on 3D bioprinting for nasal cartilage repair," *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, pp. 1-12, 2022.
- [211] P. Zare et al., "An additive manufacturing-based 3D printed poly ϵ -caprolactone/alginate sulfate/extracellular matrix construct for nasal cartilage regeneration," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 110, no. 6, pp. 1199-1209, 2022.

- [212] A. Shokri et al., "In vivo efficacy of 3D-printed elastin–gelatin–hyaluronic acid scaffolds for regeneration of nasal septal cartilage defects," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 110, no. 3, pp. 614-624, 2022.
- [213] I. Rajzer et al., "Biomaterials in the reconstruction of nasal septum perforation," *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, vol. 130, no. 7, pp. 731-737, 2021.
- [214] C. Kuhlmann et al., "Experimental approach to nasal septal cartilage regeneration with adipose tissue-derived stem cells and decellularized porcine septal cartilage," *Xenotransplantation*, vol. 28, no. 2, p. e12660, 2021.
- [215] D. D'Alessandro et al., "Poly (vinyl alcohol)/Gelatin Scaffolds Allow Regeneration of Nasal Tissues," *Applied Sciences*, vol. 11, no. 8, p. 3651, 2021.
- [216] S. S. Garakani et al., "Fabrication of chitosan/agarose scaffolds containing extracellular matrix for tissue engineering applications," *International journal of biological macromolecules*, vol. 143, pp. 533-545, 2020.
- [217] I. Rajzer et al., "Scaffolds modified with graphene as future implants for nasal cartilage," *Journal of Materials Science*, vol. 55, no. 9, pp. 4030-4042, 2020.
- [218] A. von Bomhard et al., "Cartilage regeneration using decellularized cartilage matrix: Long-term comparison of subcutaneous and intranasal placement in a rabbit model," *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, vol. 47, no. 4, pp. 682-694, 2019.
- [219] N. Gupta, M. A. Cruz, P. Nasser, J. D. Rosenberg, and J. C. Iatridis, "Fibrinogenipin hydrogel for cartilage tissue engineering in nasal reconstruction," *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, vol. 128, no. 7, pp. 640-646, 2019.
- [220] P. Aramwit, N. Jaichawa, J. Ratanavaraporn, and T. Srichana, "A comparative study of type A and type B gelatin nanoparticles as the controlled release carriers for different model compounds," *Materials Express*, vol. 5, no. 3, pp. 241-248, 2015.
- [221] K. Na et al., "Effect of solution viscosity on retardation of cell sedimentation in DLP 3D printing of gelatin methacrylate/silk fibroin bioink," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 61, pp. 340-347, 2018.
- [222] K. Elkhoury et al., "Synthesis and characterization of C2C12-laden gelatin methacryloyl (GelMA) from marine and mammalian sources," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 183, pp. 918-926, 2021.
- [223] S. Das, J. T. Jegadeesan, and B. Basu, "Gelatin Methacryloyl (GelMA)-Based Biomaterial Inks: Process Science for 3D/4D Printing and Current Status," *Biomacromolecules*, vol. 25, no. 4, pp. 2156-2221, 2024.
- [224] Q. Hu, M. A. Torres, H. Pan, S. L. Williams, and M. Ecker, "Precision Engineering of Chondrocyte Microenvironments: Investigating the Optimal Reaction Conditions for Type B Gelatin Methacrylate Hydrogel Matrix for TC28a2 Cells," *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 15, no. 3, p. 77, 2024.
- [225] H. Yilmaz et al., "Comparative studies of GelMA hydrogels: investigating the effect of different source on mechanical, physical and biological properties," *Materials Research Express*, 2024.

- [226] H. Erkus et al., "Innovative transdermal drug delivery system based on amoxicillin-loaded gelatin methacryloyl microneedles obtained by 3D printing," *Materialia*, vol. 27, p. 101700, 2023.
- [227] M. Z. H. Khan, M. A. Aziz, M. R. Hasan, and M. R. Al-Mamun, "The role of drug as corrosion inhibitor for mild steel surface characterization by SEM, AFM, and FTIR," *Anti-Corrosion Methods and Materials*, vol. 63, no. 4, pp. 308-315, 2016.
- [228] M. A. Habeeb and W. H. Rahdi, "Titanium carbide nanoparticles filled PVA-PAAm nanocomposites: structural and electrical characteristics for application in energy storage," *Optical and Quantum Electronics*, vol. 55, no. 4, p. 334, 2023.
- [229] S. Cesur, M. E. Cam, F. S. Sayin, and O. Gunduz, "Electrically controlled drug release of donepezil and BiFeO₃ magnetic nanoparticle-loaded PVA microbubbles/nanoparticles for the treatment of Alzheimer's disease," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 67, p. 102977, 2022.
- [230] O. N. Öztel, H. Yilmaz, İ. A. İsoğlu, And A. Allahverdiyev, "Investigation of the Interaction of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells with ϵ -Polycaprolactone and Egg White Scaffolds," *Gazi University Journal of Science*, pp. 1-1, 2023.
- [231] T. Riaz et al., "FTIR analysis of natural and synthetic collagen," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 53, no. 9, pp. 703-746, 2018.
- [232] O. Ata et al., "Structural and molecular characterization of collagen-type I extracted from lamb feet," *Journal of Food Science*, 2023.
- [233] K. Da Silva, P. Kumar, S. F. van Vuuren, V. Pillay, and Y. E. Choonara, "Three-dimensional printability of an ECM-based gelatin methacryloyl (GelMA) biomaterial for potential neuroregeneration," *ACS omega*, vol. 6, no. 33, pp. 21368-21383, 2021.
- [234] W. Cheng et al., "Artificial extracellular matrix delivers TGF β 1 regulating myofibroblast differentiation," *RSC advances*, vol. 6, no. 26, pp. 21922-21928, 2016.
- [235] V. Samouillan et al., "Effect of low-temperature plasma jet on thermal stability and physical structure of type I collagen," *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 40, no. 6, pp. 1688-1695, 2012.
- [236] S. Gupta et al., "Composition dependent structural modulations in transparent poly (vinyl alcohol) hydrogels," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 74, no. 1, pp. 186-190, 2009.
- [237] G.-M. Kim, "Fabrication of bio-nanocomposite nanofibers mimicking the mineralized hard tissues via electrospinning process," *Nanofibers*, pp. 69-88, 2010.
- [238] C. Sanhueza et al., "Osteoinductive Electrospun Scaffold Based on PCL-Col as a Regenerative Therapy for Peri-Implantitis," *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 7, p. 1939, 2023.

- [239] A. A. Aldana, L. Malatto, M. A. U. Rehman, A. R. Boccaccini, and G. A. Abraham, "Fabrication of gelatin methacrylate (GelMA) scaffolds with nano- and micro-topographical and morphological features," *Nanomaterials*, vol. 9, no. 1, p. 120, 2019.
- [240] N. Mamidi, R. M. Velasco Delgadillo, and E. V. Barrera, "Covalently functionalized carbon nano-onions integrated gelatin methacryloyl nanocomposite hydrogel containing γ -cyclodextrin as drug carrier for high-performance pH-triggered drug release," *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 4, p. 291, 2021.
- [241] L. Tang et al., "GelMA Hydrogel Loaded with Extracellular Vesicles Derived from Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for Promoting Cutaneous Diabetic Wound Healing," *ACS omega*, vol. 8, no. 11, pp. 10030-10039, 2023.
- [242] A. Bakravi, Y. Ahamadian, H. Hashemi, and H. Namazi, "Synthesis of gelatin-based biodegradable hydrogel nanocomposite and their application as drug delivery agent," *Advances in Polymer Technology*, vol. 37, no. 7, pp. 2625-2635, 2018.
- [243] N. H. Thang, T. B. Chien, and D. X. Cuong, "Polymer-based hydrogels applied in drug delivery: An overview," *Gels*, vol. 9, no. 7, p. 523, 2023.
- [244] F. Mukasheva, L. Adilova, A. Dyussenbinov, B. Yernaimanova, M. Abilev, and D. Akilbekova, "Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 12, p. 1444986, 2024.
- [245] A. G. Kanani and S. H. Bahrami, "Effect of changing solvents on poly (ϵ -caprolactone) nanofibrous webs morphology," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2011, pp. 1-10, 2011.
- [246] D. Kai, M. P. Prabhakaran, B. Stahl, M. Eblenkamp, E. Wintermantel, and S. Ramakrishna, "Mechanical properties and in vitro behavior of nanofiber-hydrogel composites for tissue engineering applications," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 9, p. 095705, 2012.
- [247] Y. Zhang et al., "Polymer fiber scaffolds for bone and cartilage tissue engineering," *Advanced Functional Materials*, vol. 29, no. 36, p. 1903279, 2019.
- [248] J.-B. Choi et al., "Fabrication and characterization of biodegradable gelatin methacrylate/biphasic calcium phosphate composite hydrogel for bone tissue engineering," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 3, p. 617, 2021.
- [249] Q. Zhang, S. Lv, J. Lu, S. Jiang, and L. Lin, "Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity," *International journal of biological macromolecules*, vol. 76, pp. 94-101, 2015.
- [250] P. Vahedi, S. Jarolmasjed, H. Shafaei, L. Roshangar, J. S. Rad, and E. Ahmadian, "In vivo articular cartilage regeneration through infrapatellar adipose tissue derived stem cell in nanofiber polycaprolactone scaffold," *Tissue and Cell*, vol. 57, pp. 49-56, 2019.

- [251] M. Zhang et al., "Electrospun nanofiber/hydrogel composite materials and their tissue engineering applications," *Journal of Materials Science & Technology*, vol. 162, pp. 157-178, 2023.
- [252] M. Vigata, C. Meinert, N. Bock, B. L. Dargaville, and D. W. Hutmacher, "Deciphering the molecular mechanism of water interaction with gelatin methacryloyl hydrogels: Role of ionic strength, pH, drug loading and hydrogel network characteristics," *Biomedicines*, vol. 9, no. 5, p. 574, 2021.
- [253] H. Xu, J. Casillas, S. Krishnamoorthy, and C. Xu, "Effects of Irgacure 2959 and lithium phenyl-2, 4, 6-trimethylbenzoylphosphinate on cell viability, physical properties, and microstructure in 3D bioprinting of vascular-like constructs," *Biomedical Materials*, vol. 15, no. 5, p. 055021, 2020.
- [254] S. M. H. Bukhari, S. Khan, M. Rehanullah, and N. M. Ranjha, "Synthesis and Characterization of Chemically Cross-Linked Acrylic Acid/Gelatin Hydrogels: Effect of pH and Composition on Swelling and Drug Release," *International Journal of Polymer Science*, vol. 2015, no. 1, p. 187961, 2015.
- [255] Y. E. Aguirre-Chagala, V. Altuzar, E. León-Sarabia, J. C. Tinoco-Magaña, J. M. Yañez-Limón, and C. Mendoza-Barrera, "Physicochemical properties of polycaprolactone/collagen/elastin nanofibers fabricated by electrospinning," *Materials science and engineering: C*, vol. 76, pp. 897-907, 2017.
- [256] P. Moradipour, M. Limoe, S. Janfaza, and L. Behbood, "Core-shell nanofibers based on polycaprolactone/polyvinyl alcohol and polycaprolactone/collagen for biomedical applications," *Journal of Pharmaceutical Innovation*, vol. 17, no. 3, pp. 911-920, 2022.
- [257] D. Baykara et al., "Fabrication and optimization of 3D printed gelatin methacryloyl microneedle arrays based on vat photopolymerization," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 11, p. 1157541, 2023.
- [258] M. Catarino et al., "Mechanisms of degradation of collagen or gelatin materials (hemostatic sponges) in oral surgery: a systematic review," *Surgeries*, vol. 5, no. 3, pp. 532-548, 2024.
- [259] X. Pu et al., "Bioinspired hydrogel anchoring 3DP GelMA/HAp scaffolds accelerates bone reconstruction," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 14, no. 18, pp. 20591-20602, 2022.
- [260] M. V. Natu, H. C. de Sousa, and M. Gil, "Influence of polymer processing technique on long term degradation of poly (ϵ -caprolactone) constructs," *Polymer degradation and stability*, vol. 98, no. 1, pp. 44-51, 2013.
- [261] J. R. Dias, A. Sousa, A. Augusto, P. J. Bártolo, and P. L. Granja, "Electrospun polycaprolactone (PCL) degradation: An in vitro and in vivo study," *Polymers*, vol. 14, no. 16, p. 3397, 2022.
- [262] S. Dan, M. Kalantari, A. Kamyabi, and M. Soltani, "Synthesis of chitosan-g-itaconic acid hydrogel as an antibacterial drug carrier: optimization through RSM-CCD," *Polymer Bulletin*, pp. 1-24, 2021.
- [263] M. Vigata, C. D. O'connell, S. Cometta, D. W. Hutmacher, C. Meinert, and N. Bock, "Gelatin methacryloyl hydrogels for the localized delivery of cefazolin," *Polymers*, vol. 13, no. 22, p. 3960, 2021.

- [264] I. A. Khalil et al., "Ciprofloxacin-loaded bioadhesive hydrogels for ocular applications," *Biomaterials science*, vol. 8, no. 18, pp. 5196-5209, 2020.
- [265] J. S. Ribeiro et al., "Hybrid antimicrobial hydrogel as injectable therapeutics for oral infection ablation," *Biomacromolecules*, vol. 21, no. 9, pp. 3945-3956, 2020.
- [266] Y. Hu et al., "Dual-crosslinked amorphous polysaccharide hydrogels based on chitosan/alginate for wound healing applications," *Macromolecular rapid communications*, vol. 39, no. 20, p. 1800069, 2018.
- [267] R. Ding et al., "Epidermal growth factor-loaded microspheres/hydrogel composite for instant hemostasis and liver regeneration," *Smart Materials in Medicine*, vol. 4, pp. 173-182, 2023.
- [268] J. M. Hackett, T. T. Dang, E. C. Tsai, and X. Cao, "Electrospun biocomposite polycaprolactone/collagen tubes as scaffolds for neural stem cell differentiation," *Materials*, vol. 3, no. 6, pp. 3714-3728, 2010.
- [269] E. Kalvand, H. Bakhshandeh, S. Nadri, M. Habibizadeh, and K. Rostamizadeh, "Poly- ϵ -caprolactone (PCL)/poly-L-lactic acid (PLLA) nanofibers loaded by nanoparticles-containing TGF- β 1 with linearly arranged transforming structure as a scaffold in cartilage tissue engineering," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 111, no. 12, pp. 1838-1849, 2023.
- [270] Y. Fu and W. J. Kao, "Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems," *Expert opinion on drug delivery*, vol. 7, no. 4, pp. 429-444, 2010.
- [271] L. Masaro and X. Zhu, "Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids," *Progress in polymer science*, vol. 24, no. 5, pp. 731-775, 1999.
- [272] R. Augustine et al., "Growth factor loaded in situ photocrosslinkable poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/gelatin methacryloyl hybrid patch for diabetic wound healing," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 118, p. 111519, 2021.
- [273] Z. Xiao et al., "Zwitterionic hydrogel for sustained release of growth factors to enhance wound healing," *Biomaterials Science*, vol. 9, no. 3, pp. 882-891, 2021.
- [274] F. Sisto et al., "Human mesenchymal stromal cells can uptake and release ciprofloxacin, acquiring in vitro anti-bacterial activity," *Cytotherapy*, vol. 16, no. 2, pp. 181-190, 2014.
- [275] K. S. Rho et al., "Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing," *Biomaterials*, vol. 27, no. 8, pp. 1452-1461, 2006.
- [276] B. Yang et al., "Enhanced mechanosensing of cells in synthetic 3D matrix with controlled biophysical dynamics," *Nature communications*, vol. 12, no. 1, p. 3514, 2021.

- [277] M. Meghdadi, M. Pezeshki-Modaress, S. Irani, S. M. Atyabi, and M. Zandi, "Chondroitin sulfate immobilized PCL nanofibers enhance chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 136, pp. 616-624, 2019.
- [278] K. Yoneno et al., "Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in three-dimensional collagen gel cultures," *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*, vol. 75, no. 3, pp. 733-741, 2005.



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Yılmaz, H., Gursoy S., Torkay, G., Bal Ozturk, A., Gunduz O., Ustundag C.B., "Three-Dimensional Printed Bilayer Scaffolds for Use in Deep Cartilage Injuries" 8th International Congress on 3D Printing (Additive Manufacturing) Technologies and Digital Industry 2024, 06-08 Sep 2024. Sözlü Sunum
2. Yılmaz, H., Bedir, T., Gursoy, S., Kaya, E., Tinaz, G. B., ... & Ustundag, "Ciprofloxacin Loaded GelMA Scaffold as a Therapeutic for Joint Infections." Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering-Nanobiomat 2023, 28-30 Jun 2023. Sözlü Sunum

Makaleler

1. H. Yılmaz, I. F. Abdulazez, S. Gursoy, Y. Kazancioglu, and C. B. Ustundag, "Cartilage Tissue Engineering in Multilayer Tissue Regeneration," Annals of Biomedical Engineering, pp. 1-34, 2024.
2. H. Yılmaz et al., "Comparative studies of GelMA hydrogels: investigating the effect of different source on mechanical, physical and biological properties," Materials Research Express, 2024.
3. H. Yılmaz et al., "Development of bilayer tissue-engineered scaffolds: combination of 3D printing and electrospinning methodologies," Biomedical Materials, 2024.

Patentler

1. Yılmaz, H., Bedir, T., Üstündağ, C.B., Gündüz, O., Farklı Doku Tiplerine Sahip Çift Katmanlı Patolojiler için Biyomimetik-Biyofonksiyonel Doku İskelesi Üretim Yöntemi, Başvuru No: 2022/019766.

Projeler

1. Yıldız Teknik Üniversitesi ADEP, Proje No: TSA-2022-5244, Biyomimetik-Biyofonksiyonel Nazal Kıkırdak Doku İskelesi Tasarımı ve Üretimi, 2022, Araştırmacı

Ödüller

1. TÜBİTAK BİDEP 2211-A Genel Doktora Bursu, 2020-2024
2. YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar, Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomedikal Teknoloji ve Ekipmanlar (Tasarım-Üretim ve Tedarik) alanında Doktora Bursu, 2020-2024