



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



3 BOYUTLU BİYO BASKI YÖNTEMİ İLE HİDROJEL KATKILI DOKU İSKELETİ ÜRETİMİ

MEHMET ONUR AYDOĞDU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Serdar SALMAN

İSTANBUL, 2018



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



3 BOYUTLU BİYO BASKI YÖNTEMİ İLE HİDROJEL KATKILI DOKU İSKELETİ ÜRETİMİ

MEHMET ONUR AYDOĞDU

(533316002)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Serdar SALMAN

İSTANBUL, 2018

MARMARA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Mehmet Onur AYDOĞDU'nun “3 Boyutlu Biyo Baskı Yöntemi ile Hidrojel Katkılı Doku İskeleti Üretimi” başlıklı tez çalışması, 01/11/2018 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ (Danışman)

Marmara Üniversitesi

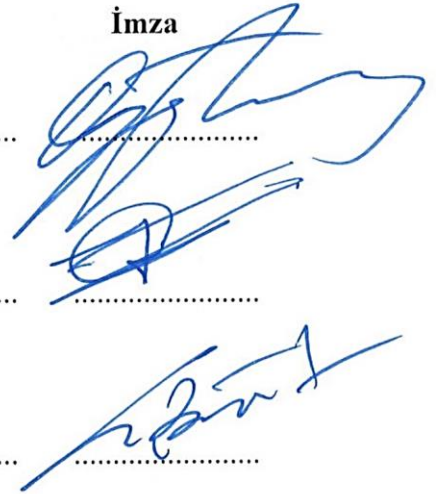
Prof. Dr. Faik Nüzhet OKTAR (Üye)

Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ (Üye)

Yıldız Teknik Üniversitesi

İmza



ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07.11.2018 tarih ve 2018/27.75 sayılı kararı ile Mehmet Onur AYDOĞDU'nun Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ



ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanması süresince göstermiş olduğu her türlü akademik ve manevi destek yanı sıra yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi birikimi ve deneyimleri ile beni her adımda daha başarılı olmaya yönlendiren çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ'e teşekkür ederim. Metalurji ve Malzeme Mühendisliği ile tanışıp ardından bu alanda bir kariyer planlaması yapacak kadar çok sevmeme vesile olan, zor zamanlarda üretmiş olduğu yapıcı çözümler ile bu güne gelebilmemde vermiş olduğu tüm emekler için Sayın Prof. Dr. Serdar SALMAN'a tezimin ikinci danışmanlığını üstlendiği için içten teşekkürlerimi borç bilirim. Konu öğrencilerine yardım edebilmek olduğunda, elinden gelen hiçbir yardımı esirgemeyen hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazmi EKREN'e teşekkür ederim. Bilgi birikimi ve renkli kişiliğiyle araştırma grubumuzun kıymetli bir üyesi olan Prof. Dr. Faik Nüzhet OKTAR'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hücre testi analizlerindeki yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Serap Erdem KURUCA'ya ve antimikrobiyal test analizlerindeki yardımlarından dolayı Sayın Dr. Esra YUCA'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince yanımda olarak bana destek veren, ihtiyacım olan her anda yardımlarını esirgemeyen, sevgili Esra ALTUN'a bana verdiği destek için teşekkür ederim.

Her koşulda yanımda bulunup en büyük destekçilerim olan annem Arzu AYDOĞDU, babam Mehmet Oğuz AYDOĞDU ve kardeşim Ayça AYDOĞDU'ya göstermiş oldukları maddi ve manevi destekleri için teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans çalışmasından çıkan yayınlar ve konferans bildirileri aşağıdaki gibidir:

1. Aydogdu, M.O. ve ark. (2018) 3D Liquid Bioprinting of the PCL / β -TCP Scaffolds. Materials Science Forum, 923, 79-83.
2. Aydogdu M.O. ve ark. (2017) Sözlü Sunum. 3D Liquid Bioprinting of the PCL / β -TCP Scaffolds. 2nd International Conference on Frontiers of Composite Materials Melbourne, Avustralya.
3. Aydogdu M.O. ve ark. (2018) Sözlü Sunum. Polycaprolactone/ Beta Tricalcium Phosphate / Collagen as a 3D Printed Tissue Scaffold. 4th International Society for Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials (ISBPPB 2018), Krakov, Polonya.
4. Aydogdu M.O. ve ark., Developments of 3D polycaprolactone/ beta tricalcium phosphate /collagen scaffolds for hard tissue engineering J. of the Aus. Ceramic Society (Dergiye Gönderildi)
5. Aydogdu M.O ve ark., 3D Bioprinted PLA/ β -TCP scaffolds with hydrogel addition, Macromolecular Materials and Engineering (Dergiye Gönderildi)

Ekim 2018

Mehmet Onur AYDOĞDU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER	vi
KISATLIMALAR	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Doku Mühendisliği Kavramı ve Tarihçesi	1
1.2. Doku İskeletleri	2
1.3. Bir Doku İskeleti Üretim Metodu Olarak 3B Biyo Baskı Yöntemleri	3
1.4. Çözelti Halindeki Kompozit Malzemelerin Ekstrüzyon Temelli 3B Biyo Baskı Yöntemi ile Üretilmesi	4
1.5. Biyo Baskı için Kullanılabilecek Biyouyumlu Malzeme Seçimi	5
1.6. Biyopolimerler	5
1.6.1. Polilaktik asit (PLA)	6
1.7. Beta Trikalsiyum Fosfat (β -TCP)	7
1.8. Hidrojeller	7
1.8.1. Tip 1 kolajen (Col)	8
1.8.2. Halomonas levan (HLh)	8
1.8.3. Sodyum aljinat (SAlg)	9
1.8.4. Kitosan (Ch)	9
1.8.5. Amoksisilin (AMX)	10
2. MATERYAL VE YÖNTEM	11
2.1. Malzemeler	11
2.1.1. Biyopolimer	11
2.1.2. Beta Tirkalsiyum Fosfat (β -TCP)	11
2.1.3. Farklı hidrojel yapıları	11
2.1.4. Çözücü malzemeler	12
2.1.5. Antibakteriyel malzemeler	12
2.1.6. Hücre testlerinde kullanılan malzemeler	12
2.2. Kullanılan Cihazlar	13
2.3. Çözelti Hazırlanması	14
2.4. Doku İskeletlerinin 3B Biyo Baskı Yöntemi ile Üretimi	15

2.5. Karakterizasyon	18
2.5.1. Kullanılan çözeltilerin karakterizasyonu	18
2.5.2. Doku iskeletlerinin morfolojik yapısının karakterizasyonu	19
2.5.3. Doku iskeletlerinin mekanik özellikleri	20
2.5.4. Doku iskeletlerinin biyolojik bozunum özellikleri	20
2.5.5. Doku iskeletlerinin kimyasal yapısı	21
2.5.6. Doku iskeletlerinin termal özellikleri	22
2.5.7. Doku iskeletlerinin antibakteriyel özellikleri	23
2.5.8. Doku iskeletlerinin hücre kültürleri	23
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
3.1. Hazırlanan Çözelti Özellikleri	25
3.2. Doku İskeletlerinin Geometrisi ve Morfolojik Özellikleri	26
3.3. Doku İskeletlerinin Biyobozunum Özellikleri	29
3.4. Doku İskeletlerinin Kimyasal Yapısı	31
3.5. Doku İskeletlerinin Termal Davranışları	33
3.6. Doku İskeletlerinin Mekanik Özellikleri	34
3.7. Doku İskeletlerinin Antibakteriyel Özellikleri	35
3.8. Doku İskeletlerinin Hücre Kùltürleri	37
4. SONUÇLAR	41
KAYNAKLAR	42

ÖZET

3 BOYUTLU BİYO BASKI YÖNTEMİ İLE HİDROJEL KATKILI DOKU İSKELETİ ÜRETİMİ

Doku mühendisliği için tasarlanan 3 boyutlu doku iskeletlerinin, uygun bir ortam sağlamak suretiyle doğal dokuların kendi kendini onarma mekanizması olarak adlandırılan fizyolojik olaylar bütününe desteklemek amacıyla hücre tutunumu kolaylaştırıcı bir faktör olarak kullanılabilmesi fikrinin umut verici bir kavram olduğuna inanılmaktadır. Bu hipotezi uygulamak amacıyla, polilaktik asit ve beta trikalsiyum fosfat ile oluşturulan doku iskeletleri üretilmiş, fakat bununla sınırlı kalınmayarak bu iki polimerik ve seramik fazın bir araya gelmiş kompozit yapıdaki haline farklı hidrojeller ile katkı yapılarak doku iskeletleri tipleri çeşitlendirilmiştir. Dört farklı hidrojel tipi varlığında 3 boyutlu biyo baskı tekniği ve katman üzerine eklemeli yazım yöntemi kullanılarak 3 boyutlu doku iskeletlerinin üretimi sağlanmıştır. Üretim işlemleri ardından doku iskeletlerinin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiş, mekanik özellikleri ise basma testleri yardımı ile ortaya çıkarılmıştır. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile doku iskeletlerini oluşturan malzemeler arasındaki bağ etkileşimleri incelenmiştir. Diferansiyel taramalı kalorimetre yardımı ile belirli sıcaklık değerleri arasındaki termal davranışları ortaya çıkarılan doku iskeletlerinin aynı zamanda antimikrobiyal özellikleri de agar difüzyon testi ile ortaya konulmuştur. Son olarak da hücresel etkileşimlerin incelenmesi adına *in vitro* hücresel canlılık testleri ortaya konmuştur. Üretilen tüm doku iskeletleri arasında, kitosan içeren örnekler, diğer örneklerle kıyasla morfoloji, biyobozunum ve hücre canlılığı gibi özellikler açısından üstün gelmiş ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere oldukça yararlı özellikler ortaya koymuştur. Tüm bunlara ek olarak, kitosan içeren örneklerin vermiş olduğu başarılı sonuçlar neticesinde, bu doku iskeletlerinin yapısına amoksisilin katkısı yapılarak bu geniş spektrumlu bakterisit aktivitesi olan antibiyotiğin doku iskeletleri üzerindeki olumlu ve olumsuz etkileri detaylı olarak incelenmiştir.

ABSTRACT

PRODUCTION OF TISSUE HYDROGEL ADDED SCAFFOLDS WITH 3D BIOPRINTING METHOD

3D Bioprinted scaffolds that is designed for tissue engineering are believed to be a promising concept in order to assist cell adhesion by providing a compatible environment and ultimately supporting the natural phenomenon called self-repair mechanism of native tissues. In order to practice this hypothesis, scaffolds consisted by polylactic acid and β -tricalcium phosphate were incorporated independently with different hydrogels and manufactured using 3D bioprinting method in order to display a comprehensive analysis between four different hydrogels and their effects on the chemical, morphological, thermal, antibacterial and cellular behaviour of the scaffolds. In order to reveal the morphological features of the scaffolds, scanning electron microscopy was used. On the other hand, compressive strength test was used to obtain mechanical properties. Chemical interactions and bonds between the materials used was revealed using fourier transform infrared spectroscopy and thermal behaviour of the scaffolds was analysed by differential scanning calorimetry. Agar diffusion test and *in vitro* cellular behaviour tests were performed in order to reveal characteristic features of the scaffolds such as antibacterial activity and cellular behaviour in terms of cell proliferation and adhesion. Among others, chitosan including samples was demonstrated significantly superior and beneficial features such as highest biocompatibility and structural integrity in terms of morphology, compared to the other samples. Furthermore, chitosan including samples were enhanced with amoxicillin which is an antibiotic with wide spectrum of bactericidal activity, in order to increase antimicrobial activity of the scaffolds without compromising from already observed significant cellular response.

SEMBOLLER

Au	: Altın
CO₂	: Karbondioksit
kV	: Kilo voltaj
mPa	: Mega paskal
rpm	: Dakikadaki devir sayısı



KISALTMALAR

3B	: 3 boyutlu
AMX	: Amoksisilin
Ch	: Kitosan
Col	: Kolajen
DM	: Doku mühendisliği
DMEM	: Dulbecco 'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetre
ECM	: Hücre dışı matriks
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HLh	: Halamonas levan
MTT	: Metiltiyazol difenil tetrazolium
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PLA	: Polilaktik asit
SAIg	: Sodyum aljinat
Saos-2	: İnsan kemik kanser hücresi
β-TCP	: Beta trikalsiyum fosfat
Tg	: Camsı geçiş sıcaklığı
Tm	: Erime sıcaklığı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Doku iskeletleri üretim şeması ve biyo baskı tipleri şematik gösterimi.	4
Şekil 1.2. Polilaktik asit (PLA) kimyasal açılımı.	6
Şekil 2.1. Çözelti hazırlamada kullanılan (a) hassas dijital tartı, (b) manyetik karıştırıcı.	14
Şekil 2.2. Doku iskeletlerinin bilgisayar destekli yazılım tarafından yapılan modellemesinin görüntüsü.	15
Şekil 2.3. Biyo baskı sisteminin dijital kamera fotoğrafları. (a) Biyo baskı cihazı, (b) biyo baskı esnasında doku iskeleti ve kullanılan iğne, (c) 3B biyo baskı yöntemi ve katman üzerine eklemeli üretim metodunun şematik gösterimi.	17
Şekil 2.4. Çözelti karakterizasyon cihazları ve aletleri. (a) Özkütle ölçümü için piknometre, (b) yüzey gerilimi ölçüm cihazı, (c) viskozite ölçümü için viskozimetre.	18
Şekil 2.5. Doku iskeletlerinin görüntülenmesi amacıyla kullanılan taramalı elektron mikroskobu ve (b) kaplama cihazı.	19
Şekil 2.6. Doku iskeletlerinin mekanik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan (a) basma testi makinesi ve (b) kalınlık ölçmek için kullanılan dijital mikrometre.	20
Şekil 2.7. Biyobozunum çalışmalarında kullanılan (a) etüv, (b) hareketli ve ısıtıcılı karıştırıcı.	21
Şekil 2.8. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi cihazı.	22
Şekil 2.9. Termal özelliklerin belirlenmesinde kullanılan diferansiyel tarama kalorimetre cihazı.	22
Şekil 3.1. Farklı hidrojel içerikleri ile PLA / β -TCP tabanlı 3B doku iskeletleri'nin elektron mikroskobu görüntüleri. (a) Hidrojel olmaksızın, (b, c, d, e) sırasıyla Col, HLh, SAlg, Ch hidrojelleri, (e) Ch ve AMX ekli doku iskeletleri.	27
Şekil 3.2. Doku iskeletlerinin gözenek büyüklüğü dağılım aralığı ve frekansları. (a) Hidrojel olmaksızın PLA / β -TCP (b) Col, (c) HLh, (d) SAlg, (e) Ch, (f) Ch / AMX.	28
Şekil 3.3. Üretilen doku iskeletlerinin 35 gün boyunca göstermiş olduğu biyobozunum davranışı grafiği.	30

Şekil 3.4. Doku iskeletlerinin FTIR spektrumları.	32
Şekil 3.5. Doku iskeletlerinin camsı geçiş ve erime sıcaklıkları hakkında bilgi vermekle beraber termal davranışlarını ortaya koyan DSC termogramları.	33
Şekil 3.6. Doku iskeletlerinin agar difüzyon testi sonrası (a) <i>Escherichia coli</i> ve (b) <i>Staphylococcus aureus</i> ' a karşı göstermiş oldukları inhibisyon alanları.	36
Şekil 3.7. Doku iskeletlerinin hücre canlılığı testi (a) 24 saat, (b) 48 saat ve (c) 72 saat sonuçları.	37
Şekil 3.8. Farklı hidrojel içeriğine sahip PLA / β -TCP doku iskeleti numunelerinin 24,48 ve 72 saatlik hücre testleri ardından taramalı elektron mikroskobu görüntülerinin (a) hidrojel olmaksızın (b) Col, (c) HLh, (d) SAlg, (e) Ch, (f) Ch / AMX inkübasyon süresinden sonra 24, 48 ve 72 saat.	39

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Biyo baskı öncesi hazırlanan tüm örneklerin konsantrasyon içerikleri ve farklı hidrojel yapıları.	15
Tablo 3.1. Biyo baskı öncesi ölçülen çözelti parametreleri.	25
Tablo 3.2. Doku iskeleti örneklerinin mekanik test sonuçları.	35



1. GİRİŞ

Oldukça karmaşık olmasına rağmen, eşsiz ve kusursuz ahenge sahip bir sistemler bütünü olan insan vücudunda doku seviyesinde görülen hasar görmüş veya hastalık sebebiyle zarara uğramış dokuların sebep olduğu fizyolojik yetersizlikler, dokuların bir araya gelerek organları oluşturması gerçeğine paralel olarak organ yetmezliği gibi çok ciddi sorunların oluşmasına sebebiyet verebilmektedir. Bireyin hayatı boyunca karşısına çıkan çeşitli travmalar, hastalık gibi olumsuz etkenler ve kaçınılmaz olan yaşlanma sonucu ortaya çıkan bu hasarlı ve hastalıklı dokular, dünya çapında gözlenen nüfus artışı ve artan ortalama yaşam ömrüne bağlı olarak yaşlı nüfus oranının artması sebebiyle yaşam kalitesini büyük ölçüde etkileyebilmekte ve bu sebepten karşımıza çözülmesi gereken bir konu olarak çıkmaktadır.

Hasta veya zarar görmüş dokuların sebep olduğu fizyolojik yetersizliklerin giderilmesini amaçlayan doku mühendisliği (DM), organ yetersizliği ve organ nakli ihtiyaçları arasındaki boşluğu doldurması umuduyla, gerek yapay dokuların üretilmesi gerek ise orijinal dokuların kendi kendine iyileşmesini destekleyen etmenler ile iyileşme sürecini hızlandırabilmesi sebebiyle umut verici bir araştırma alanı olmuştur. Bu alanda yapılan çalışmalar ile bireylerin yaşam kalitesinin artırılması ve medikal harcamaların ülke ekonomisine olan yükünün azaltılması ile tedavilerin daha düşük maliyetli olabilmesi amaçlanmaktadır.

1.1. Doku Mühendisliği Kavramı ve Tarihçesi

Günümüzde DM çalışmaları oldukça ilerlemiş olmakla beraber doku ve organ nakli zarar görmüş yapıların onarılmasında en popüler yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) bünyesinde yapılan araştırmalar göstermektedir ki, 2015 yılında ABD'de organ nakli için bekleyen ortalama kişi sayısı, bağışlanan organ sayısından yaklaşık dört kat daha fazla olmakla beraber bağış sayısının ise sekiz katından fazladır (Girlanda 2016). Bu bağlamda organ nakli hayat kurtarma konusunda bir devrim olarak nitelendirilebilse de, donör sayısının az olması ve uyumsuzluk gibi sorunların baş gösterebilmesi gibi çeşitli kısıtlamalar sebebiyle DM çalışmaları arasında, vücudun kendi kendini iyileştirmesine yardımcı olabilecek yapıların üretimi ve bu yapıların hasarlı bölgeye uygulanması gibi konular önem kazanmıştır.

Modern DM çalışmalarının atası olarak değerlendirilebilecek öncü çalışmalar 1970’li yıllarda ortaya çıkmış olup, Dr. W. T. Green ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada kemik spikülleri üzerinde ekilen kondrosit hücreleri ile kıkırdak doku üretilmeye çalışılmıştır (Green ve ark., 1970). Çalışmanın sonucunda başarısız olunmasına rağmen, yeni biyouyumlu malzemelerin ortaya çıkmasıyla, uygun şekilde yapılandırılmış doku iskeletleri üzerinde canlı hücrelerin oluşturulması ile yeni dokuların üretilebileceği sonucuna varılmıştır. 90’lı yıllara gelindiğinde ise DM kavramı 1993 yılında Langer ve Vacciante tarafından mühendislik ve yaşam bilimlerinin prensiplerini bir araya getiren, dokuya fonksiyonlarını geri kazandıran, onu koruyan veya geliştiren biyolojik ikamelerin gelişimine uygulayan disiplinler arası bir araştırma alanı olarak tanımlanmıştır (Langer ve ark., 1993). Yıllar içinde çalışmalar çeşitlenmiş; insan derisi (Böttcher-Haberzeth ve ark., 2010), kemik (Holzwarth ve ark., 2011) ve kıkırdak (Chen ve ark., 2013) dokuları üretilmiştir. Bu dokuların *in vitro* veya *in vivo* koşullarda üretilmesi veya üretim sürecinin hızlandırılabilmesi adına doku iskeletleri üretimi kavramı ön plana çıkmıştır.

1.2. Doku İskeletleri

DM alanında çok önemli bir yere sahip olan doku iskeleti üretimindeki temel amaç yüzey alanı oranı artırılmış gözenekli morfolojik yapıların üretilmesi ve bu üretim yapılırken biyouyumlu malzemelerin kullanılmasına dayanmaktır. Böylece doğal hücre dışı matriksin (ECM) taklit edilebilmesi ve hücre tutunumu için gerekli olan ortamın sağlanması mümkün olabilmektedir (Wu ve ark., 2014; Karageorgiou ve ark., 2005). Aynı zamanda doku iskeletlerinin görevlerini tamamlayıp yeni doku oluşumuna ortam hazırladıktan sonra kendi kendilerine ortadan kaybolmaları da uygulamanın başarısı açısından çok önemlidir. Bu yüzden ideal doku iskeletleri biyobozunum özelliğine sahip olmalıdır (Chan ve ark., 2008). Ek olarak doku iskeletlerinin kullanılmalarının amaçlandığı ortamın mekanik özelliklerine uygun olacak şekilde üretilmeleri gerekmektedir.

Tüm bu gereklilikler ele alındığında ortaya çıkmaktadır ki, doku iskeletleri üretilirken kullanılacak olan üretim yöntemi özenle seçilmelidir. DM çalışmalarında kullanılmak üzere doku iskeleti üretimi için çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma (Intranuovo ve ark. 2013), gaz köpüklendirme (Costantini ve ark., 2018), dondurarak kurutma (Nazarov ve

ark., 2004) ve elektro  irme (Aydogdu ve ark., 2018a) gibi çeşitli geleneksel yöntemler ortaya konulmuştur. Fakat her bir yöntem sahip olduğu dezavantajlar sebebiyle 3 boyutlu (3B) doku iskeleti üretiminde hedeflenen amaçlara ulaşılmasını tam olarak sağlayamamıştır. Bu da bilim dünyasını yeni bir üretim yöntemi arayışına sürüklemiştir ve en sonunda ortaya 3B biyo baskı yöntemleri çıkmıştır.

1.3. Bir Doku İskeleti   retim Metodu Olarak 3B Biyo Baskı Yöntemleri

Doku iskeletlerinin üretilmesi için birçok geleneksel yöntem ortaya konulmuş ve hatta bu uygulamaların klinik alanda başarı sağlayabilmiş olmasına rağmen (Atala ve ark., 2000) karmaşık doku iskeletlerini inşa etmenin zor olması ve üretilen doku iskeletlerinin mikro yapısını kontrol etmenin yetersiz kalması sebebiyle geleneksel metotların yetersiz kalması gibi bir durum ortaya çıkmıştır (Murphy ve ark., 2014). Bu noktada ortaya çıkan biyo baskı yöntemi ile bu problemlerin ortadan kaldırılması sağlanmış, 3B olarak yapılan bilgisayar destekli çizimlerin gerçek hayata 3B doku iskeletleri olarak aktarılabilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu yöntem, doku iskeletinin yapısının kontrol edilebilmesi konusunda kendinden önceki yöntemlere göre çok etkin bir üstünlük sağlamıştır (Groll ve ark., 2016; Peltola ve ark., 2008).

Biyo baskı yöntemi de kendi içinde üç temel yöntem ile kategorize edilebilir. Bunlardan ilki 2000’li yıllarda literatüre kazandırılmış olan mürekkep püskürtmeli biyo baskı yöntemidir. Bu yöntemde mürekkep olarak hücreler veya biyomalzemeler kullanılabilir ve gelecekte organların biyo baskı yöntemi ile üretilmesine olanak sağlayacağına inanılmaktadır (Boland ve ark., 2006; Cui ve ark., 2012; Hon ve ark., 2008). Fakat bu yöntem biyo baskı süresince üretilcek olan mürekkep damla boyutlarının kullanılan iğnenin i   çapı ile sınırlandırılması ve biyoyazım sırasında mürekkep damlasının uğrayabileceği morfolojik deformasyon sebebi ile uygulama alanları sınırlanmış bir durumdadır (Tasoglu ve ark., 2013).

Diğer bir kategori ise lazer destekli biyo baskı yöntemidir. Bu yöntem, biyomedikal mühendislik ve DM alanına diğer yöntemlere göre daha yeni olduğundan yüksek çözünürlük ve yüksek kontrol gücü gibi önemli artı yönleri sebebiyle büyük ilgi uyandırmıştır. Örneğin, Guillotin ve arkadaşlarının ortaya koymuş olduğu minyatür dokuların lazer destekli biyo baskı yöntemi ile üretilmesi gibi bu alanda oldukça başarılı çalışmalar ortaya konulsa da bir lazer ışını yardımı ile yapılan biyo baskı yönteminde

dezavantaj baskı işleminin oldukça yavaş gerçekleşmesidir (Guillotin ve ark., 2010). Bir diğer karakteristik yöntem ise filamentlerin ekstrüzyonuna bağlı olarak gerçekleşen, ekstrüzyon temelli biyo baskı yöntemidir. Bu ekstrüzyon kaynağının çalışma prensibi mekanik veya pnömatik olabilir. En büyük avantajı, yüksek viskoziteli malzemelerin işleme konulabilmesidir fakat bununla birlikte; düşük çözünürlük ve yüksek damlacık hacmine sahip olmak gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemde sıcaklık yardımı ile malzemelerin akışkan hale getirilmesi ile biyo baskı işleminin gerçekleştirilmesi de mümkündür. Doku iskeletleri üretim şeması ve biyo baskı tipleri **Şekil 1.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Doku iskeletleri üretim şeması ve biyo baskı tipleri şematik gösterimi.

1.4. Çözelti Halindeki Kompozit Malzemelerin Ekstrüzyon Temelli 3B Biyo Baskı Yöntemi ile Üretilmesi

Ekstrüzyon temelli biyo baskı yöntemi sadece katı malzemelerin kullanımı ile sınırlı kalmayıp yanında sıvı haldeki malzemelerin üretilmesi amacıyla bir akışkan dağıtım sistemi ve otomatik üç eksenli hareket eden bir sistemin birleşmesi olarak da özetlenebilir (Mironov ve ark., 2003). Yöntem dahilinde, malzeme bir çözücü yardımı ile sıvı hale getirebilir. Ya da farklı malzemeler ortak bir çözücü kullanılarak sıvı hale getirilip sisteme dahil edilebilirler. Bu da saf malzemelerin biyo baskı başarısı için çok önemli parametreler olan camsı geçiş sıcaklığı ve erime sıcaklığı gibi kavramların her malzemede farklı sıcaklık değerlerinde olması sebebiyle birkaç malzemenin bir arada kullanılması durumunda ortaya çıkacak olan uyumsuzluklara çözüm getirmesi açısından çok önemli bir adımdır. Bu bağlamda kompozit malzemelerin biyo baskı yöntemi ile üretilmesi mümkün hale gelmiştir (Aydogdu ve ark. 2018b).

1.5. Biyo Baskı İçin Kullanılabilecek Biyouyumlu Malzeme Seçimi

Biyouyumluluk kavramı, 1987 yılında Williams tarafından malzemenin bulunduğu ortam tarafından uygun bir tepki ile karşılanması olarak tanımlanmıştır (Williams, 1987). Bir diğer şekilde özetlemek gerekirse de efektif bir biyouyumluluktan bahsedilebilmesi için üretilen doku iskeletleri konak dokuyla bir araya getirildiğinde dokuda anormal bir tepki, iltihaplanma veya bağışıklık sistemi reaksiyonları gelişmemeli; doku iskeletleri, dokunun normal fizyolojik yetenekleri dahilinde gözlenen iyileşme sürecini hızlandıracak bir şablon olarak görev almalıdır (Karageorgiou ve ark., 2005). Bu bağlamda, DM alanında yapılan çalışmalarda, biyo baskı yöntemi ile doku iskeletleri üretilirken malzemelerin biyouyumlu olan biyomalzemelerden seçilmesinin sağlayacağı yararlar ve bu durumun çok önemli bir gereklilik olduğu herkes tarafından takdir edilecek bir yargıdır. Biyomalzemeler ise metaller, seramikler, sentetik ve doğal polimerler, hidrojeller ve bunların çeşitli oranlarda bir araya getirilmiş kombinasyonları olarak kategorize edilebilirler (Dee ve ark., 2002; Guillotin ve ark., 2010). İyi bir doku iskeleti çevresi ile uyum içerisinde olmanın yanı sıra ECM'ye de katkıda bulunmalıdır, bu yüzden hedef dokuya göre malzeme seçimi çok önemlidir (Ozak ve ark., 2013).

1.6. Biyopolimerler

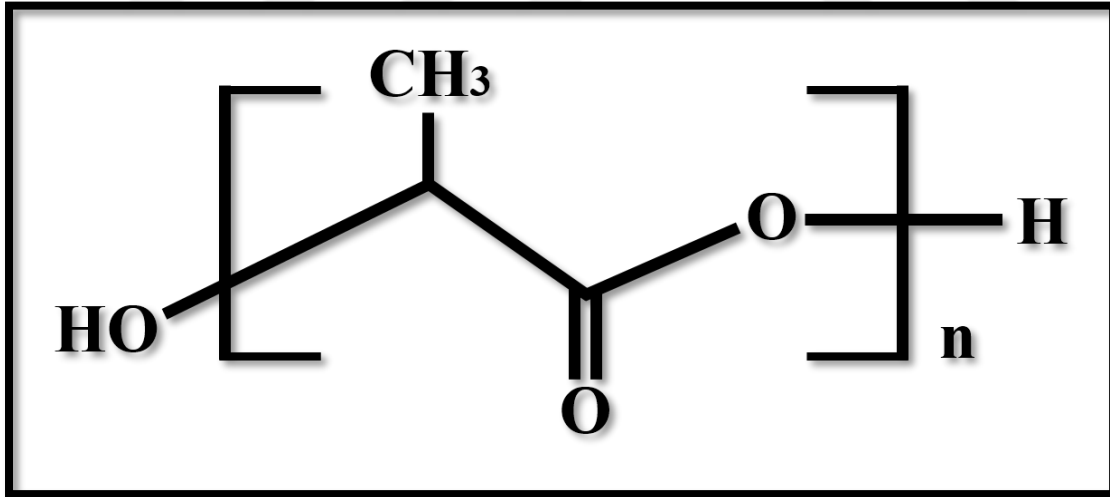
Biyobozunum, biyouyumluluk ve antimikrobiyal aktiviteye ket vurulması gibi bir çok önemli özelliği olan biyopolimerler, nişasta, şeker ve selüloz gibi doğal hammaddelerden ve fosil yakıtlardan üretilirler (Pattanashetti ve ark., 2017). Hem sentetik hem de doğal biyopolimerler deri, kıkırdak, kemik ve yapay damar gibi çeşitli dokular için doku iskeleti üretimi amacıyla kullanılmışlardır (Sittinger ve ark., 1994; Porter ve ark., 2009; Nolte ve ark., 2008; Aydoğdu ve ark., 2018a). Biyopolimerler aynı zamanda bu önemli özellikleri sebebiyle 3B biyo baskı çalışmalarında sıkça yer bulmaktadırlar. Örnek vermek gerekirse Aydoğdu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Polikaprolakton (PCL) polimerini kalsiyum tuzları ile beraber kullanarak doku iskeletleri üretimi sağlamışlardır (Aydoğdu ve ark., 2018b). An ve arkadaşları ise yapmış oldukları derleme çalışmasında Polivinil alkol (PVA), Polilaktik asit (PLA) ve çeşitli biyopolimerlerin 3B baskı sonuçlarını raporlayarak umut verici sonuçlar ortaya koymuşlardır (An ve ark., 2015).

1.6.1. Polilaktik asit (PLA)

Polilaktik asit (Şekil 1.2) yüksek biyouyumluluk ve biyobozunum özelliklerine sahip bir laktik asit polimeridir ve PLA ürünlerinin toksik etkiye sahip olmadıkları kanıtlanmıştır (Rasal ve ark., 2009). Tüm bu olumlu özellikler onun DM çalışmalarında kullanılmaya uygun bir aday olduğunu göstermiştir.

PLA aynı zamanda kemik doku çalışmalarında hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda kemik onarımını destekleyen gözenekli doku iskeletleri üretebilmesi ile başarısını ortaya koymuş bir biyopolimerdir (Li ve ark., 2011b). Fakat PLA, tüm bu iyi özellikleri yanında nispeten düşük mekanik özellikleri sebebiyle, eğer yanında bu özelliği tamamlayıcı bir malzeme ile beraber kullanılır ise, doku iskeleti üretimi için çok daha güçlü ve güvenilir bir malzeme olarak karşımıza çıkmaktadır (Suganuma ve ark., 2001). Bu özellikleri sebebiyle de PLA, 3B doku iskeletleri üretiminde umut vaat edici bir biyopolimer olarak karşımıza çıkmaktadır.

Tüm bu sebeplerden ötürü PLA bu çalışma dâhilinde doku iskeletleri üretiminde kullanılmak için seçilmiştir.



Şekil 1.2. Polilaktik asit (PLA) kimyasal açılımı.

1.7. Beta Trikalsiyum Fosfat (β -TCP)

Kalsiyum fosfat seramikleri, insan vücudunda kök hücrelerin farklılaşması ile osteoindüksiyon mekanizmasını tetikleme yeteneği ve doku iskeleti oluştururken çevre dokulara olan uyumu ve desteği sebebiyle oldukça önemli bir malzeme çeşididir (Li ve ark., 2011a). Hayvan deneylerinde ve klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmış olan bir kalsiyum fosfat seramiği olarak beta tri-kalsiyum fosfat (Chopra ve ark., 2009; Shim ve ark., 2017) yapısı gereği insan vücudunda bulunan süngerimsi kemik dokusuna olan benzerliği sebebiyle hücre göçü ve kemik doku oluşumunu desteklemeye müsaittir. Bu sebeple DM çalışmalarında kemik dolgu maddeleri ve doku iskeleti üretimi çalışmalarında kalsiyum fosfat seramikleri sıkça kullanılmışlardır (Wagoner Johnson ve ark., 2011).

1.8. Hidrojeller

Doğal ECM'ye olan yapısal benzerlikleri ve bu bağlamda hücrelerin tutunması için uygun bir ortam oluşumunu teşvik etme yetenekleri nedeniyle hücre taşıyıcıları ve iskeletler olarak yaygın bir şekilde kullanılan hidrojeller, DM uygulamalarında sıkça kullanılan popüler bir malzeme çeşidi olarak günümüzde literatürdeki yerlerini almışlardır (Malda ve ark., 2013; Wang ve ark., 2015; Kundu ve ark., 2012). Fakat onların bu kadar popüler olmasında etkili olan başka faktörler de vardır. Bu faktörler, genel olarak hidrojellerin, hücreleri ve biyoaktif faktörleri homojen olarak birleştirebilen yüksek oranda biyouyumlu malzemeler olmaları; oksijen, besin ve metabolizma ürünlerinin difüzyonu için gözenekli bir yapıya sahip olmaları, yapıları sebebiyle dokularda tahriş ve iltihaplanma yapmamaları olarak özetlenebilir (Fedorovich ve ark., 2007).

Tüm bu özellikleri ile DM çalışmaları için uygun bir malzeme olarak karşımıza çıkan hidrojellerin potansiyelini 3B biyo baskı yöntemi ile değerlendirebilmek, fonksiyonel 3B doku iskeletlerinin üretilmesinde heyecan verici yeni bir alandır. Fakat hidrojellerin uygun bir şekilde biyo baskı işlemine yer alabilmeleri için bir takım gereklilikler mevcuttur. Bunlar, hücre tutunmasını desteklemeleri için herhangi bir toksik etki göstermemeleri, belirli bir biyobozunum özelliğine sahip olmaları, mekanik özelliklerinin hedef dokunun sahip olduğu değerlere uygun olması gibi ana başlıklar halinde özetlenebilirler.

1.8.1. Tip 1 kolajen (Col)

Tip 1 Kolajen, hayvan dokularında ECM'nin ana bileşenlerinden biri olmakla beraber, önemli ve popüler bir biyomalzeme olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir diğer şekilde ortaya koymak gerekir ise, Tip 1 Kolajen, kemik, tendon, ligament, deri, kas, diş ve korneada ECM'nin yapısını oluşturan en önemli malzemelerden biridir (Fratzl, 2008). Bu sebeple DM çalışmaları için çok önemli bir biyoyumluluk potansiyeline sahiptir ve doku iskeleti üretimine uygun bir malzeme olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüze kadar Tip 1 Kolajen içeren doku iskeletlerinin gözenek büyüklüğünü kontrol etmek için çeşitli teknikler geliştirilirse de, doğal bir ECM' nin yeniden oluşturulması için gereken mikro ölçekli mimarinin tam 3B üretim kontrolü konusunda başarı sağlanamamıştır. Bu sebeple 3B biyo baskı yöntemlerinin sağladığı kolaylıklar ve Tip 1 Kolajenin yüksek biyoyumluluğu göz önüne alındığında bu malzemenin ve ilgili üretim yönteminin DM çalışmalarında doku iskeleti üretimi için ne kadar uyumlu oldukları bir kez daha dikkat çekmektedir.

1.8.2. Halamonas levan (HLh)

Levan bir β (2 $\rightarrow$ 6) - bağlı fruktan tipi homopolisakkarittir ve birçok mikroorganizma ile bitki tarafından üretilmektedir. Levan hidrojel, suda kolayca çözünür, hücrelere karşı toksik özelliğe sahip değildir. Biyoyumluluğu yüksek bir malzeme olan levan hidrojelleri aynı zamanda güçlü ve yapışkan polisakkarit yapısında sahiptir. Halofilik *Halomonas smyrnensis* AAD6T, ilk levan üreten ekstremofil olmakla beraber ve diğer üreticiler arasında düşük maliyetli üretime olanak tanınması ile popüler olmuştur. HLh antioksidandır ve onun peptid ve protein bazlı ilaç nanoarray, ve levan bazlı ilaç taşıyıcı hidrojel sistemleri çalışmalarda kullanıldığı rapor edilmiştir (Ghasemi-Mobarakeh ve ark., 2008). Levan ayrıca başka malzemeler ile bir araya gelerek kompozit yapıda malzemelerin oluşturulduğu çalışmalarda biyoyumluluğu yükseltmesi sebebiyle de tercih edilmiştir. Örneğin 2014 yılında Bostan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, kitosan ve polietilen oksit ile harmanlanmış olan levan döküm filmlerinin kapsamlı karakterizasyonu ortaya konmuş, levan tarafından geliştirilmiş biyoyumluluk, artan hücre tutunumu ve çoğalması gözlemlenmiştir (Bostan ve ark., 2014). Geleneksel malzeme üretim yöntemlerinden elektroegirme yönteminde yer bulabilmiş olan levan hidrojel (Manandhar ve ark., 2009) gerek yapısı gerek ise yüksek biyoyumluluk

değerleri sayesinde 3B biyo baskı metodunda kullanılmak için de çok büyük bir potansiyele sahiptir.

1.8.3. Sodyum aljinat (SAlg)

Sodyum aljinatlar, doğada bulunan ve kahverengi alglerden izole edilen doğal bir polimerdir (Augst ve ark., 2006). Düşük toksisitesi, nispeten düşük maliyeti nedeniyle birçok biyomedikal uygulama için kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve kullanılmıştır (Gombotz ve ark., 1988). Hidrofilik özelliğe sahip olan aljinat, yüksek biyouyumluluğu sayesinde özellikle topikal yaraların tedavisi için biyomedikal ve farmasötik endüstrilerce iyi bilinen bir malzemedir (Rowe ve ark., 2009).

Sodyum Aljinatlar ayrıca hücre büyümesini destekler ve yüksek biyouyumluluk sergilerler (Kulseng ve ark., 1999). Tüm bu özellikleri sayesinde, 3B doku iskeletleri oluşturmak için üretilecek olan bir kompozit malzeme kompozisyonunda yer alma potansiyeli oldukça yüksektir ve biyo baskı çalışmalarında da kendine yer bulmuştur (Leone ve ark., 2008).

1.8.4. Kitosan (Ch)

Kitosan, üretim tarihçesi 19. yüzyıla kadar uzanan, oldukça popüler ve kullanımı yaygın, bir lineer polisakkarittir. Yengeç ve karides kabuklarında bol miktarda bulunur (Hollinger, 2011). Kitosan, sinir rejenerasyonu, membran bariyerleri ve kan koagülasyon inhibitörleri gibi uygulamalar ile DM konusunda geniş bir kullanım alanına sahiptir (Williams, 1987). Örneğin, Wu ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada, kitosan hidrojelinin hücre büyümesini desteklediği ortaya konmuştur ve bu onun biyouyumlu olduğunun göstergesidir (Wu ve ark., 2017). Aynı zamanda antimikrobiyal özellikleri ile popüler olan kitosan kendine literatürde önemli bir yer edinmeyi başarıp pek çok çalışmada karşımıza çıkmaktadır. Kitosan'ın, toksik özellikte olmaması, çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanabilmesi ve vücut içerisinde, tamamen zararsız ürünlere (amino şekeri) parçalanmasından ötürü herhangi bir yan etkisi de bulunmamaktadır (Berger ve ark., 2004). Tüm bu özellikleri sebebiyle kitosan, DM çalışmalarında doku iskeletleri üretmek amacıyla kullanılmak için umut verici bir malzeme olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.8.5. Amoksisilin (AMX)

Penisilin ailesinin en önemli üyelerinden biri olan amoksisilin, geniş antimikrobiyal aktivitesi, bakterilerin çoğalmasına karşı ket vurma başarısı ile ön plana çıkmaktadır. Aynı zamanda nispeten ucuz olan amoksisilin, Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaçlar listesinde yer alır, insan vücuduna kullanımı güvenli olarak sınıflandırılmıştır ve DM alanında pek çok çalışmada yer almaya devam etmektedir (Altun ve ark., 2018; Sofokleous ve ark., 2013).



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Malzemeler

2.1.1. Biyopolimer

- Önemli biyopolimerlerden biri olan polilaktik asit (PLA) biyouyumluluğu ve literatürde yer edinmiş diğer önemli özellikleri sebebiyle doku iskeletlerinin üretilmesinde temel malzeme olarak kullanılmıştır.
- Doku iskeletlerinde yüksek oranda bulunan PLA'nın karakteristik özelliklerinin doku iskeletlerine vermesi amaçlanmış olup kullanılacak olan diğer uyumlu malzemelerle bir araya geldiğinde düşük mekanik özellikleri gibi dezavantajların ortadan kaldırılması amaçlanmıştır.
- Kullanılan polilaktik asit (PLA) Sigma- Aldrich'ten (Almanya) tedarik edilmiştir.

2.1.2. Beta tirkalsiyum fosfat

- Doğal bir kalsiyum tuzu olan β -TCP, hem vücutta zaten yer alması sebebiyle doku iskeletlerinde kullanılmasının toksik etki yaratmaması, hem de sahip olduğu iyi mekanik özellikler ve biyopolimerler göstermiş olduğu uyum sebebiyle tercih edilmiştir.
- PLA ile bir araya gelen β -TCP bu çalışmada doku iskeletlerinin temel yapısının oluşmasında yardımcı olmakla beraber, doku iskeletlerinde en yüksek oranda bulunan ikinci malzemedir.
- β -TCP Merck'den (Almanya) temin edilmiştir.

2.1.3. Farklı hidrojel yapıları

- Col (Nicotiana tabacum'da eksprese edilen Bornstein ve Traub Tip I, rekombinant), HLh, SAlg ve Ch farklı özelliklerde hidrojel yapısı oluşturmak ve PLA/ β -TCP doku iskeletlerine yeni özellikler kazandırmak için kullanılmıştır.
- Bu malzemelerin tercih edilme sebeplerinden biri de biyouyumluluğun artırılması ve doku iskeletlerine kullanım amacına uygun özellikler kazandırılmasıdır.

- Col, SAlg ve Ch Sigma-Aldrich'ten (Almanya) tedarik edilmiştir.
- HLh, Endüstriyel Biyoteknoloji ve Sistem Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan (Marmara Üniversitesi, İstanbul, Türkiye) satın alınmıştır.

2.1.4. Çözücü malzemeler

- Diklorometan (DCM), çözelti hazırlanması esnasında kullanılmıştır.
- Dimetilsülfoksit (DMSO), çözelti hazırlanması esnasında kullanılmıştır.
- Çözücü malzemeler seçilirken kullanılan malzemelere olan uyumu yanı sıra biyo baskı sırasında istenilen katılma hızının elde edilebilmesi adına uçuculuk özelliği yüksek çözücülerin seçilmesine ve bu sayede doku iskeletlerinin kontrollü olarak katı hale geçişinin sağlanmasına dikkat edilmiştir.
- Çözücü malzemeler Sigma- Aldrich'ten (Almanya) tedarik edilmiştir.

2.1.5. Antibakteriyel malzemeler

- Amoksisilin (AMX), antibakteriyel deneylerde bakteriyel aktiviteye ket vurulmasını sağlamak için kullanılmıştır. Doku iskeletlerinin biyouyumluluğunu kötü yönde etkilemeden antibakteriyel özellikler kazanımı temel hedef olmuştur.
- AMX, Sigma- Aldrich'ten (Almanya) tedarik edilmiştir.

2.1.6. Hücre testlerinde kullanılan malzemeler

- Hücre canlılığı deneyleri için, Saos-2 (insan osteosarkoma) hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) elde edilmişlerdir.
- Dulbecco'nun modifiye eagle besi yeri ortamı (DMEM) (FBS) Gibco'dan (İrlanda) satın alınmıştır.
- Fetal Bovine Serum (FBS) Gibco'dan (İrlanda) satın alınmıştır.

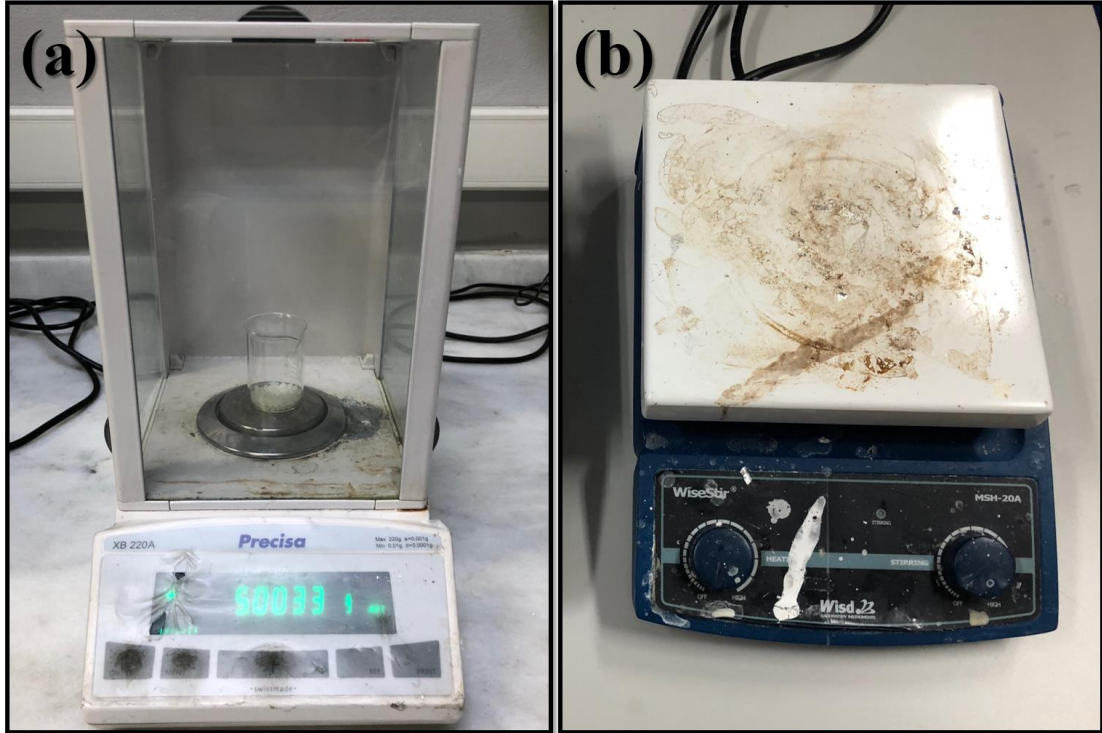
2.2. Kullanılan Cihazlar

- 3B biyo baskı sistemi (Hyrel 3D, SDS-5 Extruder, GA, ABD) 3B doku iskeletlerinin oluşumu için kullanılmıştır.
- Taramalı elektron mikroskobu (EVO MA-10, Carl Zeiss, Almanya) doku iskeletlerinin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.
- Püskürtmeli kaplama cihazı (Quorum SC7620, ABD) ile doku iskeletleri Altın kaplanarak taramalı elektron mikroskobunda görüntülenebilir hale getirilmiştir.
- Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, 4600 Jasco, Japonya) doku iskeletlerinin kimyasal yapısının ortaya konması amacıyla kullanılmıştır.
- Hazırlanan çözeltilerin karakteristik özellikleri olan viskozite değerleri vizkozimetre (Brookfield DV-E, Massachusetts, ABD), yüzey gerilimi, yüzey tansiyometresi (Sigma 700 DYNE, Birleşik Krallık) ve öz kütle 10 ml'lik piknometre kullanılarak belirlenmiştir.
- Mekanik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla basma testleri bir evrensel test makinesi (DVT, Devotrans, İstanbul, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- Doku iskeletlerinin kalınlıklarının ölçülmesi amacıyla dijital mikrometre (293-100 Mitutoyo, Japonya) kullanılmıştır.
- Doku iskeletlerinin termal davranış özellikleri ise diferansiyel taramalı kalorimetre cihazı (Jude DSC, PerkinElmer Inc., Mass., ABD) kullanılarak belirlenmiştir.
- Çözelti hazırlama esnasında tartım ve karıştırma işlemleri için hassas terazi (XB 220 A, Precisa, Almanya) ve mekanik karıştırıcılar (WiseStir®, MSH-20A, Almanya) kullanılmıştır.
- Etüv (Ecocell, MMM, Almanya) ve hem hareketli hem de ısıtıcı karıştırıcı (BioSan TS-100C, Litvanya), biyobozunum çalışmalarında vücut ortamının mümkün olduğunca benzerlikte taklit edilebilmesi amacıyla kullanılmışlardır.

2.3. Çözelti Hazırlanması

Üretilcek olan doku iskeletlerinin temel yapısının oluşturulması adına, öncelikle 3B biyo baskı yöntemine uygun olacak şekilde çözeltilerin hazırlanması aşaması uygulanmıştır. **Şekil 2.1a**'da görülen hassas terazi yardımı ile (XB 220 A, Precisa, Almanya), ağırlıkça oranı %10 PLA ve % 5 β -TCP olacak şekilde DCM kullanılarak kimyasal çözünme sağlanmış ve bu iki farklı faz (polimerik ve seramik) homojen bir şekilde oda sıcaklığında (23°C) bir araya getirilmiştir. Bu adım 5 kez tekrar edildikten sonra, karışım çözeltileri 30 dakika boyunca **Şekil 2.1b**'de görülen manyetik bir karıştırıcı (WiseStir®, MSH-20A, Almanya) kullanılarak karıştırılmıştır.

Son adım olarak da antimikrobiyal aktivite / biyouyumluluk dengesinin incelenmesi adına AMX, literatürde bu alanlarda çok popüler olan Ch ile beraber kullanılmak üzere çözeltiye katılmıştır. Çözelti hazırlama işlemi sonrasında oluşan 5 farklı örnek **Tablo 2.1.**'de gösterilmiştir.



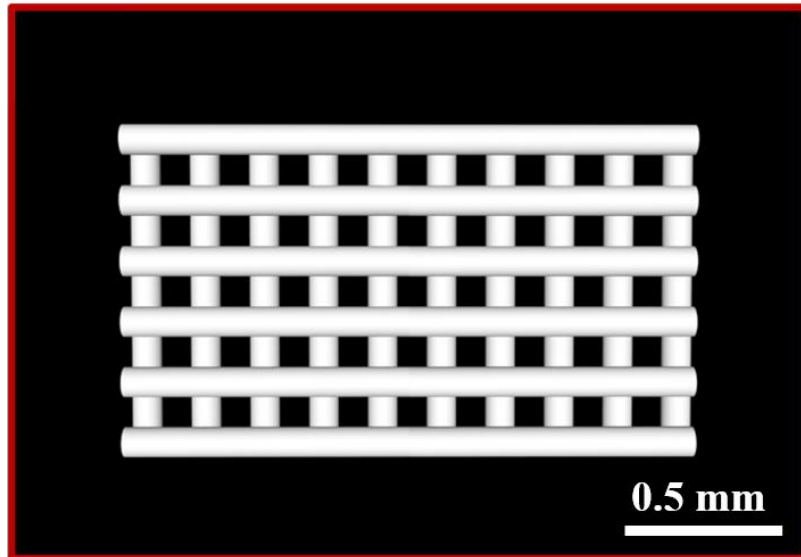
Şekil 2.1. Çözelti hazırlamada kullanılan (a) hassas dijital tartı, (b) manyetik karıştırıcı.

Tablo 2.1. Biyo baskı öncesi hazırlanan tüm örneklerin konsantrasyon içerikleri ve farklı hidrojel yapıları.

Biyo baskı örnek içeriği	Hidrojel Tipi
PLA/β-TCP	-
PLA/β-TCP/Col	Kolajen
PLA/β-TCP/HLh	Halomonas Levan
PLA/β-TCP/SAlg	Aljinat
PLA/β-TCP/Ch	Kitosan
PLA/β-TCP/Ch/AMX	Kitosan/Amoksisilin

2.4. Doku İskeletlerinin 3B Biyo Baskı Yöntemi ile Üretimi

3B biyo baskı yönteminin hayata geçirilmesinin öncelikli şartlarından biri olan 3B modelleme işlemi, doku iskeletlerinin morfolojik yapısının belirlenmesi amacıyla bilgisayar destekli yazılım (SolidWorks) vasıtası ile çizilerek tamamlanmıştır. **Şekil 2.2.**de bilgisayar modellemesi sırasında ortaya çıkan şekil gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Doku iskeletlerinin bilgisayar destekli yazılım tarafından yapılan modellemesinin görüntüsü.

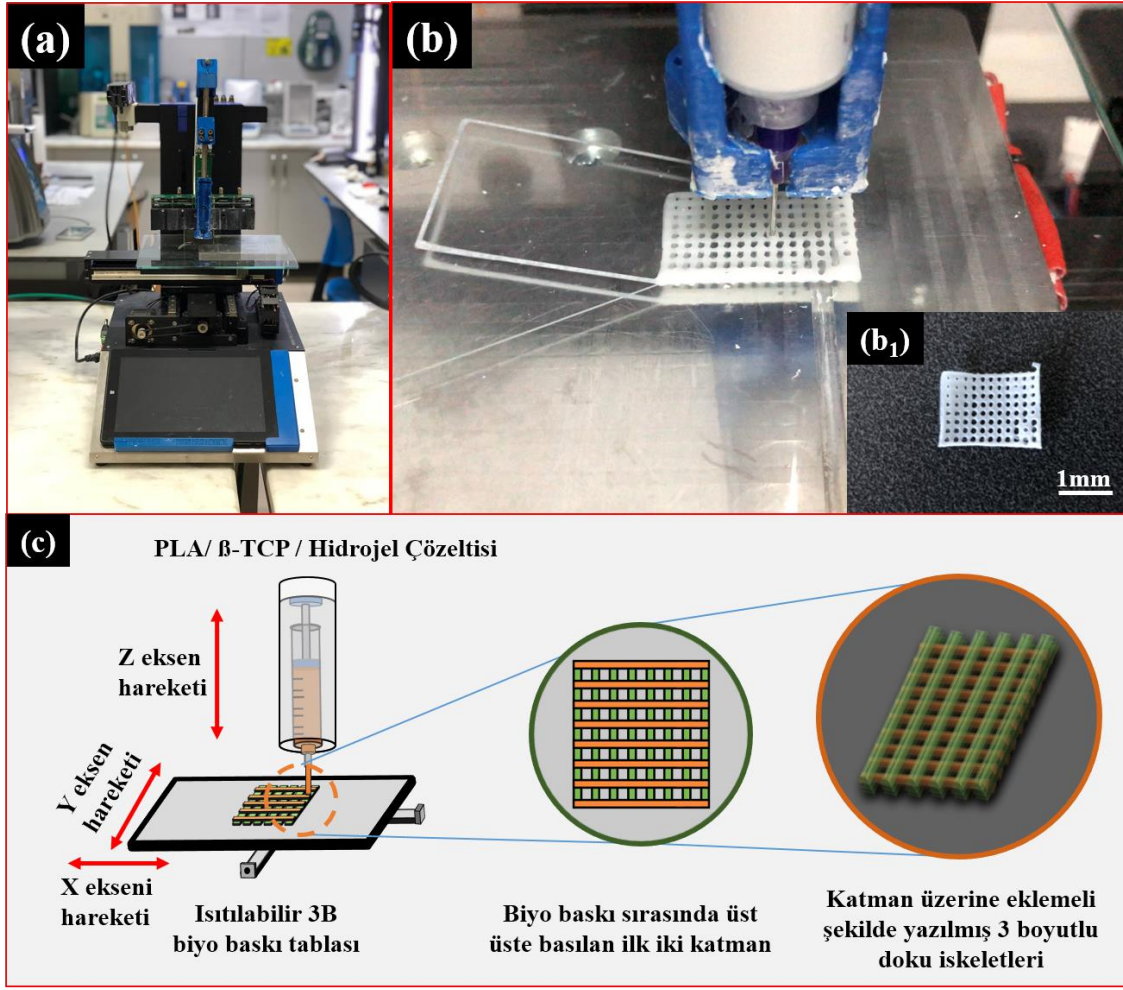
3B biyo baskı süresince her bir örnek tipi için bu 3B modelleme üzerinden üretim aşamaları gerçekleştirilmiştir. Bu bilgisayar modellemesinden yola çıkılarak da, doku iskeletlerinin 3B üretimi, 0° / 90° mimarisi kullanılarak, bir 3B biyo baskı sistemi (Hyrel 3D, SDS-5 Extruder, GA, ABD) yardımı ile üretilmiştir.

Farklı malzeme içeriklerine sahip olan her örnek aynı 3B modelleme üzerinden üretim aşamaları ile gerçekleştirilmiştir.

Şekil 2.3.'de biyo baskı süresince çekilen kamera görüntüleri ve tüm sürecin şematik gösterimi bulunmaktadır. **Şekil 2.3a**'da görüldüğü gibi bir, biyo yazıcı sistemi kurulduktan sonra solüsyonlar, 0,81 mm dış çapa sahip paslanmaz çelik baskı iğnesine doğrudan bağlı olacak şekilde 10 ml'lik luer kilit şırıngasına yüklenmiştir. Biyo baskı sırasında akış hızı, 1 ml / saat olacak şekilde ayarlanmıştır ve akış hızı dijital şırınga pompası modülü tarafından kontrol edilmiştir. Biyo baskı esnasında sıcaklığın kontrol edilebilmesine olanak tanıyan biyo baskı tablası, çözücünün daha hızlı buharlaşmasını sağlamak için 35°C'ye sabitlenmiş ve 3B biyo baskı, 50 mm / s baskı hızında optimize edildikten sonra tüm örnekler için bu hız değeri kullanılmıştır.

Şekil 2.3b'de biyoyazım esnasında çekilmiş olan dijital fotoğraf makinası görüntüsünde doku iskeleti ve baskı iğnesinin konumu gösterilmektedir. **Şekil 2.3b1**'de ise biyo baskı sonrası doku iskeletinin kamera görüntüsü sergilenmekte olup ve **Şekil 2.3c**'de tüm biyo baskı sürecinin şematik gösterimi verilmiştir. X,Y ve Z eksenlerinde hareket edebilen bu biyoyazım tablası vasıtası ile katman üzerine eklemeli şekilde üretilen 3B doku iskeletlerinin üretimi sağlanmıştır.

Ek olarak bu yöntem, kullanılan her bir örnek türü için tekrarlanmıştır ve ortam sıcaklığı, nem gibi çevresel parametreler solüsyon buharlaşma hızında değişiklik olmaması için devamlı kontrol edilmiş ve sabit tutulmuştur. Bu bağlamda tüm parametrelerin sabitlenmesi yardımı ile doku iskeletleri yapısındaki tek değişken malzeme içerikleri olmuş olup ortam koşullarının doku iskeletleri üretimine her hangi bir potansiyel etkisi engellenmiştir.



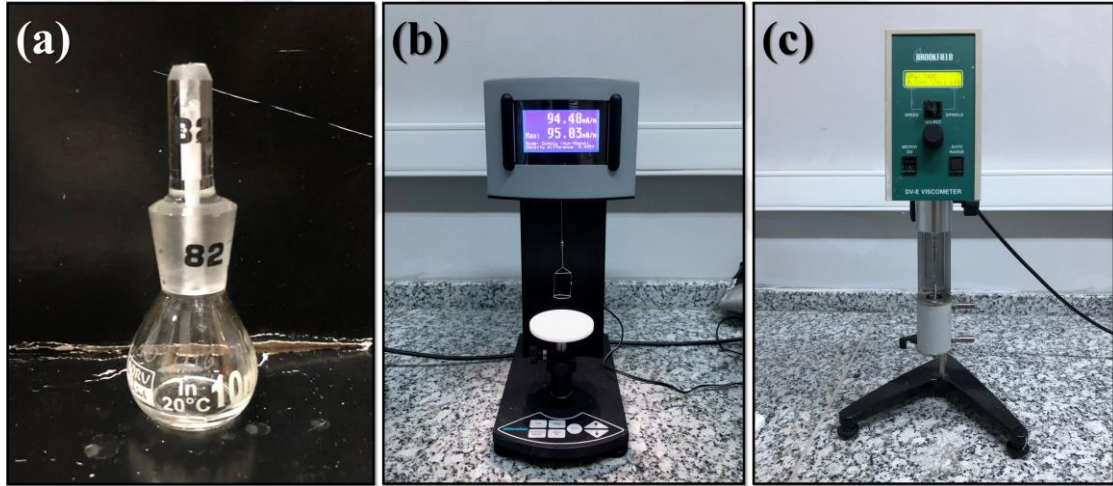
Şekil 2.3. Biyo baskı sisteminin dijital kamera fotoğrafları. (a) Biyo baskı cihazı , (b) biyo baskı esnasında doku iskeleti ve kullanılan iğne, (c) 3B biyo baskı yöntemi ve katman üzerine eklemeli üretim metodunun şematik gösterimi.

Biyo baskı süresince kullanılan çözücülerin hızlı buharlaşabilme yetenekleri sayesinde buharlaşma ve bu bağlamda katılaşma sürekli olarak devam edebilmiş; bu durum her bir katmanın kendinden bir sonraki katman ile karşılaştığı anda gerekli katı yapıya sahip olabilmesine olanak sağlamıştır. Biyo baskı ardından üretilen doku iskeletleri, yapıları içinde herhangi bir çözücü kalıntısı kalmaması için etüvde 24 saat boyunca 37°C’de beklemeye alınmıştır ve bu sayede doku iskeletleri üzerinde kalma ihtimali olan istenmeyen çözücülerin buharlaşması için yeterli zaman ve ortam koşulları sağlanmıştır. Bu işlemler üretilen her bir doku iskeleti için uygulanmıştır.

2.5. Karakterizasyon

2.5.1. Kullanılan çözeltilerin karakterizasyonu

3B biyo baskı esnasında önemli etkilere sahip olan çözelti özellikleri deneylerin yeniden tekrarlanabilir olabilmesi için önemli parametreler olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bu nedenle, 3B biyo baskı süresince kullanılan tüm örneklerin viskozite, öz kütle ve yüzey gerilimi gibi özellikleri belirlemiştir. Öz kütle'nin belirlenebilmesi için 10ml'lik hacme sahip standart öz kütle ölçüm şişesi kullanılmıştır. Hacmi önceden bilinen ve boş ağırlığı tartılan bu şişe, içine işaretli kısma kadar örnek doldurulduktan sonra tekrar tartılmış; bulunan değerden şişenin boş ağırlığı çıkarıldıktan sonra bu değer bilinen hacme bölünmüş ve çıkan değer çözelti öz kütlesi olarak karşımıza çıkmıştır.



Şekil 2.4. Çözelti karakterizasyon cihazları ve aletleri. (a) Özkütle ölçümü için piknometre, (b) yüzey gerilimi ölçüm cihazı, (c) viskozite ölçümü için viskozimetre.

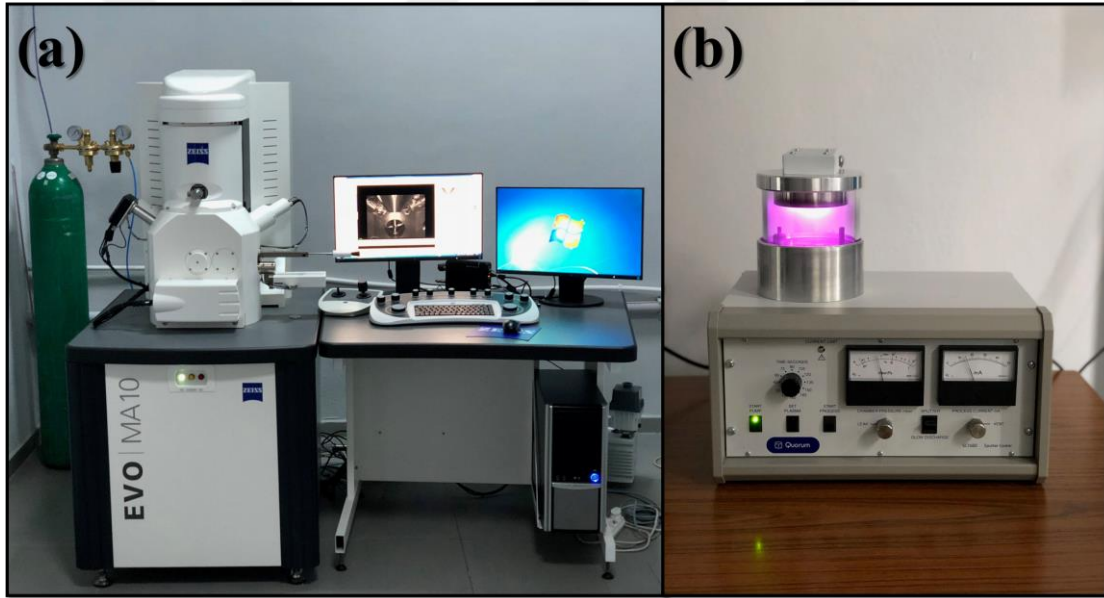
Çözeltilerin viskozite değerleri ise vizkozimetre (Brookfield DV-E, Massachusetts, ABD) cihazı ile ortaya konulmuştur. Oda sıcaklığında 10 rpm'e ayarlanan vizkozimetre cihazı her bir örnek için 120 saniye boyunca ölçüme bırakılmış ve elde edilen değerler çözeltilerin viskozitesini vermiştir.

Çözeltilerin yüzey gerilimi ise bir yüzey tansiyometresi (Sigma 700 DYNE, Birleşik Krallık) kullanılarak belirlenmiştir. Her ölçümden önce kullanılacak olan cihazların kalibrasyonu yapılmış ve her bir örnek tipi için tüm ölçümler oda sıcaklığında (23°C), % 45-50 bağıl nem değerinde gerçekleştirilmiş ve her bir ölçüm toplamda 5 kez

tekrarlanmıştır. Çözelti karakterizasyonunda kullanılan aletler ve cihazlar **Şekil 2.4**'de gösterilmiştir.

2.5.2. Doku iskeletlerinin morfolojik yapısının karakterizasyonu

Doku iskeletlerinin morfolojik özelliklerinin ortaya konabilmesi adına **Şekil 2.5a**'da görülmekte olan taramalı elektron mikroskobu (EVO MA-10, Carl Zeiss, Almanya) kullanılmıştır. Görüntüleme öncesinde doku iskeletleri, **Şekil 2.5b**'de gösterilen püskürtme ile kaplama makinesi (Quorum SC7620, ABD) yardımı ile 60 saniye boyunca altın (Au) ile kaplanmış ve doku iskeletleri üzerinde 18,35 μm kalınlığında bir kaplama tabakası oluşturulmuştur. Hemen ardından doku iskeletlerinin yüzey morfolojisi 5kV hızlandırma voltajı altında incelenmiştir.



Şekil 2.5. Doku iskeletlerinin görüntülenmesi amacıyla kullanılan taramalı elektron mikroskobu ve (b) kaplama cihazı.

Aynı parametreler fakat farklı malzeme tipleri kullanılarak üretilen her bir örnek, 3B biyo baskı sonrası sahip olduğu yapısal bütünlük ve morfolojik farklılıklar açısından detaylı olarak incelenmiştir. Doku iskeletlerinin iç boşluklarının oluşturmuş olduğu köşegen uzunluk ortalamaları bilgisayar yazılımı (Analysis5, Olympus, ABD) yardımı ile ölçülmüştür ve her bir doku iskeleti örneği için maksimum, minimum ve ortalama değerler hesaplanmıştır.

2.5.3. Doku iskeletlerinin mekanik özellikleri

Doku iskeletlerinin mekanik özelliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla tek eksenli basma testi gerçekleştirilmiştir. **Şekil 2.6a**'da görüldüğü üzere, 45 kN yük hücresi bulunan bir evrensel test makinesi (DVT, Devotrans, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Çapraz kafa hızı 1 mm / dakika'ya ayarlandıktan sonra, her bir doku iskeleti basma testine tabi tutulmuştur. Testler öncesinde doku iskeletlerinin yüzey alanı ve kalınlıkları **Şekil 2.6b**'de görülen dijital mikrometre (293-100, Mitutoyo, Japonya) yardımı ile ölçülmüştür.



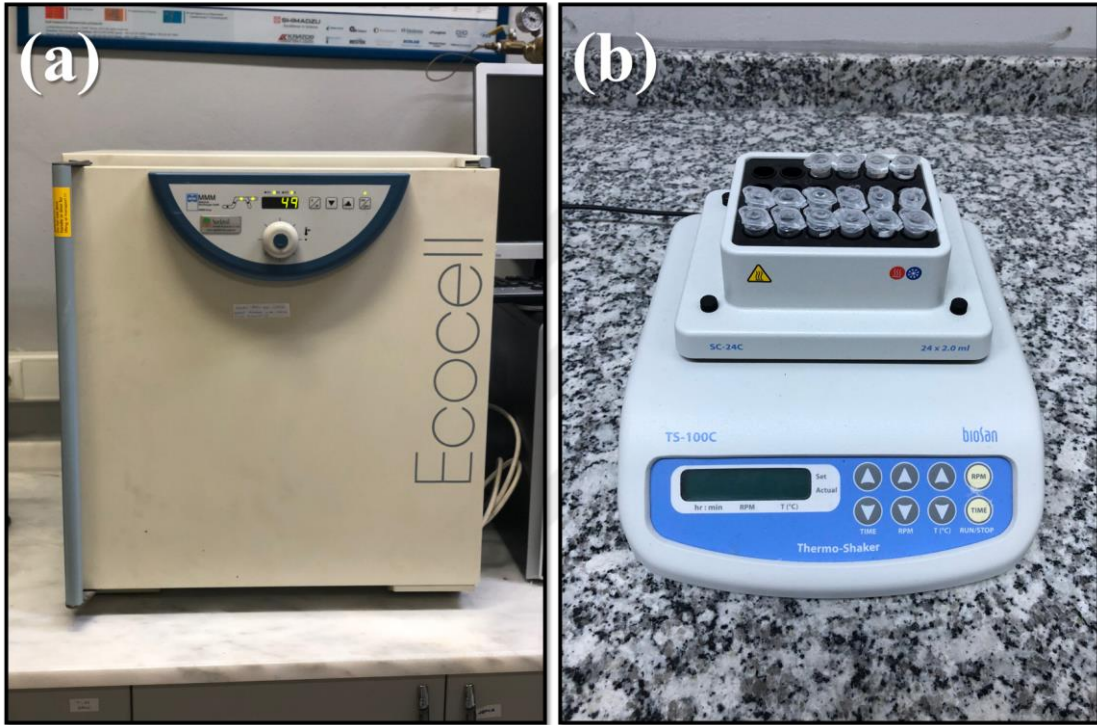
Şekil 2.6. Doku iskeletlerinin mekanik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan (a) basma testi makinesi ve (b) kalınlık ölçmek için kullanılan dijital mikrometre.

2.5.4. Doku iskeletlerinin biyolojik bozunum özellikleri

Doku iskeletlerinin vücut ortamında sergileyecekleri biyobozunum özelliklerinin araştırılması adına gerçekleştirilen biyobozunum çalışmaları, 37 °C' de toplam 35 günlük bir inkübasyon süresinin detaylı olarak incelenmesi ile ortaya konmuştur.

Her bir doku iskeleti tipi için 4 ml PBS çözeltisi (pH 7.4) içeren test tüpleri kullanılmıştır. Örneklerin bozunum yüzdeleri belirli günler için ayrı ayrı ölçülmüştür (1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 ve 35).

Her bir belirlenmiş gün için, ilgili örnekler PBS ortamından çıkarılıp, saf su ile yıkanmış ve 24 saat boyunca etüv kullanılarak kurutulmuştur. İlk ağırlıkları test başında hesaplanmış olan numunelerin belirli günler sonrası sahip oldukları kuru ağırlık oranı ile biyobozunum yüzdelерinin hesaplaması yapılmıştır. **Şekil 2.7a**'da biyobozunum çalışmalarında kullanılan etüv (Ecocell, MMM, Almanya) ve **Şekil 2.7b**'de vücut ortamının mümkün olduğunca yüksek benzerlikte taklit edilebilmesi amacıyla kullanılan hareketli ve ısıtıcı karıştırıcı (BioSan TS-100C, Litvanya) gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Biyobozunum çalışmalarında kullanılan (a) etüv, (b) hareketli ve ısıtıcı karıştırıcı.

2.5.5. Doku iskeletlerinin kimyasal yapısı

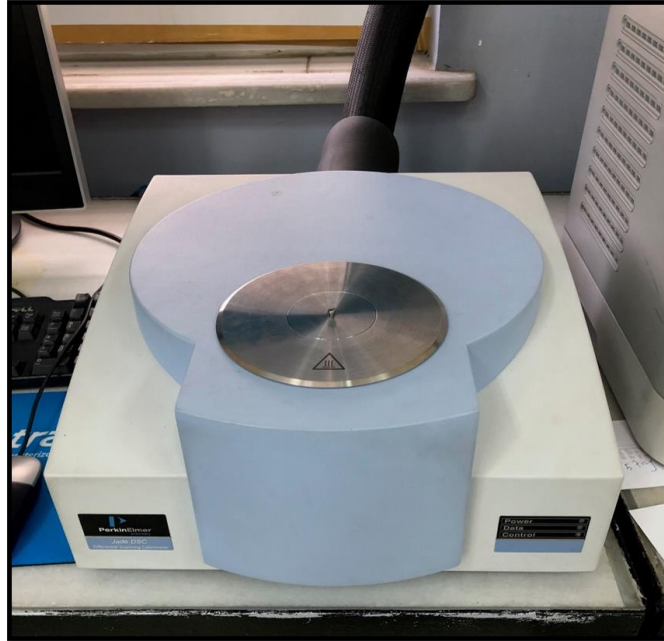
Doku iskeletleri oluşturan moleküler yapı ve bu yapılar arasındaki kimyasal bağların ortaya çıkarılması için **Şekil 2.8**'de görülmekte olan Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, 4600 Jasco, Japonya) cihazı kullanılmıştır. Test boyunca geçirgenlik değeri olarak, 4000 cm^{-1} ila 450 cm^{-1} arasındaki dalga boyu ile çalışılmıştır.



Şekil 2.8. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi cihazı.

2.5.6. Doku iskeletlerinin termal özellikleri

Doku iskeletlerinin termal davranış özellikleri **Şekil 2.9.**'da yer alan diferansiyel tarama kalorimetre cihazı (DSC, Perkin Elmer, ABD) kullanarak karakterize edilmiştir.



Şekil 2.9. Termal özelliklerin belirlenmesinde kullanılan diferansiyel tarama kalorimetre cihazı.

Her bir doku iskeleti örneği için 7,5 mg'lık bir numune alüminyumdan yapılmış ufak ölçüm kaplarına yerleştirilmiş ve 0-250 °C'lik bir sıcaklıkta nitrojen gazı altında 5 °C / dk oranında ısıtılmıştır. Camı geçiş sıcaklığı (T_g), erime sıcaklıkları (T_m) ve ΔH değerleri bu test sonucunda ortaya konulmuştur.

2.5.7. Doku iskeletlerinin antibakteriyel özellikleri

Üretilen doku iskeletlerinin antibakteriyel potansiyelinin ortaya konması için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Doğada yaygın olarak bulunan önemli bakteri suşları arasından bir Gram negatif olan *Echericia coli* ve bir Gram pozitif olan *Staphylococcus aureus* bakterileri varlığında doku iskeletlerinin antibakteriyel inhibisyon özellikleri her bir örnek tipi için incelenmiştir. Bakterilerin çoğalabilmesi için gerekli besin kaynağı olarak Luria Bertani agarı kullanılmıştır. Her bakterinin süspansiyonu agar plakalarına yayıldıktan sonra doku iskeletleri bu agar üzerine yerleştirilmiş ve 24 saat 37 °C'de inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Antibakteriyel aktivite, numune çevresindeki inhibisyon bölgesinin çapının incelenmesi ve ölçülmesiyle belirlenmiştir.

2.5.8. Doku iskeletlerinin hücre kültürleri

Doku iskeletlerinin canlı hücreler ile aynı ortamda bulunmaları sonucunda, hücreler üzerinde oluşturacağı etkiler ve biyouyumluluk potansiyelleri, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) elde edilen insan osteosarkoma (Saos-2) hücre hattı kullanılarak ortaya konulmuştur. Hücre kültürlerinin yapılabilmesi için, %10 Fetal bovin serumu (FBS, Gibco), % 1 penisilin / streptomisin ile DMEM' in bir araya getirilmiş ve hücre büyümesi ve çoğalması için uygun ortam hazırlanmıştır. Hemen ardından hazırlanan hücre ortamları deney süresi boyunca %5 oranında CO₂ içeren nemlendirilmiş hava inkübatöründe, 37 °C' de tutulmuştur. Hücre çoğalması % 80'e ulaştıktan sonra kültürler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmış ve her seferinde pasaj ve hücre ekimi için % 0,25 Tripsin-EDTA ile tripsinize edilmiştir. Çoğalan hücreler sitotoksosite testlerinde ve elektron mikroskobu incelemelerinde kullanılmıştır. Başlangıçta, numunelerden ortam içerisine olası iyonik süzme ürünü tarafından indüklenen olası toksik etkiyi anlamak için hazırlanmıştır. Bu amaçla, 5 ml'lik taze ortam, inkübatörde tutulan bir parça (-0,05 g) test edilmiş doku iskeletleri ile tüplere eklenmiştir. Koşullandırılmış ortam ekstrakte edildikten bir hafta sonra sitotoksosite testlerinde

kullanılmıştır. MTT deneyleri 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. Saos-2 hücreleri kuyucuk başına yaklaşık 10^5 hücre 2 saat boyunca UV ile sterilize edilmiş olan doku iskeletleri üzerine ekildikten sonra ve 1 gün, 2 gün ve 3 gün sonra incelenmek üzerine inkübe edilmiştir.

Hücre canlılığı, mitokondriyal NADH / NADHP' ye bağlı dehidrojenaz aktivitesinin belirlenmesiyle ölçülmüş olup, bu da 3- (4, 5-dimetiltiyazol-2-gl) -5- (3-karboksimetoksifenil) -2- (4-) 'sülfofenil-2H) tetrazolyum tuzunun çözünür bir formazan boyası içine nin hücrel dönüşümüyle sonuçlanmıştır. 1 gün, 2 gün ve 3 gün sonra, süpernatantlar çıkarıldı ve 10 ul 3- {4, 5-dimetiltiyazol-2-il} -2,5-difenil-2H-tetrazolyum-bromür (MTT-5mg / ml- Sigma) çözeltisi her kuyuya eklendi. 37° C'de 3,5 saat süreyle inkübasyonu takiben ve havada %5 CO₂ ile nemlendirilmiş atmosferde, karanlıkta tutulduktan sonra MTT aktif hücreler tarafından alınmış ve mitokondriyada çözünmeyen mor formazan granüllere indirgenmiştir. (Mosmann, 1983). Daha sonra, süpernatant atılıp ve çökeltilmiş formazan, dimetil sülfoksit (kuyucuk başına 100 uL) içinde çözölmüş ve çözeltinin optik yoğunluğu, 570 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

Hücrel testlerden sonra, hücreler ve doku iskeletleri arasındaki etkileşimleri göstermek amacıyla, örneklerin taramalı elektron mikroskobu analizi yapılmıştır. Bu analiz için öncelikle örnekler 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının kuyucuklarına yerleştirilmiş ve iki saat süreyle sterilize edilmiştir. Saos-2 hücreleri bu plastik kaplara ekilmiş ve % 95 hava ve %5 CO₂ ile 37 °C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Her bir günün sonunda ortam çıkarılmış ve örnekler %3 hacimdeki glutaraldehit ile fıkse edilip, yükselen dereceli (%30-100) alkol dehidrasyonuna tabi tutulduktan sonra elektron mikroskobu uygulamalarına kadar -20 ° C'de saklanmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Üretilen doku iskeletlerinin kullanım amaçları doğrultusunda üretilmiş ve pratikte uygulanabilir olmaları için belirli özellikler bulundurmaları gerekmektedir. Bu sebeple, doku iskeletleri sahip oldukları geometri, kimyasal yapı, morfolojik, termal ve mekanik ve antibakteriyel özellikleri ve tüm bu önemli özelliklerin yanı sıra hücreler ile olan ilişkilerine bağlı biyouyumluluk değerleri bakımından detaylı olarak test edilmiştir.

3.1. Hazırlanan Çözelti Özellikleri

Doku iskeletleri üretilmeden önce, 3B biyo baskı işlemine girecek olan çözeltilerin belirli özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Ortam sıcaklığı, nem, çözücü buharlaşma hızı, viskozite, yüzey gerilimi ve öz kütle gibi tüm parametrelerin 3B biyo baskı cihazının yazım hızı parametresi ile bir araya gelmesi ve bir ahenk içinde uygun değer aralıklarında olması biyo baskının başarıya ulaşması için çok önemli bir etkindir. Eğer bu çalışabilme aralığı dışına çıkılır ise işlem baskı iğne tıkanması veya benzeri sebepler ile yarıda kesilebilir. Biyo baskı sırasında katman üzerine eklemeli baskı işlemi yapıldığından ilk katman üretildikten hemen sonra ikinci katmana geçildiğinde altta kalan kısmın katılmış olması beklenmektedir. Bu sebepten biyo baskı esnasında karşımıza çıkan bu parametrelerin oldukça önemli olduğunu söylenebilir. Oda sıcaklığında (23°C) ve % 45-50 bağıl nem değerinde ölçülen çözelti değerleri **Tablo 3.1**'de verilmiştir. Biyo baskı işlemleri bu parametreler ve ortam koşullarında optimize edilmiş ve başarılı olunmuştur.

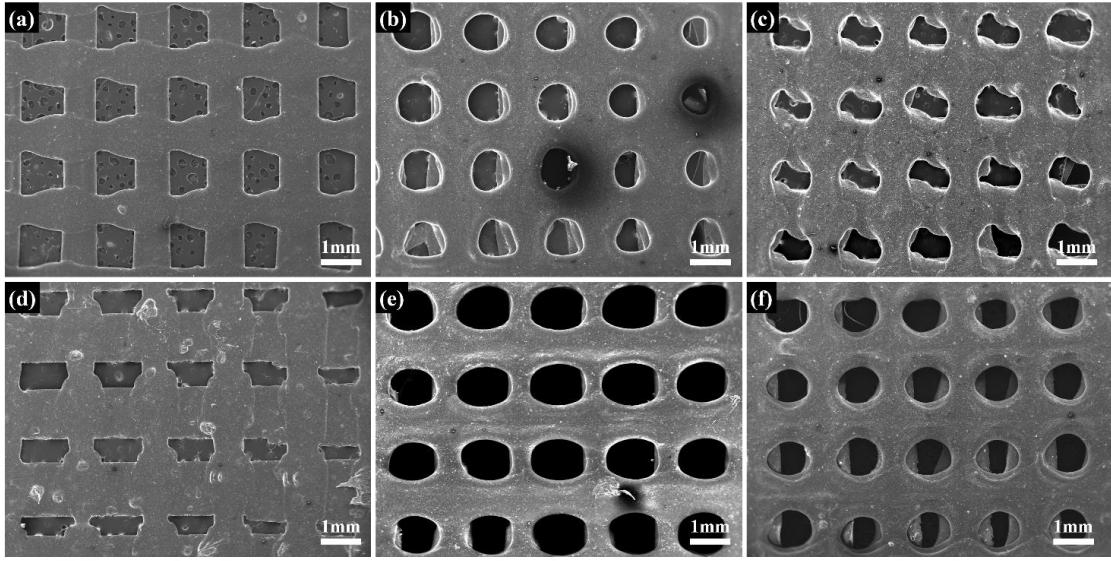
Tablo 3.1. Biyo baskı öncesi ölçülen çözelti parametreleri.

Çözelti İçeriği (% ağırlık oranı)	Viskozite (cP)	Yüzey Gerilimi (mN/m)	Özkütle (g/ml)
PLA/β-TCP	805 ± 12	57,48 ± 2,37	1,30 ± 0,05
PLA/β-TCP/Col	768 ± 29	55,52 ± 2,29	1,23 ± 0,03
PLA/β-TCP/HLh	875 ± 22	54,23 ± 2,27	1,32 ± 0,02
PLA/β-TCP/SAIg	800 ± 12	52,84 ± 2,37	1,29 ± 0,07
PLA/β-TCP/Ch	950 ± 29	60,22 ± 2,29	1,30 ± 0,12
PLA/βTCP/Ch/AMX	942 ± 22	65,75 ± 2,23	1,32 ± 0,03

3.2. Doku İskeletlerinin Geometrisi ve Morfolojik Özellikleri

Üretilen doku iskeletlerinin uygulanabilirliği açısından en önemli özelliklerden biri olan doku iskeleti morfolojisi ve geometrisi taramalı elektron mikroskobu kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Doku iskeletlerinin geometrisi ve morfolojik yapısı yalnızca mekanik özelliklerin güçlendirilmesi konusunda yardımcı olmakla kalmayıp aynı zamanda yüzey alanının hacme olan oranının artmasına olanak vermektedir. Bu sayede hücrelerin hayatta kalmasını sağlayacak olan besin maddelerinin difüzyonunun kolaylaşmasına sebep olunabilir ve tüm bu özellikleri ile de hücresel yanıtı olumlu yönde etkilemek gibi bir etkiye sahip olması sebebiyle ön plana çıkmaktadır (Charles-Harris ve ark., 2008). Biyo baskı süresince, çevresel parametreler gibi kontrol edilebilen ve kullanılan malzemelerin çözelti içinde sergiledikleri davranışlar gibi kontrol edilemeyen birçok faktör nedeniyle çok çeşitli geometrik ve morfolojik özellikler oluşabilir. Bu sebeple doku iskeletlerinin sahip olduğu gözenek boyutları ve tipleri onların ne kadar başarılı olduklarına yön vermek konusunda oldukça söz sahibi olabilirler ve üretim süresince dikkat edilmesi gereken çok önemli bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadırlar.

Şekil 3.1'de üretilen tüm doku iskeleti tiplerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri gösterilmektedir. PLA ve β -TCP' nin bir araya gelmiş olduğu **Şekil 3.1a**'da görülmektedir ki doku iskeletlerinin morfolojisi dik yapılandırmalara sahip ve dörtgen şekilli gözeneklere sahip olacak şekilde oluşmuştur. Literatüre yer alan gözenek tipleri arasında bir karşılaştırma yapıldığında görülmüştür ki dik ve dikdörtgenimsi gözenek tiplerine sahip doku iskeletleri dönel yapıya sahip olan doku iskeletlerine göre daha yüksek mekanik özellikler ve daha iyi geçirgenlik gösterdiği bildirilmiştir (Ali ve ark., 2017). Fakat **Şekil 3.1b-f**'de görüldüğü üzere hidrojel varlığı ile beraber doku iskeletlerinin gözeneklerinin silindirik bir şekil almaya başladığı ve Ch içeren doku iskeletlerinde bu silindirik şeklin en yüksek oranda oluşumunun sağlandığı ortaya konmuştur. Silindirik gözeneklere sahip olma durumunun yüzey alanını daha da arttırarak biyo uyumluluğa katkı yapabilme ihtimali yüksektir ve bu nedenle silindirik gözenek oluşumu dikdörtgen şekle göre daha faydalı olabilir. Bununla birlikte, farklı tipteki hücrelerin çoğalma davranışı birçok çeşitli çeşitli faktörlerden etkilenebilir. Bu nedenle, doku iskeleti morfolojisi, iskeletlerin bu alandaki özellikleri hakkında öncü bilgiler verebilir ve hedeflenen DM uygulamalarının amacı ile şekillendirilebilir.

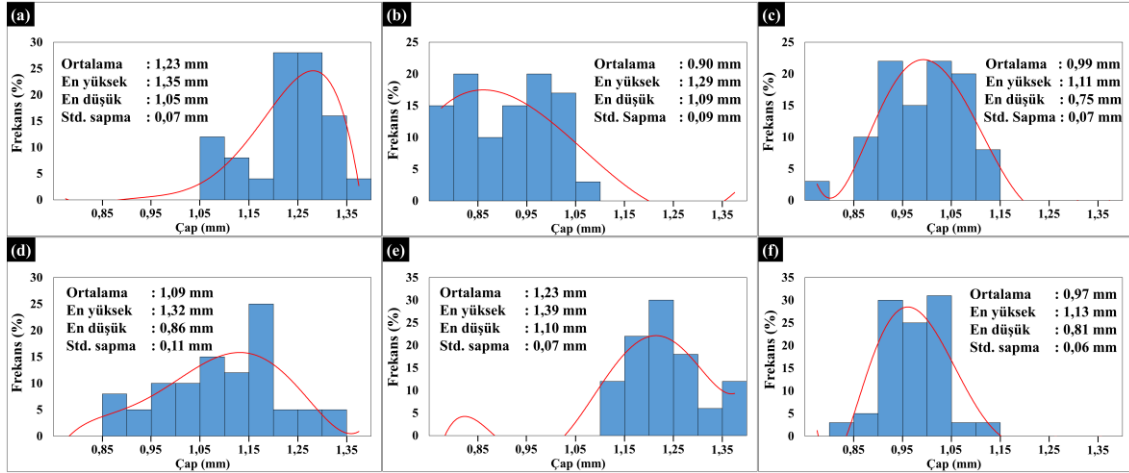


Şekil 3.1. Farklı hidrojel içerikleri ile PLA / β -TCP tabanlı 3B doku iskeletleri' nin elektron mikroskobu görüntüleri. (a) Hidrojel olmaksızın, (b, c, d, e) sırasıyla Col, HLh, SAlg, Ch hidrojelleri, (e) Ch ve AMX ekli doku iskeletleri.

Doku iskeletleri morfolojilerinden bahsederken bir diğer önemli özellik ise gözeneklerin büyüklükleri ve bu büyüklüklerin tüm iskelet boyunca nasıl bir dağılım izlediğidir. Çoğu zaman, doku iskeletleri canlı bir doku ortamına konulduğunda hücre tutunumu, hücre göçü bu gözenekler üzerinde yapılmakta, ek olarak da bu gözenekler fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalar olan atık ve besin değiş tokuşu sağlanmasına da yardımcı olmaktadır (Díaz ve ark., 2014).

İzotropik ve gradyan (değişken) tipi doku iskeleti gözenekleri üzerinde daha önce yapılan çalışmalar ortaya koymuştur ki, izotropik gözenek büyüklüğü dağılımı, yani doku iskeleti boyunca gözenek büyüklüklerinin mümkün olduğunca eşit veya birbirine yakın olacak şekilde bir dağılım göstermesi sonucu birbirine yakın bir değer aralığında bulunması durumu hücrelerin doku iskeletleri üzerinde daha homojen bir dağılım göstermesini etkilemektedir. Ek olarak, gözenek büyüklüklerinin artışı da hücre tutunmasını arttıran bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm bu bilgiler ışığında söylenebilir ki önceki çalışmalarda raporlanan bu özellikler, doku iskeletleri üzerinde hücre tutunum mekanizmasını iyileştireceği için biyoyumluluğu yükselmesine sebebiyet verebilmektedir (Melchels ve ark., 2011). Bu nedenle, gözenek boyutu dağılımının azaltılması ve doku iskeletlerinin morfolojik bütünlüğünden ödün vermeden gözenek

büyükliklerinin artırılması yüksek biyoyumluk ve hücre tutunumu elde edilmesi konusunda yardımcı olacağı düşünülebilir. **Şekil 3.2**'de gözenek büyüklüğü dağılım aralığı ve frekansı grafikleri verilmiştir.



Şekil 3.2. Doku iskeletlerinin gözenek büyüklüğü dağılım aralığı ve frekansları. (a) Hidrojel olmaksızın PLA / β -TCP (b) Col, (c) HLh, (d) SAlg, (e) Ch, (f) Ch / AMX.

Sadece PLA/ β -TCP içeren doku iskeletlerinde en ortalama gözenek büyüklüğü 1,23 mm, en yüksek değer 1,35 mm en düşük değer 1,05 mm ve standart sapma ise 0,07 mm olarak hesaplanmıştır (**Şekil 3.2a**). PLA/ β -TCP 'nin yanı sıra yapısında Col ihtiva eden doku iskeletlerinde ise bu değerler ortalama 0,90 mm, en yüksek 1,29 mm, en düşük 1,09 mm olarak ölçülmüş ve standart sapma 0,09 mm olarak hesaplanmıştır (**Şekil 3.2b**). HLh içeren doku iskeletlerinde ortalama 0,99 mm, en yüksek 1,11 mm, en düşük 0,75 mm olarak gözenek boyutları ölçülmüş ve standart sapma 0,07 mm olarak hesaplanmıştır (**Şekil 3.2c**). SAlg varlığında ise bu değerler ortalama 1,09 mm, en yüksek 1,32 mm, en düşük 0,86 mm olarak ölçülmüş ve standart sapma 0,11 mm olarak hesaplanmıştır (**Şekil 3.2d**). Ch eklenmiş doku iskeletlerinde ise en izotropik por dağılımı gözlemlenmiştir ve bu onu morfolojik özellik bakımından en önemli ve başarılı örnek olarak ortaya çıkarmaktadır. Gözenek büyüklükleri ortalama 1,23 mm, en yüksek 1,39 mm, en düşük 1,10 mm olarak ölçülmüş ve standart sapma 0,07 mm olarak hesaplanmıştır (**Şekil 3.2e**). Ch ve AMX in beraber olarak eklendiği doku iskeletlerinde ise gözenek dağılım aralığı ortalama 0,97 mm, en yüksek 1,13 mm, en düşük 0,81 mm olarak ölçülmüş ve büyümüştür. Standart sapma ise 0,96 mm olarak hesaplanmıştır (**Şekil 3.2f**).

Sonuç olarak üretilmiş olan farklı içeriklere sahip doku iskeletlerinin ortalama gözenek boyutları 0,99 mm ila 1,23 mm arasında saptanmıştır.

Daha önce yapılan DM çalışmalarında ise, hücrel aktivitelerin ihtiyaç duyduğu geçirgenlik özelliğinin sağlanması için gözenek boyutlarının en az 0,3 mm olması gerektiğini bildirmektedir (Hutmacher ve ark., 2007).

Bu bilgiler ışığında söylenebilir ki, üretilmiş olan doku iskeletleri bu değerin oldukça üzerinde olduğundan geçirgenlik konusunda herhangi bir sınırlama olmaksızın kullanılabilir olarak gözükmetedirler.

Ek olarak, gözenek dağılımları kendi aralarında incelendiğinde en izotropik dağılım Ch içeren doku iskeletlerinde görülmektedir.

Biyo baskı süresince, ortam koşulları ve biyo baskı hızı tüm örnek tipleri için aynı tutulmuştur. Bu yüzden farklı gözenek büyüklükleri farklı malzeme içerikleri sebebiyle oluşan farklı viskozite, yüzey gerilimi ve öz kütle değerleri sebebiyle ilgili olabilirler ve bu değerler **Tablo 3.1.**'de belirtilmişlerdir.

3.3. Doku İskeletlerinin Biyobozunum Özellikleri

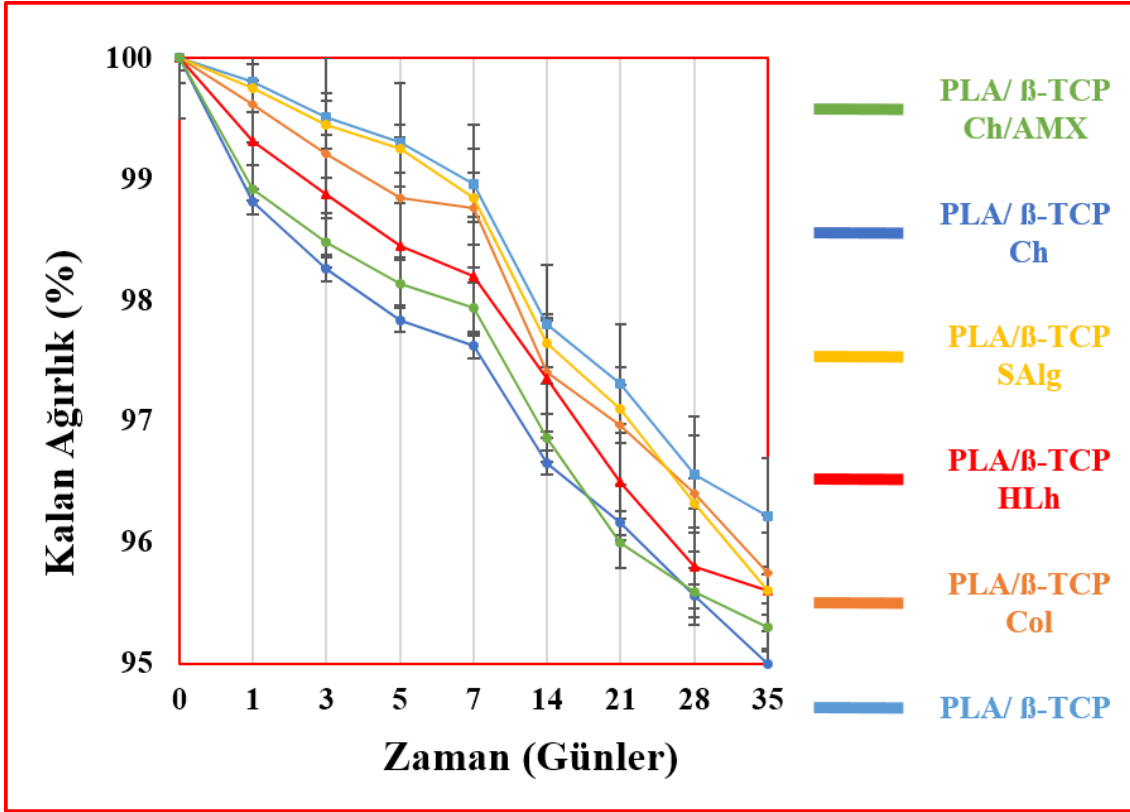
Bir malzemenin yüksek oranda gözenek içermesi veya gözeneklerin değişen büyüklükleri gibi faktörler birim hacim başına yüzey alanını değiştirebildiğinden, doku iskeletlerinin biyobozunum kinetikleri bu faktörlerden etkilenebilirler. Sadece bununla sınırlı kalmamakla birlikte, biyobozunum aynı zamanda malzemelerin özelliklerine de doğrudan bağlıdır ve kompozit yapılar içinde birlikte bulunmalarından etkilenebilir.

Doku iskeletleri üzerinde devam eden hücre çoğalması ile birlikte eşzamanlı süregelen biyobozunum, başarılı bir doku iskeletinin en önemli gereksinimlerinden biridir, çünkü bu eşzamanlı durumlar amaçlanan doku yenilenmesini elde etmek gerekli ortamı oluşturmaktadır.

Hazırlanan doku iskeletleri temel olarak bir laktik asit biçiminde parçalanabilen PLA' dan oluşmuştur ve mekanizma canlı organizma içinde rutin bir biyokimyasal aktivite olan ester bağlarının rasgele hidrolizi ile açıklanabilir. Bu nedenle, bu bozulma sürecinin hedeflenen dokuya dost ve toksik olmaması beklenmektedir ve bu doku iskeletlerinin başarısı için önemli bir özelliktir (Guntlake ve ark., 2003).

Bununla birlikte, PLA 'nın biyobozunum hızı oldukça yavaştır ve bu durum doku

iskeletlerinin uygulama alanlarına sınırlamalar getirebilir. Fakat bu engel, önceki çalışmalarda açıklandığı üzere, beraber kullanıldığında PLA' nın biyo bozunum hızını arttırdığı bildirilen β -TCP ile nispeten dengelenmesi mümkün olan bir kavramdır (Cao ve ark., 2012).



Şekil 3.3. Üretilen doku iskeletlerinin 35 gün boyunca göstermiş olduğu biyobozunum davranışı grafiği.

Üretilmiş olan doku iskeletlerinin biyobozunum grafikleri **Şekil 3.3**'de verilmiştir. PLA / β -TCP 'den oluşan doku iskeletleri 35 gün boyunca yaklaşık % 3,8 oranında bozunma gösterirken, farklı tipte hidrojel örnekleri içeren numunelerde bozunma artarak % 5'e kadar ilerlemiştir. Üretilen tüm doku iskeletleri arasında en yüksek biyobozunum oranı Ch içeren örneklerde saptanmıştır. AMX varlığının ise biyobozunum üzerinde bir etkisi gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak, her ne kadar malzeme içinde kullanım yüzdeleri çok az da olsa veya kolajen hidrojellerinin sahip oldukları çapraz bağlanmalar sayesinde biyobozunum oranlarının azaldığı raporlanmış da olsa, hidrojel yapısı varlığında, doku

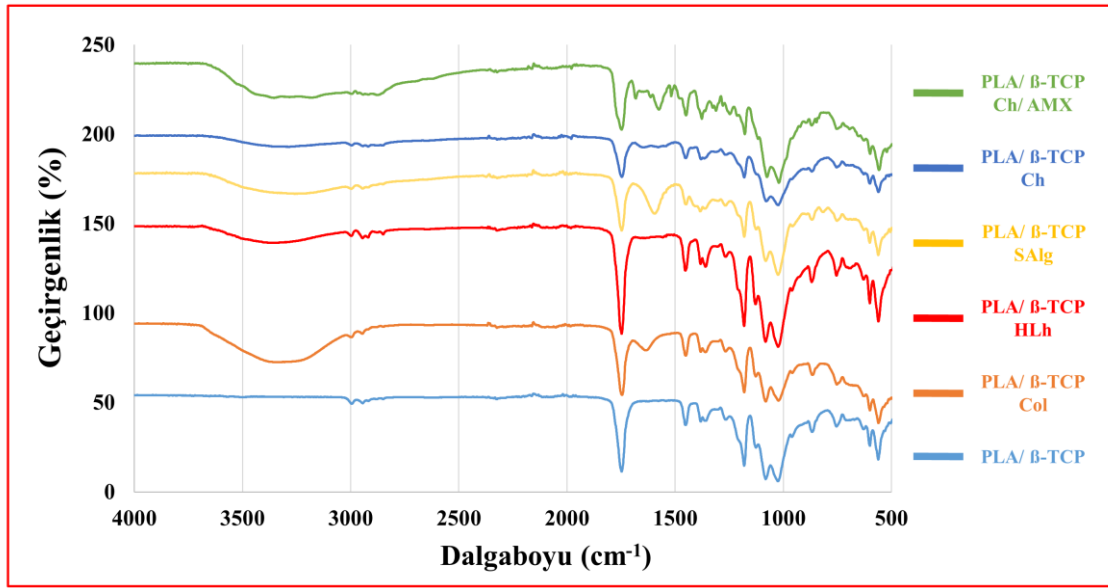
iskeletlerinin biyolojik bozunma davranışlarının ufak bir artış gösterdiği arttığı ortaya çıkmıştır (Alberti ve ark., 2016). Malzeme içeriklerinin biyobozunuma olan etkisinden bağımsız olarak, her bir numune tipinin göstermiş olduğu biyo bozunma oranı, PLA, β -TCP ve kompozit formlarının biyo bozunma davranışlarını bildiren benzer çalışmalardan daha hızlı olduğu literatür taramalarında ortaya çıkmıştır (Kucharczyk ve ark., 2016). Bu artış, üretilen doku iskeletlerinin umut verici özellikte olduğunu göstermekle beraber esas olarak yüksek yüzey alanına sahip olmaları ve doku iskeletlerinin gözenekli yapısı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

3.4. Doku İskeletlerinin Kimyasal Yapısı

Doku iskeletlerinin kimyasal yapısı, malzeme içinde yer alan kimyasal bağların FTIR kullanılarak ortaya çıkarılması ile belirlenmiştir. **Şekil 3.4**'de yer alan grafik bu kimyasal yapıları açıklayan FTIR sonucu grafiklerini göstermektedir. Doku iskeletleri oluşturan malzemelerin oranlarını incelediğimizde, onların büyük bir kısmının PLA ve β -TCP den oluşması sebebiyle, bu malzemelerin pikleri yüksek oranda her örnekte karşımıza çıkmıştır. Ek olarak bazı malzemelerin pikleri üst üste gelip çakıştığından ötürü birbirlerini gizleme, başka bir deyişle iki ayrı pikin bir arada tek bir noktada gözlemlenmesi gibi durumlar ortaya çıkmakla beraber, hidrojel tipleri kendi karakteristik pikleri ile ortamdaki varlıklarını ortaya koymuşlardır. Malzemeleri tek tek ele almak gerekirse, PLA'nın karakteristik özelliği olan omurga ester grubu 1742 cm^{-1} 'de göze çarpmaktadır. Ester gruplarının sebep olduğu -C-O- titreşim germe noktaları ise $1074\text{--}1177\text{ cm}^{-1}$ arası bölgede ortaya çıkmışlardır. Son olarak da bir başka karakteristik pik olan ve laktik asitlerin -OH grupları olarak tanımlanan nokta 3640 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir (Chen ve ark., 2003; Wei ve ark., 2016). β -TCP' nin varlığı ise 1019 cm^{-1} , 603 cm^{-1} ve 565 cm^{-1} 'deki pikler tarafından ortaya konmuştur (Tavares ve ark., 2013).

Hidrojel oluşumu içeren örneklerde bulunan doğal malzemelerin pik noktaları da her örnekte ayrı ayrı ortaya konulmuştur. Örneğin Col için, 1647 cm^{-1} 'de saptanan ve amid I gruplarının önemli karakteristik göstergesi olan C=O esnemesi göze çarpmıştır. Bunu takiben, amid A grubu pozisyonları, -OH titremeleri olarak 3342 cm^{-1} 'de ve Amid B bantları da NH gerilmeleri olarak 3013 cm^{-1} 'de görülmüştür. 1074 cm^{-1} yer alması gereken simetrik esneme piki ise PLA'nın omurga ester grupları ile üst üste gelmiştir ve tek pik olarak kendini göstermektedir (Aydogdu ve ark., 2018a; Vidal ve ark., 2011). HLh

ise hidroksil (OH) esnemelerini 3340 cm^{-1} 'de ve karbon-hidrojen etkileşimlerini de güçsüz bir pik olarak 2913 cm^{-1} 'de ortaya koymuştur (Küçükaşık ve ark., 2011). Doku iskeleti yapısında HLh'nin düşük oranına bağlı olarak, muhtemel piklerin geri kalanı diğer malzemeler ise üst üste gelmesi sebebiyle daha başka anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. SAlg ise 3340 cm^{-1} 'de bulunan ve hidroksil gruplarını (-OH) temsil eden geniş ve büyük bir pik ile karakteristik olarak göze çarpmaktadır. Ek olarak, SAlg içinde yer alan N-H gruplarının asimetrik eğilme titreşimleri 1585 cm^{-1} 'de belirgin bir tepe noktası ile izlenmiştir.

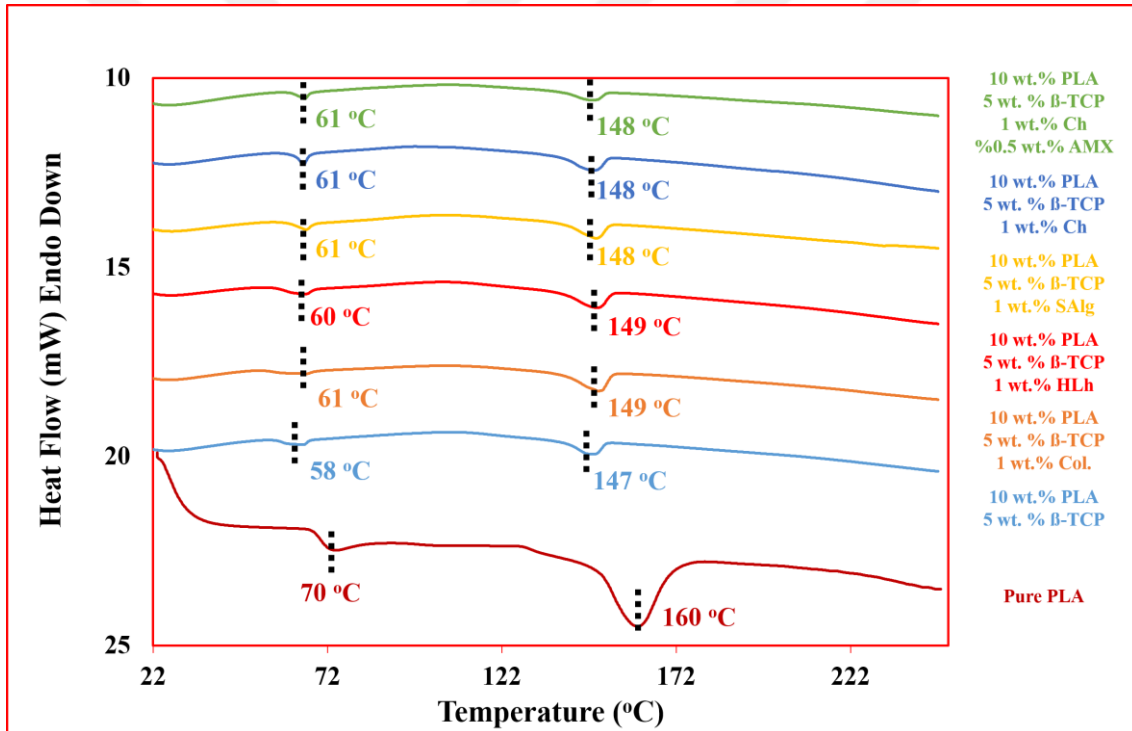


Şekil 3.4. Doku iskeletlerinin FTIR spektrumları.

Son olarak da N-H gerilme tepe noktaları, 1443 cm^{-1} ve 1376 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Pereira ve ark., 2011; Sankalia ve ark., 2007). Ch ile ilgili karakteristik tepe noktaları ise 3390 cm^{-1} , 2860 cm^{-1} , 1631 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} ve 890 cm^{-1} 'de sırasıyla O-H gerdirme, C-H titreşimi, birincil amid H-N-H titreşimi ve piranoid halkası gerilmesini temsil etmektedir (Bashir ve ark., 2017). Son olarak da AMX, 2880 cm^{-1} ile 3400 cm^{-1} arasında birkaç fakat zayıf tepe noktası; 1676 cm^{-1} , 1566 cm^{-1} ve 1239 cm^{-1} noktalarında ise az sayıda fakat güçlü tepe noktaları ortaya koyabilmiştir (Patel ve ark., 2011). Sonuç olarak söylenebilir ki, doku iskeletleri yapısı içinde yer alan tüm materyallerin karakteristik özellikleri başarıyla ortaya çıkarılmıştır.

3.5. Doku İskeletlerinin Termal Davranışları

Doku iskeletlerinin üretiminde kullanılan malzemelerin kendi aralarındaki etkileşimleri gözleyebilmek ve bağların oluşturacağı termal dinamiklerin incelenmesi adına DSC yardımı ile üretilmiş olan her bir doku iskeleti tipi ve saf PLA içim termal özellikler ortaya konulmuştur. Bu bağlamda; saf PLA ve her bir doku iskeletinden alınan örnekler, erime sıcaklığı (T_m) ve camısı geçiş sıcaklığı (T_g) değerlerinin belirlenmesi adına değerlerinin belirlenmesi adına kontrollü olarak teste tabi tutularak DSC termogramları alınmıştır. **Şekil 3.5.**'de görüldüğü üzere sonuçlar ortaya koymaktadır ki, polimerlerin ve katkı maddelerinin moleküller arası etkileşimi sonucunda karışımların T_m ve T_g noktalarında düşme eğilimi görülmüştür.



Şekil 3.5. Doku iskeletlerinin camısı geçiş ve erime sıcaklıkları hakkında bilgi vermekle beraber termal davranışlarını ortaya koyan DSC termogramları.

Saf PLA'nın camısı geçiş sıcaklığı 70 °C'de erime sıcaklığı ise 160 °C'de saptanmıştır. PLA/β-TCP içeren doku iskeletleri test edildiğinde ise bu değerler azalış şeklinde bir yönelme göstermiş ve camısı geçiş sıcaklığı 58 °C, erime sıcaklığı değeri ise 147 °C olarak gözlemlenmiştir. Camısı geçiş ve erime sıcaklıkları sırasıyla Col içeren örnekler için 61

°C ve 149 °C, HLh için 60 °C ve 149 °C, SAlg, Ch ve Ch/AMX içeren örnekler için 61 °C ve 148 °C olarak hesaplanmıştır. Tüm bu çıkarımlar göstermektedir ki doku iskeletlerinin yapısında yüksek oranda PLA polimeri olması sebebiyle T_m ve T_g değerleri PLA polimer zincirlerinin termal değerlerine yakın olarak ortaya çıkmışlardır. Karışımların sıcaklık değerlerindeki düşme dikkate alındığında ise β -TCP ve diğer malzeme çeşitlerinin PLA zincirleri ile moleküller arası etkileşime girmesi ile termal davranışın gözlemlendiği değerlerde değişimler olmuştur. Moleküller arası etkileşim PLA ve TCP'nin moleküler düzeydeki morfolojik yapısını etkileyerek kristalleşmesini bir dereceye kadar önlemiştir. PLA'nın T_m ve T_g değerlerinin daha düşük sıcaklıklara kayması PLA ile TCP arasındaki termodinamik ilginin dikkate değer olduğunu göstermektedir. Tüm bunlara ek olarak ki her örnek tipi için tek bir T_m ve tek bir T_g değeri görülmesi malzemelerin birbiri ile çok iyi karışıp özgün ve homojen bir yapı oluşturmaya kanıt olarak gösterilebilir. Bu bağlar düzeyinde yaşanan enerjik etkileşimin bağlar arası toplam kuvvetleri yenmek için daha az enerji harcanması gerekliliğine sebep olması ve kristalleşmeyi değiştirmesi sebebiyle termal özellikler etkilenmiştir (Bostan ve ark., 2014; Mutlu ve ark., 2016). Bu sonuçlar TCP'nin PLA ile birlikte son derece etkili bir şekilde uyumlu olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

3.6. Doku İskeletlerinin Mekanik Özellikleri

Doku iskeletlerin mekanik özellikleri, onların gerçek anlamda kullanılabilir olmaları için bir başka önemli adımdır. Bu nedenle, onları en yüksek kırılma noktasında tahrip etmek için gerekli olan tam gerilme değeri anlamına gelen basınç dayanımı bir diğer adı ile basma dayanımı önemli bir özelliktir ve her bir doku iskeletinin, doğal dokuların mekanik özelliklerine paralel olarak belirli mekanik uyumluluk seviyelerinde bulunmaları ve uygunluk göstermeleri gerekmektedir.

Üretilen doku iskeletlerinin basma dayanımı 1,2 ile 1,5 MPa arasında ölçülmüş ve bu değerler **Tablo 3.2'**de gösterilmiştir. PLA ve β -TCP kullanılan önceki çalışmalar göstermiştir ki, farklı üretim yöntemiyle düşük gözenekliliğe sahip doku iskeletlerinin basma dayanımı 17,8 – 35,7 MPa arasında raporlanmıştır.

Tablo 3.2. Doku iskeleti örneklerinin mekanik test sonuçları

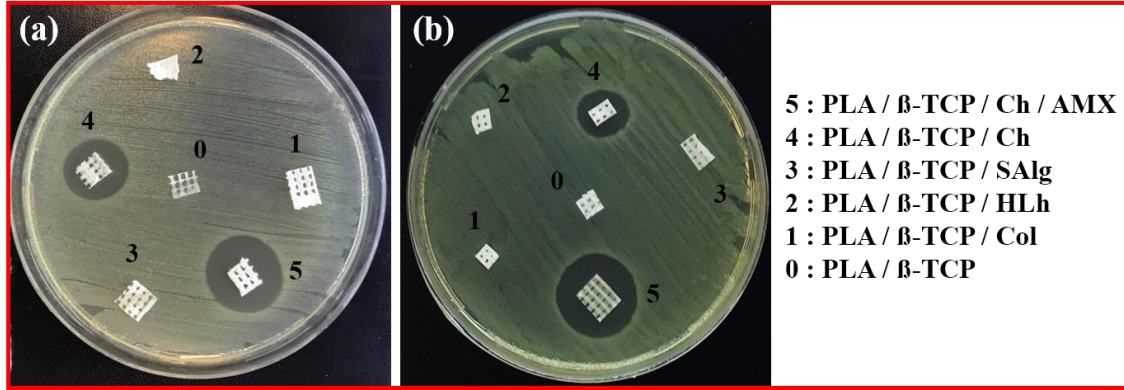
Doku İskeleti Yapısı (% ağırlık oranı)	Basma Dayanımı (MPa)
PLA/β-TCP	1,59 ± 0,43
PLA/β-TCP/Col	1,38± 0,22
PLA/β-TCP/HLh	1,54± 0,25
PLA/β-TCP/SAlg	1,49± 0,75
PLA/β-TCP/Ch	1,29± 0,23
PLA/β-TCP/Ch/AMX	1,24± 0,53

Öte yandan, gözeneklilik artmaya başladığında bu değer önemli ölçüde azalmaya başlamış ve malzemelerin konsantrasyon oranına bağlı olarak 1-3 MPa arasında değişkenlik göstermiştir (Cao ve ark., 2012).

Sonuçlar göstermektedir ki hidrojel varlığında doku iskeletlerinin basma testi sonuçları ufak bir gerileme göstermiştir. Fakat basma testi sonuçlarına asıl etki faktörü gözeneklilik olup literatürdeki diğer gözenekli benzer yapılarda olduğu gibi bir sonuç elde edilmiştir.

3.7. Doku İskeletlerinin Antibakteriyel Özellikleri

Antimikrobiyal aktivitenin ket vurularak engellenmesi, doku iyileşmesini teşvik eden önemli bir faktördür, çünkü patojenlerin istilasının neden olduğu herhangi bir enfeksiyon ilgili dokunun iyileşmesini yavaşlatabilir. Bu sebeple, doku iskeletlerinin antibakteriyel özellikleri, tam bir karşılaştırmalı analiz yapabilmek ve her iki bakteri suşuna karşı etkilerini mukayese edebilmek adına bir gram-negatif bakteri olan *Staphylococcus aureus* ve bir gram pozitif bakteri olan *Escherichia coli* suşları kullanılarak araştırılmıştır. **Şekil 3.6'**de görülmektedir ki, Ch ve Ch/AMX içeren örnekler dışında doku iskeletlerinin antibakteriyel özellik göstermemiştir. Literatür taraması yapıldığında ortaya çıkmaktadır ki üretmiş olduğumuz doku iskeletleri bünyesinde hidrojel yapımında kullanılan malzemeler arasında sadece Ch antibakteriyel etkiye sahip olduğu karışımıza çıkmaktadır (Wu ve ark., 2017).



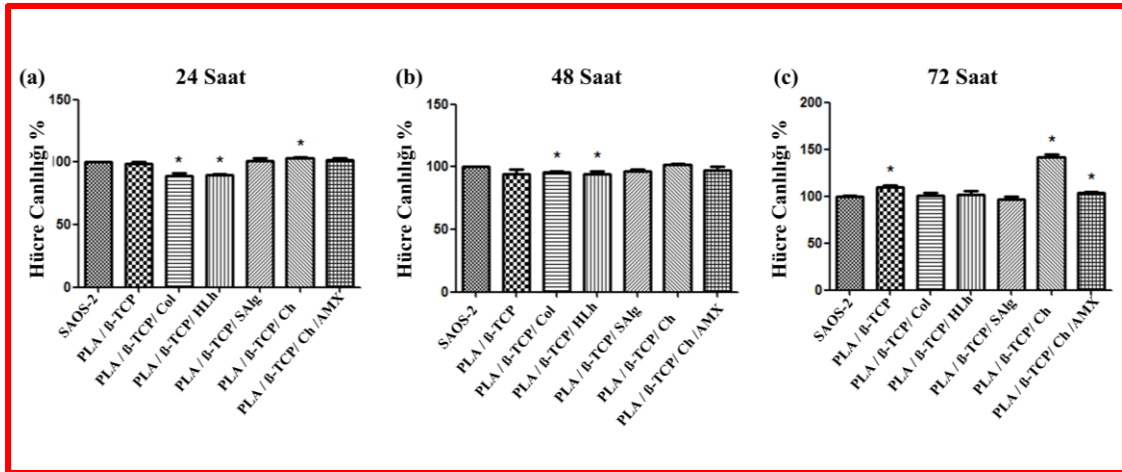
Şekil 3.6. Doku iskeletlerinin agar difüzyon testi sonrası (a) *Escherichia coli* ve (b) *Staphylococcus aureus*' a karşı göstermiş oldukları inhibisyon alanları.

Bu antimikrobiyal etkiyi daha iyi anlamak ve ortaya koymak adına Ch içeren doku iskeletlerinin üretiminde ayrı bir örnek grubu oluşturacak şekilde bir antibiyotik etken maddesi olan AMX kullanılmıştır. PLA/ β -TCP yanında hem Ch hem de AMX'i bünyesinde bulunduran doku iskeletlerinin sadece Ch eklenmiş olanlara kıyasla ne derece başarılı olacağı test edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, **Şekil 3.6a**'da yer alan *Escherichia coli*'ye karşı inhibisyon alanı çaplarının, sırasıyla Ch / AMX ve Ch için yaklaşık 20 mm ve 16 mm olduğu hesaplanmıştır. Gram negatif bakterilerden elde edilen sonuçlara benzer şekilde, bir gram pozitif olan ve **Şekil 3.6b**'de gösterilen *Staphylococcus aureus*'a karşı inhibisyon alanı da sırasıyla Ch / AMX ve Ch için yaklaşık olarak 18 mm ve 11 mm'dir. Sonuçlar göstermektedir ki, AMX kullanımı ile doku iskeletlerinin antibakteriyel özellikleri Ch'a göre hafifçe artmıştır bu sebeple de AMX, hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler üzerinde, Ch'ın sağladığı antibakteriyel etkiyi biraz daha ileriye taşımak için kullanılabilir. Fakat Ch'ın AMX'e göre daha doğal ve yan etkileri olmayan bir malzeme olduğu tartışılmaz bir gerçektir. Gerek antibiyotik direnci kavramı gerek ise canlı hücreleri etkileyebilecek potansiyel olumsuz etkilerin ihtimali sebebiyle antibakteriyel sonuçlar, antimikrobiyal aktiviteye ket vurmak adına kendi içinde değerlendirilebilir fakat doku iskeletlerinin ideallliğini tayin etmede tek başına yeterli olmamaktadır. Bu nedenle hücre kültürlerinin yapılması ve doku iskeletleri üzerinde hücresel davranışların analiz edilmesi büyük önem arz etmektedir.

3.8. Doku İskeletlerinin Hücre Kültürleri

Doku iskeletlerinin uygulanabilirliğinin kanıtlanması adına en önemli ve gerçekçi testlerden biri de doku iskeletleri ve hücreler arasında etkileşimlerin ortaya çıkarıldığı ve biyoyumluluğun belirlendiği hücre kültürü çalışmalarıdır. Biyoyumluluk, doku iskeletlerinin doku iyileşmesine ne derece katkıda bulunabileceğini sınırlandıran bir kavramdır. Bu yüzden, üretilen doku iskeletlerinin toksik etkisinin olmaması, üzerlerinde hücre çoğalması ve tutunumunun başarılı olabilmesi, hücre farklılaşması gibi belirli faktörlerin izlenebilmesi gibi biyoyumluluğun vazgeçilmez belirtileri olan fizyolojik davranışların izlenmesi doku iskeletlerinin başarısı açısından oldukça önemlidir (Altun ve ark., 2018).

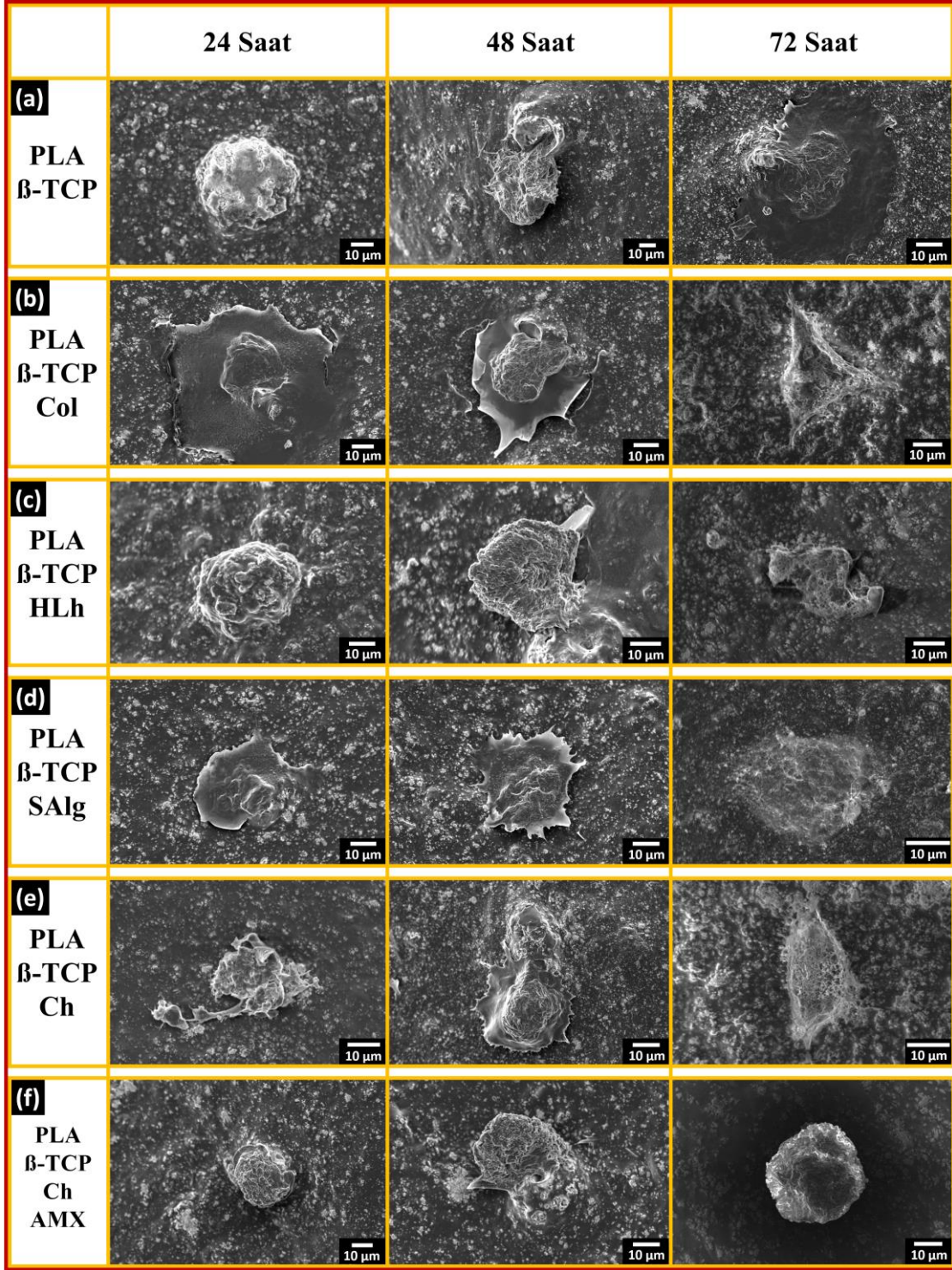
Sitotoksikite testleri (MTT) ortaya koymuştur ki, doku iskeletleri kesinlikle toksik bir etki göstermemiş ve hücreler ile olan ilişkileri iyi ve umut vericidir ve bu sonuçlar **Şekil 3.7**'de gösterilmiştir. Tüm doku iskeletleri büyük oranda PLA/β-TCP'den oluştuğu için ve farklı doku iskeletleri arasında bu farkı oluşturan kavram farklı hidrojel kaynaklı yapıları olduğundan örnekler arası farklı biyoyumluluk değerlerinin sebebi olarak da bu hidrojel tiplerinin farklılığı gösterilebilir. Yapılan testler doğrultusunda hücre canlılığı 3 ardışık gün arasında her gün bir kez incelenmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. Testlerin başlaması ardından 24. saatte alınan sonuçlar **Şekil 3.7a**'da 48. saatte alınan sonuçlar **Şekil 3.7b**'de ve 72. saat sonunda gözlemlenen hücre canlılığı ise **Şekil 3.7c**'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Doku iskeletlerinin hücre canlılığı testi (a) 24 saat, (b) 48 saat ve (c) 72 saat sonuçları.

Tüm örnekler arasında, en yüksek hücresel metabolik aktivite en yüksek hücre tutunumu anlamına gelecek şekilde Ch içeren örneklerde saptanmış ve bunu HLh içeren örnekler takip etmiştir. Altının çizilmesi gereken bir diğer önemli gerçek ise, içinde herhangi bir hidrojel içeriğe sahip olmayan PLA / β -TCP içeren örneklerin hücre tutunum oranıdır. Bu iskeletler, hücrelerin doku iskeletleri olmadan kendi başlarına çoğaldığı kontrol grubuna kıyasla % 5 ila % 10 gibi düşük bir hücre değeri sahibi olduğu dikkat çekmiştir. Bu durum, hidrojellerin ve onların oluşumunda kullanılan Col, HLh, SAlg e Ch gibi malzemelerin doku iskeletlerinde yer almasının biyoyumluluğu arttırdığını ve bu sayede hücre tutunumunun yükseldiğini göstermektedir. Ancak, Ch içeren örnekler bununla da sınırlı kalmamış, sadece iyi bir hücre tutunumu göstermek yanında ek olarak iyi de bir çoğalma davranışı sergilemişler ve % 150 hücre canlılığı oranına kadar çıkarak diğer örneklerle göre çok üstün bir farklılık ortaya koymuşlardır. Ch yanına AMX eklenmesi ise bu hücre canlılığını % 40 oranında düşürmüştür. Sonuçlar göstermiştir ki, üretilen doku iskeletleri oldukça biyoyumludur.

Ek olarak hücre tutunmaları taramalı elektron mikroskobu yardımı ile incelenmiş ve sonuçlar **Şekil 3.8**'de gösterilmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik hücre ortamında inkübasyon periyotları ardından doku iskeletleri incelenmiştir ve doku iskeletleri üzerinde hücre tutunumu fotoğraflanmıştır. 24 saat sonra yapılan incelemeler, genç hücreler, çoğunlukla iskeletlerin yüzeyinde yer almakla beraber dairesel şekillere sahip olduğunu göstermişlerdir. Yüzeyde bulunmalarına rağmen tutunmalarını sağlayan herhangi bir ekstra detaya rastlanmamıştır. Bunun sebebi 24 saatlik bir sürecin güçlü bir hücre tutunumuna olanak sağlayacak kadar yeterli olmaması olabilir. Fakat 48. Saatte görülmüştür ki, hücreler doku iskeletleri ile olan temas yüzeylerini arttırmış ve sahip oldukları uzantılar ile doku iskeleti üzerinde büyümüşlerdir. 72. Saat sonunda görülmüştür ki, doku iskeletleri daha hücreler ile bezenmiş bu hücreler artan boylarının yanı sıra geliştirdikleri birçok uzantı ile yüzeye tutunmakla kalmayıp iskelet boyunca içlere doğru gömülerek çok iyi ve örnek teşkil edecek kadar yüksek biyoyumluluk sinyalleri vermişlerdir.



Şekil 3.8. Farklı hidrojel içeriğine sahip PLA / β-TCP doku iskeleti numunelerinin 24,48 ve 72 saatlik hücre testleri ardından taramalı elektron mikroskobu görüntülerinin (a) hidrojel olmaksızın (b) Col, (c) HLh, (d) SAlg, (e) Ch, (f) Ch / AMX inkübasyon süresinden sonra 24, 48 ve 72 saat.

Bu sonuçlar MTT sonuçlarını destekleyecek yönde olup, hücre tutunması ve çoğalması gibi hücresel davranışlar bütünü gibi pozitif biyouyumluluk sinyalleri Ch içeren örneklerde en yüksek seviyede gözlemlenmiştir. AMX eklenmesi ise bu özellikleri olumsuz yönde etkilemiştir. Bu yüzden, açıkça söylenebilir ki, Ch'nin doku iskeleti yapısına eklenmesi, hücresel davranışı diğer malzemelere göre önemli ölçüde olumlu etkilemiştir. Fakat AMX varlığında bu hücresel tepkiler azaldığından bu ve bunun gibi antibiyotiklerin kullanılmadan önce doku iskeletlerin amaçları ve kullanım alanlarına bağlı olarak dikkatle düşünülmesi ve artıları ve eksilerinin masaya yatırılıp karar verilmesi gerektiğini göstermektedir.



4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, 3B biyo baskı yöntemleri kullanılarak PLA / β -TCP tabanlı ve hidrojel katkılı doku iskeletleri üretilmiştir. DM alanında kullanılmak üzere üretilen bu doku iskeletlerinin, morfolojik, mekanik, kimyasal, termal ve antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra kapsamlı bir şekilde hücresel davranış üzerindeki etkileri test edilmiştir.

Diğer malzeme tiplerine kıyasla Ch içeren doku iskeletleri, iskelet morfolojisi ve hücre canlılığı açısından en iyi sonuçları ortaya koymuştur. Antibakteriyel özelliklerin incelenmesinde amoksisilin malzemesi de doku iskeletlerine başarıyla eklenmiş ve antimikrobiyal özellikler Ch içeren örneklerle kıyasla arttırılmıştır, fakat hücre canlılığı konusunda Ch içeren örneklerle kıyasla elde edilen canlılık değerleri biraz sönük kalmıştır.

Sonuç olarak, tüm elde edilen bilgiler ışığında ortaya çıkmıştır ki, doku iskeleti üretimi için en uygun ve başarılı malzeme kombinasyonu PLA / β -TCP / Ch olarak yorumlanabilmektedir. Gözlemlenen, dikkate değer hücre canlılığı ve güçlü mekanik ve morfolojik özellikler gibi üstün nitelikleri bu çıkarımların dayanağıdır. Üretilmiş olan doku iskeletleri DM çalışmalarında kullanılmak üzere umut verici ve gelecek vaat eden malzemeler olarak göze çarpmaktadır.

Çalışmanın bir sonraki adımı olarak eklenen katman sayısının artması ile doku iskeletlerinin kalınlığı değişimi ve özel hedef dokulara göre doku iskeletlerinin şekillerinin çeşitlendirilmesi olasılıkları ön plana çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

- Alberti, K. A., Xu, Q. (2016) Biocompatibility and degradation of tendon-derived scaffolds. *Regenerative Biomaterials*, 3(1), 1–11.
- Ali, D., Sen, S., (2017) Finite Element Analysis of Mechanical Behavior, Permeability and Fluid Induced Wall Shear Stress of High Porosity Scaffolds with Gyroid and Lattice-Based Architectures, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 75:262-270.
- Altun, E. Aydogdu, M. O., Koc, F., Kutlu, O., Gozuacik, D., Yucel, S., Gunduz, O. (2018) Amoxicillin Loaded Hollow Microparticles in the Treatment of Osteomyelitis Disease Using Single-Nozzle Electrospinning. 8(3), 790-801.
- Altun, E., Aydogdu, M. O., Koc, F., Crabbe-Mann, M., Brako, F., Kaur-Matharu, R., Ozen, G., Erdem Kuruca, S., Edirisinghe, U., Gunduz, O., Edirisinghe, M. (2018) Novel Making of Bacterial Cellulose Blended Polymeric Fiber Bandages. *Macromolecular Materials and Engineering*, 303, 1700607.
- An, J., Teoh, J.E.M., Suntornnond, R., Chua, C.K. (2015) Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues, *Engineering*, 1(2), 261–268.
- Atala, A. (2000) Tissue engineering for bladder substitution. *World Journal of Urology*, 18, 364-370.
- August, A. D., Kong, H. J., Mooney, D. J. (2006) Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6(8), 623–633.
- Aydogdu, M.O., Chou, J., Altun, E., Ekren, N., Cakmak, S., Eroglu, M., Osman, A.A., Kutlu, O., Oner, E.T., Avsar, G., Oktar, F.N., Yilmaz, I., Gunduz, O. (2018a) Production of the biomimetic small diameter blood vessels for cardiovascular tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-13.
- Aydogdu, M.O., Ekren, N., Kilic, O., Oktar, F.N., Gunduz, O. (2018b) 3D Liquid Bioprinting of the PCL / β -TCP Scaffolds. *Materials Science Forum*, 923, 79-83.
- Bashir, S., Teo, Y. Y., Naeem, S., Ramesh, S., Ramesh, K. (2017) pH responsive N-succinyl chitosan/Poly (acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels and in vitro release of 5-fluorouracil. *PLOS ONE* 12(7), e0179250.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., Gurny, R. (2004) Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19-34.

Boland, T., Xu, T., Damon, B., Cui X. (2006) Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnology Journal*, 1, 910-917.

Böttcher-Haberzeth, S., Biedermann, T., Reichmann E. (2010) Tissue engineering of skin. *Burns*, 36(4), 450-460.

Cao, L., Duan, P-G., Wang, H-R., Li, X.L., Yuan, F.L., Fan, Z.Y., Li, S-M., Dong, J. (2012). Degradation and osteogenic potential of a novel poly(lactic acid)/nano-sized β -tricalcium phosphate scaffold. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5881–5888.

Chan, B.P., Leong, K.W. (2008) Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 17(4), 467-479.

Charles-Harris, M., Koch, M. A., Navarro, M., Lacroix, D., Engel, E., Planell, J. A. A. (2008) A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering: an in vitro study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(4), 1503-1513.

Chen, C. C., Chueh, J. Y., Tseng, H., Huang, H. M., Lee, S. Y. (2003) Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. *Biomaterials*, 24,1167-1173.

Chen, T., Hilton, M.J., Brown, E.B., Zuscik M.J., Awad, H.A. (2013) Engineering superficial zone features in tissue engineered cartilage. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(5),1476-1486.

Chopra, P.M., Johnson, M., Nagy, T.R., Lemons, J.E. (2009) Micro-computed tomographic analysis of bone healing subsequent to graft placement. *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials*, 88 (2), 611-618.

Costantini, M., Barbetta, A. (2018) *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*, 6, Woodhead Publishing.

Cui, X., Breitenkamp, K., Finn, M.G., Lotz, M., D'Lima D.D. (2012) Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Engineering Part A* 18, 1304-1312.

Dee, K.C., Pulelo, D.A., Bizios R. (2002) *An introduction to tissue biomaterial interactions*. NJ: Wiley-Liss Publications, Hoboken.

Díaz, E., Sandonis, I., Valle, M. B. (2014). In Vitro Degradation of Poly(caprolactone)/nHA Composites. *Journal of Nanomaterials*, 802435,1-8.

Fedorovich, N.E., Alblas, J., Wijn, J.R., Hennink, W.E., Verbout, A.J., Dhert, W.J. (2007) Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and

novel application in organ printing. *Tissue Engineering*, 13,1905–1925.

Fratzl, P. (2008) *Collagen: Structure and Mechanics*, Springer, New York.

Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed. M., Nasr-Esfahani, M. H., Ramakrishna, S. Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, 29(34):4532-4539.

Girlanda, R. (2016) Deceased organ donation for transplantation: Challenges and opportunities. *World Journal of W J T Transplantation*, 6(3),451-459.

Gombotz, W.R., Wee, S. F. (1998) Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 267–285.

Green, W.T., Jr Martin, G.W., Eanes, E.D., Sokoloff, L. (1970) Microradiographic study of the calcified layer of articular cartilage. *Archives of Pathology*, 90(2),151-158.

Groll, J., Boland, T., Blunk, T., Burdick, J.A., Cho, D.W., Dalton, P.D., Derby, B., Forgacs, G., Li, Q., Mironov, V.A., Moroni, L., Nakamura, M., Shu, W., Takeuchi, S., Vozzi, G., Woodfield, T.B., Xu, T., Yoo, J.J., Malda, J. (2016) Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication*, 8(1), 013001.

Guillotin, B., Souquet, A., Catros, S., Duocastella, M., Pippenger, B., Bellance, S., Bareille, R., Rémy, M., Bordenave, L., Amédée, J., Guillemot, F. (2010) Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*, 31(28), 7250- 7256.

Guntillake, P.A., Adhikari, R. (2003) Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*, 5, 1–16.

Hollinger, J. O. (2011) *An Introduction to Biomaterial*, ikinci basım, CRC Press, Taylor & Francis Group.

Holzwarth, J.M., Ma, P.X. (2011) Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 32(36), 9622-9629.

Hon, K.K.B., Li, L., Hutchings, I.M. (2008) Direct writing technology— advances and developments. *CIRP, The International Academy for Production Engineering*, 57:601-620.

Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Lam, C. X. F., Tan, K. C., Lim, T. C. J. (2007) State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, 1(4),245-260.

Intranuovo, I., Gristina, R., Brun, F., Mohammadi, S., Ceccone, G., Sardella, E., Rossi,

F., Tromba, G., Favia, P. (2013) Plasma modification of PCL porous scaffolds fabricated by solvent-casting/particulate-leaching for tissue engineering. *Plasma processes and polymers*, 11(2), 184–195.

Karageorgiou, V., Kaplan, D. (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491.

Kucharczyk, P., Pavelková, A., Stloukal, P., Sedlářík, V. (2016) Degradation behaviour of PLA-based polyesterurethanes under abiotic and biotic environments. *Polymer Degradation and Stability*, 129, 222-230.

Küçükaşık, F., Kazak, H., Güney, D., Finore, I., Poli, A., Yenigün, O., Nicolaus, B., Toksoy Öner E. (2011) Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(6), 1729-1740.

Kulseng, B., Skjåk-Braek, G., Ryan, L., Andersson, A., King, A., Faxvaag, A., Espevik, T. (1999) Transplantation of alginate microcapsules: generation of antibodies against alginates and encapsulated porcine islet-like cell clusters. *Transplantation*, 67(7), 978-984.

Kundu, B., Kundu, S. C. (2012) Silk sericin/polyacrylamide in situ forming hydrogels for dermal reconstruction. *Biomaterials*, 33(30), 7456-7467.

Langer, R, Vacanti, J.P., (1993) Tissue Engineering. *Science*, 260,920-926.

Leone, G., Torricelli, P., Chiumiento, A., Facchini, A., Barbucci, R. (2008) Amidic alginate hydrogel for nucleus pulposus replacement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84(2), 391-340.

Li, X, Liu, H., Niu, X., Fan, Y., Feng, Q., Cui, F.Z., Watari, F. (2011a) Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells induced by osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials*, 97(1),10-9.

Li, J., Zheng, W., Zheng. Y, Lou, X. (2011b) Cell responses and hemocompatibility of g-HA/PLA composites. *Science China Life Sciences*, 54, 366–371.

Malda, J., Visser, J., Melchels, F.P., Jüngst, T., Hennink, W.E., Dhert, W.J., Groll, J., Hutmacher, D.W. (2013) 25th Anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Advance Materials*, 25(36), 5011–5028.

Manandhar, S., Vidhate, S., D’Souza, N. (2009) Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 794-798.

- Melchels, F. P. W., Tonnarelli, B., Olivares, A. L., Martin, I., Lacroix, D., Feijen, J., Wendt, D. J., Grijpma, D. W. (2011) The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding. *Biomaterials*, 32(11), 2878-2884.
- Mironov, V. (2003) Printing technology to produce living tissue. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3, 701-704.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods* 65(1-2), 55-63.
- Murphy, S.V., Atala. A. (2014) 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32, 773-785.
- Mutlu, E. C., Bostan, M. S., Bahadori, F., Kocyigit, A., Toksoy Oner, E., Eroglu, M. S. (2016) Lecithin-acrylamido-2-methylpropane sulfonate based crosslinked phospholipid nanoparticles as drug carrier. *Journal of Applied Polymer Science*, 44105.
- Nazarov, R., Jin, H.J., Kaplan D.L. (2004) Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules*, 5(3), 718-726.
- Nolte, S.V., Xu, W., Rennekampff, H.O., Rodemann, H.P. (2008) Diversity of fibroblasts--a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 187, 165-176.
- Ozak, S.T., Ozkan, P. (2013) Nanotechnology and dentistry, *European journal of dentistry*, 7(1), 145-151.
- Patel, D. M., Patel, D. K., Patel, C. N. (2011) Formulation and evaluation of floating oral in situ gelling system of amoxicillin. Cairo: International Scholarly Research Network, 1–8.
- Pattanashetti, N.A., Heggannavar, G.B., Kariduraganavar, M. Y. (2017) Smart Biopolymers and their Biomedical Applications. *Procedia Manufacturing*, 12, 263-279.
- Peltola, S.M., Melchels, F.P.W., Grijpma D.W., Kellomaki M. (2008) A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of Medicine*, 40, 268–280.
- Pereira, R., Tojeira, A., Vaz, D. C., Mendes, A., Bártolo P. (2011) Preparation and Characterization of Films Based on Alginate and Aloe Vera. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 16(7), 449-464.

Porter, J.R., Ruckh, T.T., Popat, K.C. (2009) Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress*, 25, 1539-1560.

Rasal, R.M., Janorkar, A.V., Hirt, D.E. (2009) Poly (lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*. 89, 252–263.

Rowe, R.C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. (2009) "Adipic Acid", *Handbook of Pharmaceutical Excipients APhA/Pharmaceutical Press*, London ; Chicago.

Sankalia, M. G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M., Sutariya, V. B. (2007) Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(2), 215-232.

Sennaroglu Bostan, M., Canseven Mutlu, E., Kazak, H., Keskin, S. S., Toksoy Oner, E., Eroglu, S. M. (2014) Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films. *Carbohydrate Polymers*, 102, 993–1000.

Shim, J.H., Won, J.Y., Park, J.H., Bae, J.H., Ahn, G., Kim, C.H., Lim, D.H., Cho, D.W., Yun, W.S., Bae, E.B., Jeong, C.M., Huh, J.B. (2017) Effects of 3D-Printed Polycaprolactone/ β -Tricalcium Phosphate Membranes on Guided Bone Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 899.

Sittinger, M., Bujia, J., Minuth, W.W., Hammer, C., Burmester, G.R. (1994) Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials*, 15, 451-456.

Sofokleous, P., Stride, E., Edirisinghe, M. (2013) Preparation, Characterization, and Release of Amoxicillin from Electrospun Fibrous Wound Dressing Patches. *Pharmaceutical Research*, 30(7), 1926–1938.

Suganuma, J, Alexander H. (2001) Biological response of intramedullary bone to poly-L-lactic acid. *J Appl Biomater*. 165:2091–2095.

Tasoglu S., Demirci U. (2013) Bioprinting for stem cell research. *Trends in Biotechnology*, 31(1), 10-19.

Tavares, D. S., Castro, L. O, Soares, G. D. A, Alves, G. G., Granjeiro, J. M. (2013) Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β -tricalcium phosphate. *Journal of Applied Oral Sciences* 21(7), 37-42.

Vidal, Bde. C., Mello M. L. (2011) Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 42(3), 283-289.

- Wagoner Johnson, A.J., Herschler, B.A. (2011) A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomaterialia*, 7(1),16-30.
- Wang, S., Wang, Z., Foo, S. E., Tan, N. S., Yuan, Y., Lin, W., & Ng, K. W. (2015). Culturing fibroblasts in 3D human hair keratin hydrogels. *ACS Applied Material Interfaces*, 7(9), 5187-5198.
- Wei, X. P., Luo, Y. L., Xu, F., Chen, Y. S. (2016) Sensitive conductive polymer composites based on polylactic acid filled with multiwalled carbon nanotubes for chemical vapour sensing. *Synthetic. Met*, 215, 216-222.
- Williams D. F. J. (1987) Definitions in biomaterials: In *Proceedings of a Consensus Conference of the European Society of Biomaterials*. Elsevier, Chester.
- Wu, Q., Maire, M., Lerouge, S., Therriault, D., Heuzey, M-C. (2017) 3D Printing of Microstructured and Stretchable Chitosan Hydrogel for Guided Cell Growth. *Advanced Biosystems*, 1, 1700058.
- Wu, S., Liu, X., Yeung, K.W.K., Liu, C.S., Yang, X.J. (2014) Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 80, 1-36.

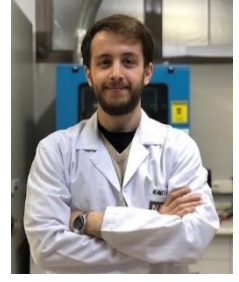
ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: MEHMET ONUR AYDOĞDU

Doğum Tarihi: 13.07.1991

Doğum Yeri: İstanbul

E-postası: aydogdumonur@gmail.com



Bildiği Yabancı Diller (Puan ve Yılı): İngilizce (IELTS = 7; 2018; YDS: 83,75;2016)

Aldığı Sertifikalar: Marmara Üniversitesi tarafından verilen İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Sertifikası (2018 Mayıs); Zeiss firması tarafından verilen Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Operatör Sertifikası (2017 Eylül); Jasco firması tarafından verilen Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) Kullanıcı Sertifikası (2017 Ekim); Endnote Bibliyografi Program Eğitimi, katılım sertifikası (2016 Şubat); İyi Üretim Uygulamaları (GMP), İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP), İyi Hijyen Uygulamaları (GHP) sertifikaları, IEMA, (2014 Eylül).

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2014

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Lisansüstü Araştırmacı	University College London, Londra	2017-2018
Proje Asistanı	Biyomedikal Görüntüleme ve Tanı sistemleri Geliştirme Laboratuvarı, Marmara Üniversitesi	2016-2018
Asistan Öğrenci	Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi	2016-2018

Ödüller: Macromolecular Materials and Engineering dergisi 2018 Mart sayısı, kapak fotoğrafı ödülü (2018); Biomaterials kongresi, poster ödülü, Londra (2016)

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

A1. Aydogdu Mehmet Onur, Ekren N., Suleymanoglu M., Erdem-Kuruca S., Lin C-C., Erdol MN, Oktar FN., Terzi UK., Kilic O., Gunduz O., (2018). Novel electrospun polycaprolactone/graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposites for biomedical applications.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 172, 718-727.

A2. Altun E., **Aydogdu Mehmet Onur**, Koc F., Kutlu O., Gozuacik D., Yucel S., Gunduz O. (2018). Amoxicillin Loaded Hollow Microparticles in the Treatment of Osteomyelitis Disease Using Single-Nozzle Electrospinning. *BioNanoScience*, 1-12.

A3. Cetin, G., Catalgol, Z., **Aydogdu Mehmet Onur**, Altun, E., Koc, F., Lin, CC., Sengil, AZ., Gunduz., O. (2018). A novel antibacterial nanofibers mat made of co-axial electrospun polycaprolactone / silver nitrate / zinc oxide composites. *Nano-Bio-Materials and Devices*, 2(2), 275-286.

A4. **Aydogdu Mehmet Onur**, Altun E., Crabbe-Mann M., Brako F., Koc F., Ozen G., Kuruca S.E., Edirisinghe U., Luo C.J., Gunduz O., Edirisinghe M. (2018). Cellular interactions with bacterial cellulose: Polycaprolactone nanofibrous scaffolds produced by a portable electrohydrodynamic gun for pointof- need wound dressing, *International Wound Journal*, 1-9.

A5. **Aydogdu Mehmet Onur**, Chou J., Altun E., Ekren N., Cakmak S., Eroglu M., Osman A., Kutlu O., Oner ET., Avsar G., Oktar F.N., Yilmaz I., Gunduz O. (2018). Production of the biomimetic small diameter blood vessels for cardiovascular tissue engineering, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-13.

A6. Altun E., **Aydogdu Mehmet Onur**, Koc F., Crabbe-Mann M., Brako F., Kaur-Matharu R., Ozen G., Kuruca SE., Edirisinghe U., Gunduz O., Edirisinghe M. (2018). Novel Making of Bacterial Cellulose Blended Polymeric Fiber Bandages, *Macromolecular Materials and Engineering*.

A7. **Aydogdu Mehmet Onur**, Ekren N., Kilic O., Oktar FN., Gunduz O. (2017). 3D Liquid Bioprinting of the PCL / β -TCP Scaffolds, *Mater. Sci. Forum*.

A8. **Aydogdu Mehmet Onur**, Oprea A.E., Trusca R., Surdu A.V., Fikai A., Holban A.M., Iordache F., Paduraru A.V., Filip D.G., Altun Esra, Ekren N., Oktar F.N., Gunduz O. (2017). Production and Characterization of Antimicrobial Electrospun Nanofibers Containing Polyurethane, Zirconium Oxide and Zeolite, *BioNanoScience*, 8(1), 154-165.

A9. Bozkurt Y., Sahin A., Sunulu A., **Aydogdu Mehmet Onur**, Altun E., Oktar F.N., Ekren N, Gunduz O. (2017). Electrospun Nanocomposite Materials, A Novel Synergy of

Polyurethane and Bovine Derived Hydroxyapatite, J. Phys. Conf. 829(1), 012015.

A10. Inan AT., Komur B., Ekren N., **Aydogdu Mehmet Onur**, Gokce H., Fikai A., Salman S., Oktar FN., Gunduz O. (2017). Physical Characterization of Turbot (Psetta Maxima) Originated Natural Hydroxyapatite, Acta Physica Polonica A. 131(3), 397-399.

A11. Komur B., Altun Esra, **Aydogdu Mehmet Onur**, Bilgic D., Gokce H., Ekren N., Salman S., Inan A.T., Oktar F.N., Gunduz O. (2017). Hydroxyapatite Synthesis from Fish Bones: Atlantic Salmon (Salmon Salar), Acta Physica Polonica A. 131(3), 400-402.

A12. Komur B., Lohse T., Can HM., Khalilova G., Geçimli ZN., **Aydogdu Mehmet Onur**, Kalkandelen C., Stan GE., Sahin YM., Sengil AZ., Suleymanoglu M., Kuruca SE., Oktar FN., Salman S., Ekren N., Fikai A., Gunduz O. (2016). Fabrication of naturel pumice/hydroxyapatite composite for biomedical engineering, Biomedical engineering online. 15(1), 81.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

B1. Ozen S., **Aydogdu Mehmet Onur**, Ege ZR., ve ark., (2018). Sözlü Sunum. Production of the GO-doped PLA-based nanofibers and investigation of their electrical properties. 4th International Society for Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials (ISBPPB 2018), Krakov, Polonya.

B2. **Aydogdu Mehmet Onur**, Ekren N., Oktar FN., ve ark., (2018). Sözlü Sunum. Polycaprolactone/ Beta Tricalcium Phosphate / Collagen as a 3D Printed Tissue Scaffold. 4th International Society for Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials (ISBPPB 2018), Krakov, Polonya.

B3. Inan AT., Ege ZR., **Aydogdu Mehmet Onur**, ve ark., (2017) Sözlü Sunum. Production of Pla-Bovine Hydroxyapatite-Graphene Oxide Composite Manofiber by Coaxial Electrospinning Method. International Conference on Intelligent Textiles and Mass Customisation (ITMC 2017), Gent, Belçika.

B4. **Aydogdu Mehmet Onur**, Ekren N., Kilic O., ve ark., (2017). Sözlü Sunum. 3D Liquid Bioprinting of the PCL / β -TCP Scaffolds. 2nd International Conference on Frontiers of Composite Materials (ICFCM 2017), Melbourne, Avustralya.

B5. Aydogdu Mehmet Onur, Cetin G., Altun E., ve ark., (2017). Poster Sunumu. Production of the PCL/Zinc Oxide/Silver Nitrate Nanofibrous Scaffolds with Enhanced Antimicrobial Activity Using Co-Axial Electrospinning Method. 13th International Conference on Materials Chemistry (MC 13), Liverpool, Birleşik Krallık.

B6. Gunduz O., Aydogdu Mehmet Onur, Ekren N., ve ark., (2017). Poster Sunumu. Novel Electrospun Polycaprolactone/Graphene Oxide/Fe₃O₄ Nanocomposites for Biomedical Applications. 13th International Conference on Materials Chemistry (MC 13), Liverpool, Birleşik Krallık.

B7. Oktar FN., Gokce H., Yetmez M., Aydogdu Mehmet Onur ve ark., (2017). Poster Sunumu. Microstructural and Mechanical Properties of Nano-Titanium-Oxide Doped Hydroxyapatite Composites. 29th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine, (Bioceramics28), Toulouse, Fransa.

B8. Aydogdu Mehmet Onur, Altun E., Ekren N., ve ark., (2016). Sözlü Sunum. Electrospun Polycaprolactone (PCL)/Ethyl Cellulose (EC)/Collagen Nanofibrous Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering. 16th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME 16), Singapur.

B9. Bozkurt Y., Sunulu A., Aydogdu Mehmet Onur, ve ark.,(2016). Poster Sunumu. Electrospun Nanocomposite Materials, A Novel Synergy of Polyurethane and Bovine Derived Hydroxyapatite. Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference (ANNIC 2016), Barcelona, İspanya.

B10. Aydogdu Mehmet Onur, Oprea EA., Paduraru EA. ve ark., (2016). Sözlü Sunum. Novel Production of ZrO₂/PU Nanocomposites via Electrospinning for Soft Tissue Engineering. 28th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics28), Charlotte, ABD.

B11. Aydogdu Mehmet Onur., Altun, E., Gunduz O., (2016). Poster Sunumu. Production of the Polyurethane/ Zeolite Nanocomposites with Electrospinning Method for Biomedical Engineering Applications. Annual Conference & Expo on Biomaterials (Biomaterials 2016), Londra, Birleşik Krallık.

B12. Altun E, **Aydogdu Mehmet Onur**, Ekren N., ve ark., (2016). Sözlü Sunum. Production of the new bioinspired neuroregeneration structure. Annual Conference & Expo on Biomaterials (Biomaterials 2016) Londra, Birleşik Krallık.

C. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

C1. Komur B., Altun E., **Aydogdu Mehmet Onur**., ve ark., (2016). Sözlü Sunum. Hydroxyapatite Synthesis from Fish Scale: Atlantic Salmon (*Salmo salar*). 6th International Advances in Applied Physics and Material Science Congress & Exhibition (APMAS 2016), İstanbul, Türkiye.

C3. **Aydogdu Mehmet Onur**, ve ark., (2016). Poster Sunumu. Production of novel bioceramic HA biomaterials from natural sources, 8th International Biomechanics Congress, Ankara, Türkiye.

C4. Altun E., **Aydogdu Mehmet Onur**, Gunduz O., ve ark., (2015). Poster Sunumu. Novel Study: The Mechanical Properties of Marine Sources Derived Hydroxyapatite(HAp)-Polycaprolactone(PCL) Biocomposites. 1st International Pharmacogenomics Istanbul, İstanbul, Türkiye.

D. Sanat ve tasarım etkinlikleri:

D1. **Aydogdu Mehmet Onur**, Altun E., Ekren N., ve ark., (2017). Poster Presentation. Smart Food Packaging, “What should I cook today? 5th International Food R&D Brokerage Event, İzmir, Türkiye.

D2. Altun E, **Aydogdu Mehmet Onur**, Ekren N., ve ark., (2017). Poster Sunumu. Antidiabetic and Antioxidant Chocolate from Mulberry Tree Leaf. 5th International Food R&D Brokerage Event, İzmir, Türkiye.

D2. Altun E., **Aydogdu Mehmet Onur**, Togay S.O., Salman S., ve ark., (2016) Poster Sunumu. Nanocapsule Chocolate with Vitamins and Minerals, 4th International Food R&D Brokerage Event, İzmir, Türkiye.

D3. Altun E., **Aydogdu Mehmet Onur**, Gunduz O., ve ark., (2016). Poster Sunumu. Nanobiotextile Production from Bacterial Cellulose Beside of the Cotton Source Cellulose, UTIB 8th R&D Project Brookerage Event, Bursa, Türkiye.