

**ORGANİK ESASLI KOMPOZİTLERİN 3 BOYUTLU YAZICI İLE
ŞEKİLLENDİRİLMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aykut ERDOĞAN

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nuran AY

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Haziran 2021



ÖZET
ORGANİK ESASLI KOMPOZİTLERİN 3 BOYUTLU YAZICI İLE
ŞEKİLLENDİRİLMESİNİN ARAŞTIRILMASI

Aykut ERDOĞAN

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 2021

Danışman: Prof. Dr. Nuran AY

Hekzagonal bor nitrür'ün (hBN) biyoinert, biyouyumlu, düşük sürtünme kat sayısı ve ısıyı homojen dağıtma özelliklerinden faydalanılarak yüksek viskoziteli biyomürekkeplerin basım kalitesini artırabileceği ön görülmüştür. 3 boyutlu biyoyazıcılarda ve biyomürekkep çeşitliliğinde hBN nanopartikülleri kullanılarak sınırlamaların elimine edilmesi amaçlanmıştır. İyonik olarak bağlı jelatin-kitosan biyomürekkeplerine hBN nanopartikülleri ilave edilerek viskozite değişimleri incelenmiştir ve basılabilirlik değerlendirmesi yapılmıştır. Yüksek viskoziteli biyomürekkeplerin basılabilirlik özelliklerini iyileştirdiği belirlenmiştir. Basılan doku iskeleleri iyonik veya kimyasal çapraz bağlı olarak biyomalzeme halinde kullanılabilirliğini değerlendirmek için kimyasal (FTIR, DSC, XRD), fiziksel (biyobozunurluk, yüzey temas açısı, su tutma kapasitesi) ve biyolojik (biyoyumluluk) testleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan hBN nanopartiküllerinin katkılı biyomürekkeplerin ekstrüzyon temelli biyoyazıcıların dezavantajını azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca doku mühendisliği alanında kompozit biyomalzeme geliştirirken hBN nanopartiküllerinin üstün özelliklerinden faydalanılabileceği ortaya çıkmıştır.

Anahtar Sözcükler: Doku mühendisliği, Ekstrüzyon temelli biyoyazıcı, Hekzagonal bor nitrür, Basılabilirlik, Biyomürekkepler.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF FORMING ORGANIC BASED COMPOSITES WITH 3D PRINTER

Aykut ERDOĞAN

Department of Advanced Technology

Programme in Biotechnology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, June 2021

Supervisor: Prof. Dr. Nuran AY

According to the studies, it has been predicted that hexagonal boron nitride (hBN) can improve the printing quality of high-viscosity bioinks by making use of its bioinert, biocompatible, low coefficient of friction, and heat-homogeneous properties. It is aimed to eliminate the limitations by using hBN nanoparticles in 3D bioprinters and bioink variety. Viscosity changes were investigated by adding hBN nanoparticles to ionically bonded gelatin-chitosan bioinks, and printability was evaluated. It has been determined that high viscosity bioinks improve printability properties. Chemical (FTIR, DSC, XRD), physical (biodegradability, surface contact angle, water holding capacity), and biological (biocompatibility) tests were examined to evaluate the usability of the printed scaffolds as biomaterials with ionic or chemical cross-linking. Based on these results, it was determined that hBN nanoparticles included bioinks reduce the disadvantage of extrusion-based bioprinters. In addition, it has been determined that the superior properties of hBN nanoparticles can be utilized while developing composite biomaterials in the field of tissue engineering.

Keywords: Tissue engineering, Extrusion-based bioprinter, Hexagonal Boron nitride, Printability, Bioinks.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda tüm bilgi birikimini, tecrübelerini, emeğini ve güler yüzlülüğünü esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Nuran AY'a,

Tezimde katkılarından dolayı başta eşim Şura YENEL olmak üzere Yapıncak GÖNCÜ'ye, Özge VARLIK'a, Tayfun ŞENGEL'e, Yiğitcan SÜMBELLİ'ye ve Ceren ÖZEL'e,

Her zorluğa karşı yanımda duran ve dualarını esirgemeyen aileme ve sevdiklerime,

Tez çalışmalarında altyapı desteği sağlayan BUGAMED Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'ne teşekkür ederim.

Aykut ERDOĞAN

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Aykut ERDOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GÖRSELLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Doku Mühendisliği	4
2.1.1. Vücudumuzdaki bazı dokuların HDM farklılıkları ve yapısı	5
2.2. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Geleneksel Doku İskelesi	
Yöntemleri	9
2.2.1. Dondurarak kurutma tekniği	10
2.2.2. Çözücü ve partikül uzaklaştırma tekniği	11
2.2.3. Gazla köpük oluşturma tekniği	11
2.2.4. Elektro-eğirme tekniği	11
2.3. Yeni Nesil Doku İskelesi Üretim Teknikleri; 3B Biyoyazıcılar	13
2.3.1. 3B baskının dijital modellenmesi	14
2.3.2. 3B biyoyazıcı tipleri ve özellikleri	15
2.3.2.1. Mürekkep püskürtme temelli biyoyazıcı	15
2.3.2.2. Stereolitografi temelli biyoyazıcı	16
2.3.2.3. Lazer destekli biyoyazıcı	17
2.3.2.4. Ekstrüzyon temelli biyoyazıcı	18

2.3.3. 3B biyoyazıcı baskı parametreleri	21
2.3.3.1. Basılabilirlik.....	21
2.3.4. Biyomürekkep özellikleri.....	22
2.3.4.1. Biyoyumluluk.....	22
2.3.4.2. Biyobozunurluk.....	23
2.3.4.3. Biyomürekkep reolojisi.....	23
2.3.4.4. Biyomürekkebin çapraz bağlanma stratejileri.....	24
2.3.5. Biyomürekkep tasarımı ve bileşenleri	27
2.3.5.1. Çok bileşenli veya katkılı biyomürekkepler	28
2.3.5.2. Kitosanın özellikleri	29
2.3.5.3. Jelatinin özellikleri	31
2.3.5.4. Hekzagonal bor nitrürün özellikleri.....	33
3. MATERYAL VE METOD	37
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	37
3.2. Deneylerin Yapılışı.....	37
3.2.1. Biyomürekkep bileşenlerinin ön hazırlığı	37
3.2.1.1. Biyomürekkep polimerlerinin hazırlanması	37
3.2.1.2. hBN çözeltisinin hazırlanması	38
3.2.2. Biyomürekkebin hazırlanması	38
3.2.3. Biyomürekkebin 3B baskı öncesi reolojik özelliklerinin incelenmesi	39
3.2.4. Biyomürekkebin basılabilirliği ve 3B biyoyazıcıyla doku iskelesi üretimi	39
3.3. Deneylerin ve Malzemelerin Karakterizasyonu	40
3.3.1. hBN partikül analizi.....	40
3.3.2. hBN XRD analizi	40
3.3.3. Biyomürekkep ve bileşenlerinin fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektrometresi ile analizi	41
3.3.4. Differansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi	41
3.3.5. Biyomürekkep bileşenlerinin yüzey temasına etkisinin belirlenmesi	41
3.3.6. Doku iskelelerinin su tutma kapasitesi	41

3.3.7. Doku iskelelerinin biyobozunurluk testi.....	42
3.3.8. Doku iskelelerinin biyoyumluluk testi.....	42
3.3.9. 3B doku iskelesinin stereo mikroskop görüntülemesi ve analizi.....	43
3.3.10. 3B doku iskelesinin SEM görüntülenmesi.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Biyomürekkep Bileşenlerinin Ön Hazırlığı.....	44
4.1.1. hBN çözeltisinin hazırlanması ve dispersiyon çalışmaları.....	44
4.1.2. Biyomürekkep polimerlerinin hazırlanması.....	44
4.2. Biyomürekkep Hazırlanması	45
4.3. Biyomürekkebin 3B Baskı Öncesi Reolojik Özelliklerinin İncelenmesi	45
4.4. Biyomürekkebin Basılabilirliği ve 3B Biyoyazıcıyla Doku İskelesi Üretimi	48
4.5. Deneylerin ve Malzemelerin Karakterizasyonu	52
4.5.1. hBN partikül boyut analiz sonucu	52
4.5.2. hBN XRD analizi	52
4.5.3. Biyomürekkep ve bileşenlerinin FTIR spektrometresi ile analizi.....	53
4.5.4. Biyomalzemelerin DSC analizi.....	56
4.5.5. Biyomürekkep bileşenlerinin yüzey temas açısı analizi	58
4.5.6. Doku iskelelerinin su tutma kapasitesi	60
4.5.7. Doku iskelelerinin biyobozunurluk testi.....	61
4.5.8. Doku iskelesinin biyoyumluluk testi.....	62
4.5.9. 3B doku iskelelerinin stereo mikroskop görüntülemesi ve analizi.....	63
4.5.10. 3B doku iskelesinin SEM görüntülenmesi.....	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	71
KAYNAKÇA	73
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Geleneksel doku iskelesi üretim tekniklerinin avantajları ve dezavantajları (Eltom, Zhong, & Muhammad, 2019).....	12
Tablo 2.2. Biyoyazıcı tekniklerinin karşılaştırması (Hölzl, ve diğerleri, 2016).....	20
Tablo 2.3. 3B biyoyazıcı tekniklerinin avantajları ve sınırlamaları (Khoeini, ve diğerleri, 2021).....	20
Tablo 2.4. Kitosanın bazı özellikleri üzerine molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesinin etkisi (Yıldırım, Öncül, & Yıldırım, 2016).....	30
Tablo 2.5. hBN'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Jedrzejczak-Silicka, Trukawka, Piotrowska, & Mijowska, 2020)	33
Tablo 3.1. Biyomürekkep adlandırılması ve bileşenleri.....	39
Tablo 4.1. Biyomürekkepler ve ideal baskı parametreleri	49
Tablo 4.2. Doku iskelelerinin gözenek kalitesinin incelenmesi ve Pr değerleri	51
Tablo 4.3. Biyomürekkepler ve bileşenlerinin temas açısı değerleri ve görünümleri.....	59
Tablo 4.4. Doku iskelelerinin su tutma oranları.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Yıllara göre ABD’deki doku ve organ nakli bekleyen hasta, bağışçı ve nakil sayısı (Sykes & Sachs, 2019).....	1
Şekil 1.2. Yıllara göre “biyobasım” üzerine yayınlanan makale sayısı (Ouyang, 2019)	2
Şekil 2.1. Doku mühendisliği temel prensibinin şematik gösterimi (Noh, ve diğerleri, 2017).....	5
Şekil 2.2. Hücre dışı ortam farklılığının hücreler üzerine etkisi (Kular, Basu, & Sharma, 2014)	9
Şekil 2.3. Doku mühendisliğinde sıkça kullanılan bazı biyofabrikasyon teknikleriyle doku iskelesi üretimi; Geleneksel üretim teknikleri; a) çözücü ve partikül uzaklaştırma tekniği, b) gaz ile köpük oluşturma tekniği, c) dondurarak kurutma, d) elektro-eğirme tekniği (Abbasi, Hamlet, Love, & Nguyen, 2020).....	10
Şekil 2.4. Biyoyazıcı uygulamaları küresel pazar dağılımı (http-1, 2017).....	14
Şekil 2.5. Mürekkep püskürtme temelli biyoyazıcılarda çalışma prensibi (Murphy & Atala, 2014).....	16
Şekil 2.6. Stereolitografi temelli biyoyazıcı bileşenleri (Kačarević, ve diğerleri, 2018)	17
Şekil 2.7. Lazer destekli biyo-baskı (LAB) teknolojisinin şematik gösterimi (Hakobyan, ve diğerleri, 2020)	18
Şekil 2.8. Ekstrüzyon temelli biyoyazıcı çeşitleri, mekanizması ve özellikleri (Schwab, ve diğerleri, 2020).....	19
Şekil 2.9. Biyomürekkeplerin baskı öncesi, baskı anında veya sonrasında çapraz bağlama stratejileri; a) UV ışın maruziyeti, b) ısı değiştirme, c) daldırma, d) yüzey spreyleme (Aydin, Kucuk, & Kenar, 2020).....	25
Şekil 2.10. Jelatinin sıcaklığa bağlı jelleşmesinin şematik gösterimi (Li, ve diğerleri, 2018).....	26
Şekil 2.11. Biyobaskıda biyomürekkep bileşeni olarak doğal ve sentetik polimerlerin kullanım oranları (Hacıoğlu, Yılmaz, & Ustundag, 2018)	28

Şekil 2.12. Kitinin deasetilasyon işlemi ile kitosana dönüşümü (Saravanan, Leena, & Selvamurugan, 2016).....	29
Şekil 2.13. Jelatinin moleküler yapısı ve aktif grupları (Kariduraganavar, Kittur, & Kamble, 2014).....	32
Şekil 2.14. Hekzagonal bor nitrürün moleküler yapısı ve tabakalar arası etkileşimleri (Jedrzejczak-Silicka, Trukawka, Piotrowska, & Mijowska, 2020)	33
Şekil 2.15. Yıllara göre hBN içeren makalelerin sayısı.....	36
Şekil 4.1. Biyomalzemelerin mekanik strese karşı viskozite değişim grafiği	46
Şekil 4.2. Hidrojelin sıcaklığa bağlı viskoelastik davranışı.....	47
Şekil 4.3. Sıcaklık ve strese bağlı viskozite değişim grafiği	48
Şekil 4.4. Baskı hızının filament üzerine etkisi	49
Şekil 4.5. 3B doku iskelesinin baskı parametreleri ve biyobasımın şematik görüntüsü.....	50
Şekil 4.6. Gözenekli doku iskelesinin Pr hesaplamasının şematik gösterimi (O'Connell, ve diğerleri, 2020)	50
Şekil 4.7. hBN partiküllerinin boyut dağılım grafiği.....	52
Şekil 4.8. hBN'ye ait XRD paternleri.....	53
Şekil 4.9. hBN FTIR spektrumları.....	54
Şekil 4.10. Jelatinin FTIR spektrumları.....	54
Şekil 4.11. Kitosanın FTIR spektrumları ve aktif grup işaretlemeleri.....	55
Şekil 4.12. Kuru kitosan ve jelatin ile JK ve JKBN biyomürekkeplerin spektrum karşılaştırması	56
Şekil 4.13. Jelatin ve kitosanın DSC termagramı; a) endotermik bölge, b) ekzotermik bölge içerir.	57
Şekil 4.14. Doku iskelelerinin termal davranışı.....	57
Şekil 4.15. Biyomürekkeplerin termal davranışı	58
Şekil 4.16. Çapraz bağlanmanın su tutma kapasitesine olan etkisi.....	60
Şekil 4.17. Kovalent bağlı doku iskelelerinin 14 günlük bozunma grafiği	61
Şekil 4.18. Doku iskelelerinin floresan mikroskop görüntülemesi a-c) calcein AM ile canlı hücre boyaması b-d) PI ile ölü hücre boyaması	62
Şekil 4.19. Biyomürekkeplerin baskı sonrası stereo mikroskop görüntüsü; a) 5JK, b)5JKBN, c)7,5JK, d)7,5JKBN	64

- Şekil 4.20.** Liyofilize edilmiş kimyasal olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin stereo mikroskop görüntüsü; a)5JK, c)5JKBN, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 0,63 kat büyütmedeki görüntüleri (ölçek çubuğu 1000 µm), b)5JK ve d)5JKBN grubunun 2 kat büyütmede, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 2,5 kat büyümedeki (ölçek çubuğu 500 µm) görüntüleridir. 65
- Şekil 4.21.** İyonik olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin stereo mikroskop görüntüleri; a)5JK, c)5JKBN, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 0,63 kat büyütmedeki görüntüleri, b)5JK ve d)5JKBN grubunun 2,5 kat büyütmede, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 2 kat büyümedeki (ölçek çubuğu 500 µm) görüntüleridir. 67
- Şekil 4.22.** Liyofilize edilmiş kimyasal olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin SEM görüntüleri; a)5JK, c)5JKBN, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 200 kat büyütmedeki görüntüleri (ölçek çubuğu 100 µm), b)5JK, d)5JKBN, e)7,5JK ve h)7,5JKBN grubunun 500 kat büyümedeki (ölçek çubuğu 10 µm) görüntüleridir. 69
- Şekil 4.23.** İyonik olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin SEM görüntüleri; a)5JK, c)5JKBN, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 120 kat büyütmedeki görüntüleri ile b)5JK, d)5JKBN, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 250 kat büyümedeki (ölçek çubuğu 100 µm) görüntüleridir 70

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. Bağ dokusu tipleri ve hücre-hücre dışı matris dağılımı; a) kemik dokusu ve osteosit hücreleri, b) kıkırdak dokusu ve kondrosit hücreleri, c) tendon dokusu ve tendonosit hücreleri, d) yağ dokusu ve adiposit hücreleri (Marieb & Keller, 2017)	6
Görsel 2.2. HDM morfolojik yapısı ve hücreyle etkileşimleri (Xue & Jackson, 2015).	8



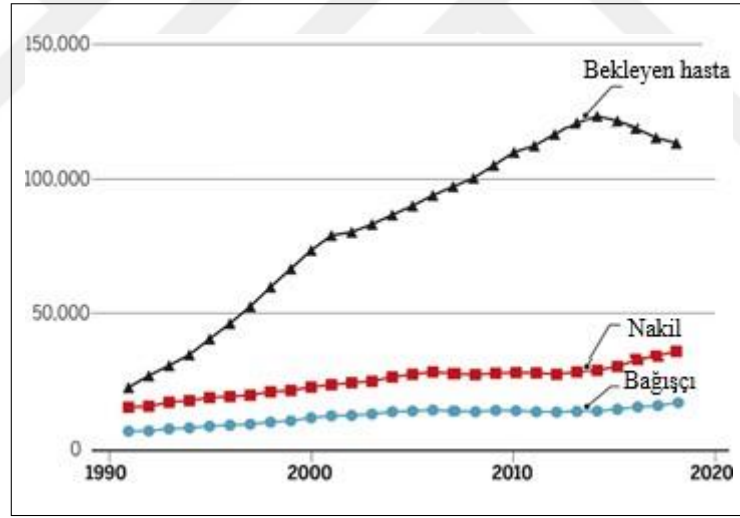
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μm	: Mikrometre
2B	: 2 Boyutlu
3B	: 3 Boyutlu
ABS	: Akrilonitril bütadien stiren
BN	: Bor Nitrür
BNNS	: Bor nitrür nano-tabakaları
BT	: Bilgisayarlı tomografi
C	: Santigrad
CAD	: Bilgisayar destekli tasarım
CR	: Kovalent olarak çapraz bağlanmış
DD	: Deasetilasyon derecesi
DMEM f-12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSC	: Differansiyel Taramalı Kalorimetre
FBS	: Fetal bovine serum
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	: Fourier Dönüşümü Kızılötesi
GAG	: Glikozaminoglikanlar
hBN	: Hegzagonal Bor Nitrür
HDM	: Hücre dışı matris
JK	: Jelatin-kitosan hidrojel
JKBN	: Jelatin-kitosan-bor nitrür hidrojel

kDa	: Kilodalton
LIFT	: Lazer kaynaklı ileri transfer
MA	: Molekül ağırlığı
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
MRI	: Manyetik rezosans görüntüleme
nm	: Nanometre
PBS	: Tuz içeren fosfat tamponu
PHA	: Polihidroksialkonat
PI	: Propidiyum iyodür
PLA	: Polilaktik asit
PMMA	: Polimetil metakrilat
Pr	: Basılabilirlik
RGD	: Arjinin-Glisin-Aspartik asit
s	: Saniye
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
STL	: Mozaik dil dosyası
UV	: Ultraviyole
θ	: Teta

1. GİRİŞ

Ülkemizde doku ve organ yetmezliği vakaları tüm dünyada olduğu gibi her geçen zamanda artmaktadır. Bu durum doku ve organ nakli bekleyen insanların hem yaşam kalitesini düşürmekte hem de uzun süren tedavi süreçleri nedeniyle ekonomik açıdan olumsuz etkilemektedir. Bazı hastalar kısa sürede uygun doku veya organ bulabiliyorken bazı hastalar ise nakil için yıllarca beklemesi gerekmektedir. Bu hastalar kadavra veya canlı vericiden (bağışçıdan) uygun organ beklerken yaşamını yitirmektedir (Tay, 2016). Bu durum sadece ülkemizle sınırlı kalmayıp dünyanın diğer ülkelerinde de aynı durum geçerlidir. Örneğin ABD’de her gün 17 hasta organ bağışığı beklerken vefat etmektedir. Bu sorunun temel sebebi her bağışlanan dokunun veya organın hasta ile uyumlu olmamasının yanı sıra bağışlanan doku veya organın sayısının Şekil 1.1’de görüldüğü gibi yetersiz olmasıdır (Sykes & Sachs, 2019). Doku ve organ yetmezliğindeki bu sorun, doku nakli harici alternatif tedavilerle olan ihtiyacı artırmıştır.

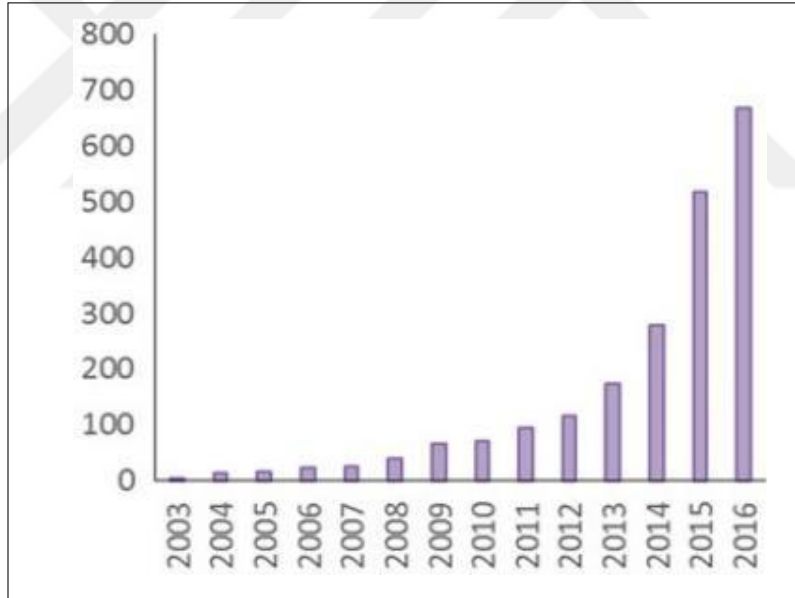


Şekil 1.1. Yıllara göre ABD’deki doku ve organ nakli bekleyen hasta, bağışçı ve nakil sayısı (Sykes & Sachs, 2019)

Doku ve organ kaybını önlemeyi amaçlayan doku mühendisliği alanı doku ve organ nakli bekleyen hastalar için umut vadetmektedir. Doku mühendisliği hasarlı yapıları onarmakta veya fonksiyonel yapay doku veya organ ile değiştirerek tedavi edebilmektedir (Chandra vd., 2020). Fakat 3 boyutlu (3B) fonksiyonel doku ve organ oluşturmada çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Bunlar; doğal dokuya benzeyen 3B heterojen yapının oluşturulması, hücrelerin doku iskelesi içerisinde çoğaltılması, fonksiyonel doku/organ

oluşumu, doku/organların birden fazla hücre içermesi, doku ve organ boyutlarının kişiden kişiye farklılık göstermesi şeklinde sıralanabilir (Zhang, ve diğerleri, 2016)

Doku mühendisliğinde hedeflenen doku veya organın hücre dışı matrisini (HDM) taklit etmeyi ve fonksiyonel doku ve organ oluşturmada karşılaşılan zorlukların üstesinden gelmeyi amaçlayan yeni biyofabrikasyon teknikleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerden birisi, dokunun HDM yapısını mikro boyutta tekrarlanabilir şekilde taklit eden 3B biyoyazıcı tekniğidir. Bu üretim tekniğinde hücreler homojen olarak doku iskelesi içerisine gömülebilmekte veya hücreli olarak rejenerasyonu teşvik eden 3B destek yapıları oluşturulabilmektedir. Organların karmaşık yapısını oluşturabilmek için hem biyomürekkepler hem de biyoyazıcı teknikleri her geçen gün daha da geliştirilmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar (Şekil 1.2) yıllar bazında dinamik bir artış sergilemektedir (Ouyang, 2019).



Şekil 1.2. Yıllara göre “biyobasım” üzerine yayınlanan makale sayısı (Ouyang, 2019)

3B biyoyazıcılarda 4 farklı teknik (lazer destekli, stereolitografi, mürekkep püskürtme ve ekstrüzyon temelli) sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknikler, temelinde tasarlanmış 3B yapılar oluşturmayı hedeflemektedir. Damlacık şeklinde üste üste birikme yöntemini kullanan lazer destekli biyoyazıcıda lazer kaynağı kullanırken, mürekkep püskürtmeli biyoyazıcı, termal veya piezoelektrik etkiden faydalanmaktadır. Stereolitografi biyoyazıcısında ışık ile çapraz bağlanabilen polimerler UV kaynağı ile

yönlendirilerek istenilen yapı oluşturulmaktadır. Ekstrüzyon temelli biyoyazıcıların yüksek derişimde, yüksek viskoziteli biyomürekkeplerin filamentler halinde üst üste biriktirilerek 3B karmaşık organ yapılarını kolaylıkla taklit edilebilmektedir (Foyt, Norman, Yu, & Gentleman, 2018) Ayrıca 3-6 eksenli robotlarla basılabilmesi gibi teknolojik üstünlükleri bulunmaktadır (Willson, Ke, Kengla, Atala, & Murphy, 2020). Fakat yüksek derişimde kullanılan biyomürekkeplerin kullanımı hücre canlılığını ve uygun basılabilirlik parametrelerinin sağlanmasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Özbolat, 2016).

Bu tez kapsamında yüksek derişime sahip biyomürekkeplerin, basılabilirliğini kolaylaştırmak ve baskı esnasında homojen sıcaklık dağılımını sağlamak için hekzagonal bor nitrür (hBN) nanopartikülleri kullanılarak biyobasılabilirliği incelenecektir.

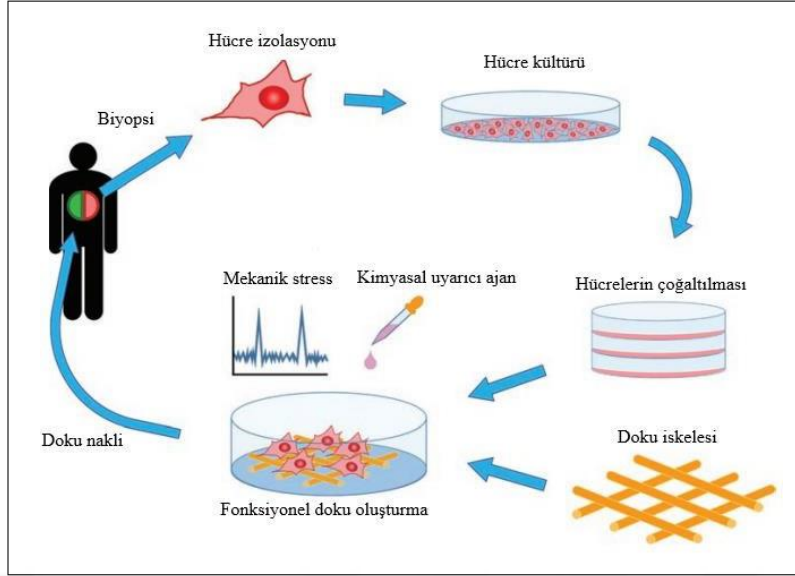
hBN'nin mekanik özelliklere katkı sağlaması, yüksek kimyasal dayanıklılığının bulunması ve biyoyumlu olması gibi özellikleri bulunmaktadır (Kıvanç, ve diğerleri, 2018). Ayrıca ekstrüzyon temelli biyoyazıcı ile hBN-jelatin-kitosan içeren biyomürekkeple basılan doku iskelelerinin doku mühendisliğinde biyomalzeme olarak kullanılabilirliği bu tez kapsamında değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, biyoloji ve mühendislik alanlarının beraber çalışması sonucunda, fonksiyonunu kaybetmiş doku ve organların yerini alabilecek veya yenilenmesini ve tekrar fonksiyonlarının kazandırılmasını hedefleyen yenilikçi bir alandır (Langer & Vacanti, 1993). Genel olarak klinik uygulamada hasarlı ve işlev görmeyen dokuların sağlıklı dokularla değiştirilmesinde otogreftleme (hastanın kendisinden alınan dokunun kendisine nakli) ve allogreftleme (başka bir kişiden alınan dokunun nakli) sıklıkla uygulanan yöntemlerdir. Ancak otogreftlerde greftin alındığı bölgede yaşanan komplikasyonlar ve greftin miktarının yetersizliğinden muzdariptir. Allogreftlerde ise immün uyumsuzluk ve kişiler arasında hastalık taşınması gibi çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır (Ochando, Fayad, Madsen, Netea, & Mulder, 2020). Tüm bunlar göz önüne alındığında nakledilmeye uygun sağlıklı doku ve organların laboratuvar ortamında üretilmesini amaçlayan doku mühendisliği çalışmalarının önemi vurgulanmaktadır.

Doku mühendisliğinin temel prensibi Şekil 2.1’de görülmektedir. Hastadan alınan doku parçasından, laboratuvar ortamında istenilen hücreler izole edilmekte ve hücreler belirli sayıya ulaşana kadar çoğaltılmaktadır. Doku mühendisliği üretim teknikleri ile üretilen doku iskelesi üzerine çoğaltılan hücreler ekilmektedir. Ardından doğal dokunun ortamı taklit edilerek fonksiyonel doku oluşturmak için mekanik stres ve kimyasal uyarıcı ajanlarla (sitokinler, kemokinler vd.) inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonrasında hastanın kendi hücrelerinden oluşan canlı doku hastaya nakledilmektedir (Noh, ve diğerleri, 2017).



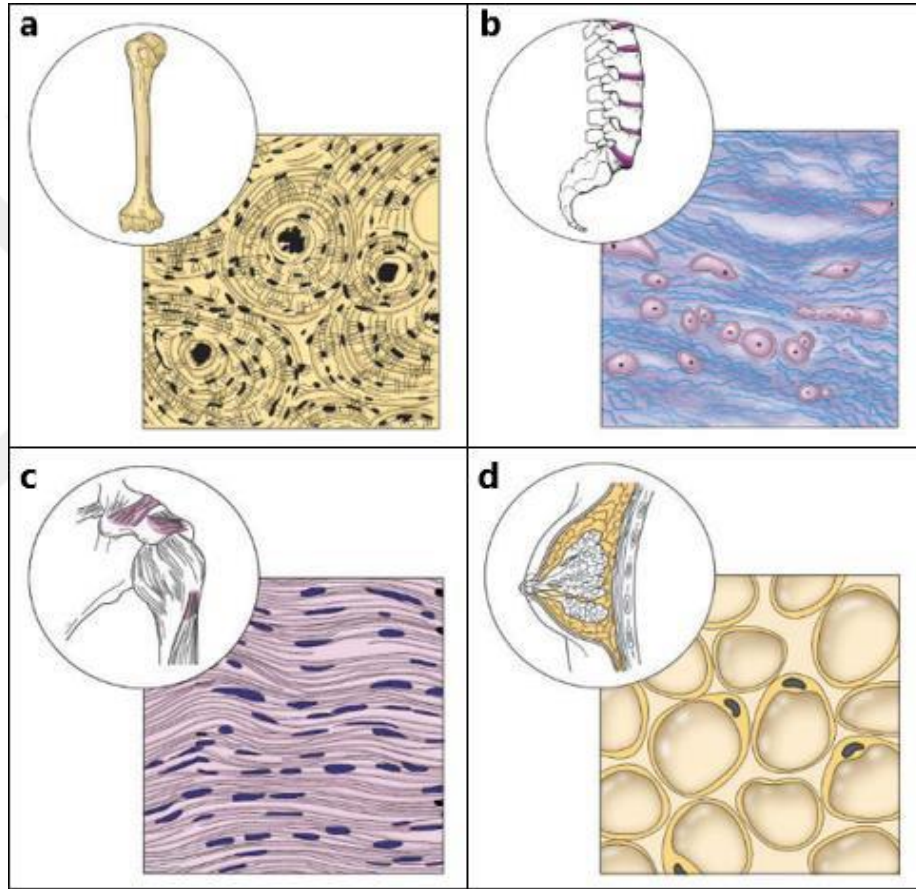
Şekil 2.1. Doku mühendisliği temel prensibinin şematik gösterimi (Noh, ve diğerleri, 2017)

Doku iskelesi, dokunun HDM yapısını taklit ettiği için önemli özellikleri ve görevleri bulunmaktadır. Bu yapılar hücrelerin üzerinde büyüyebileceği ve doku özelliklerini kazanabileceği şekilde tasarlanmakta ve genellikle biyobozunur ve biyoyumlu, doğal ya da sentetik polimerik biyomalzemeler kullanılarak üretilmektedir. Doku iskelesi üretilirken kullanılan biyomalzemeler; hedef dokunun iyileştiği hızla orantılı olarak bozunma göstermeli, mekanik özellikleri hedef bölgeye uygun olmalı, iyileşme sürecinde yapısal bütünlüğünü korumalı, dokunun yapı içerisine gelişmesine izin verecek ölçüde gözenekli olmalı ve dokunun doğal üç boyutlu yapısını taklit edebilmesi gerekmektedir (O'Brien, 2011).

2.1.1. Vücudumuzdaki bazı dokuların HDM farklılıkları ve yapısı

Vücudumuz epitel, kas, sinir ve bağ dokusu dahil olmak üzere temelde 4 çeşit dokudan oluşmaktadır. Her dokunun kendine özgü karakteristik özellikleri bulunmaktadır. Bu dokulardaki farklılıklar, hücre tipi, HDM içeriği, morfolojisi ve fonksiyonu şeklinde sıralanabilir (Marieb & Keller, 2017). HDM bileşiminin en fazla değişkenlik gösteren doku tipi bağ dokusudur. Bağ dokuları fibroblast ve diğer hücrelerin kollajen gibi hücre dışı matris bileşenlerini üretmesi ile oluşan genellikle dayanıklı dokulardır. Bağ dokuları arasındaki temel farklılıklar, hücre tiplerinden, hücre dışı matris lif türlerinden (kollajen tipleri, elastin vb.) ve lif yoğunluğundan kaynaklanmaktadır (McKee, Perlman, Morris, & Komarova, 2019). Bu matriste temel olarak hücrelerin

yapışmasını sağlayan proteinler, dayanıklılığı artıran lifler ve nemi doku içerisinde tutmayı sağlayan polisakkaritler bulunmaktadır. Matris bileşeninin yoğunluğuna göre doku sert ve yumuşak doku olarak sınıflandırılabilir. Sert dokular olan kemik ve kıkırdak dokularında çok az hücre bulunurken HDM yoğunluğu fazladır (Görsel 2.1). Buda dokunun daha dayanıklı fakat hücre sayısının az olmasından dolayı iyileşme süreci uzun olabilmektedir. Diğer taraftan yumuşak bağ dokusu olan yağ dokusu daha fazla hücre ve daha az hücre dışı matris yoğunluğuna sahiptir (Marieb & Keller, 2017).



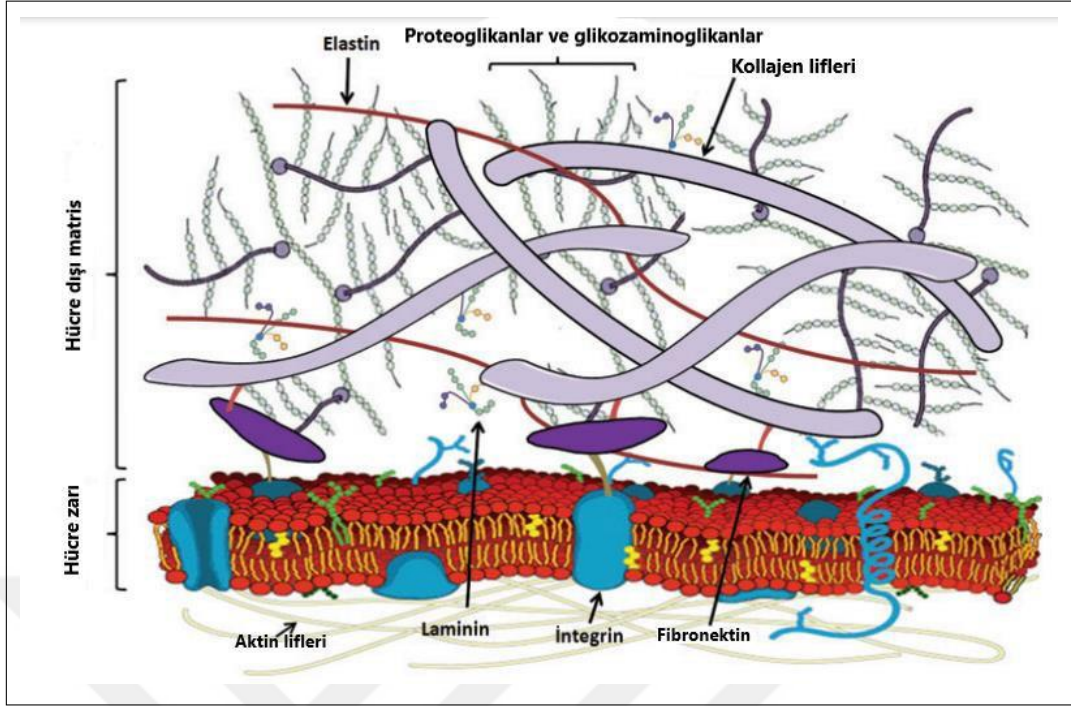
Görsel 2.1. Bağ dokusu tipleri ve hücre-hücre dışı matris dağılımı; a) kemik dokusu ve osteosit hücreleri, b) kıkırdak dokusu ve kondrosit hücreleri, c) tendon dokusu ve tendonosit hücreleri, d) yağ dokusu ve adiposit hücreleri (Marieb & Keller, 2017)

Dokuların HDM yapısı, hücre dışında yer alan ve doku tipine göre ağırsı veya yönlendirilmiş lifler halinde görülen ve karmaşık makromoleküllerden oluşmaktadır. Bu yapıda genellikle üç ana biyomolekül (proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar (GAG), lifsi proteinler; kollajen, elastin, fibronektin ve laminin) bulunmaktadır (Kusindarta & Wihadmadyatami, 2018). GAG'lar dallanmamış polisakkarit zincirlerinden (tekrarlayan

disakkarit birimlerinin biraraya gelmesiyle) oluşmaktadır. Kompleks yapısı ve yapısındaki negatif yükler sayesinde çok fazla miktarda sıvıyı içerisinde tutabilmekte ve mekanik stres altında dokunun kaybettiği hacmi tekrar kazanabilmektesini sağlamaktadır. GAG'lar viskoz yapısı ve yağlayıcı özelliği sayesinde dokuya esneklik kazandırır. Ayrıca fizyolojik süreçlerde sitokinleri, büyüme faktörlerini, enzimleri ve diğer proteinleri bağladığı ve düzenlediği bilinmektedir (Gandhi & Mancera, 2008)

Proteoglikanlar, yüksek oranda anyonik glikozaminoglikanların kovalent olarak proteinlere bağlanmasıyla oluşan kompleks yapılardır. Proteoglikanların ana biyolojik işlevi, dokuya hidrasyon ve şişme basıncı sağlayan ve sıkıştırma kuvvetlerine dayanmasını sağlamaktır (Yanagishita, 1993).

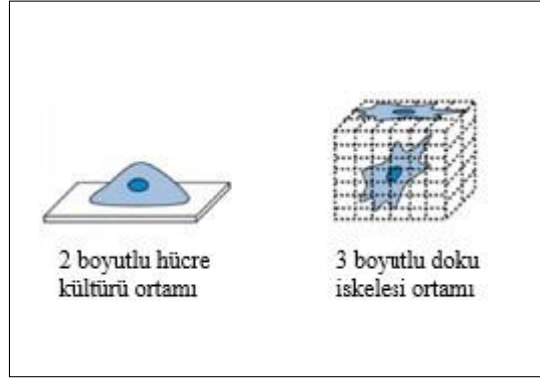
Hücre dışı matris yapısının dinamik bileşenlerini oluşturan fibröz lifler bulunmaktadır. Kollajen lifleri hücre dışı matrisin iskele yapısı oluşturan ana proteinlerden biridir. Dokunun gerilme mukavemetini sağlayan üçlü sarmal zincirleri bulunmaktadır. Kollajen lifleri hücrelerin hücre dışı matris yapısında tutunması, çoğalması, göç etmesi ve farklılaşması için aktif rol oynamaktadır (Boraschi-Diaz, Wang, & Komarova, 2017). Elastin lifleri, dokunun gerilme sonrası tekrar eski haline gelmesinde görev alan hidrofobik bir proteindir. Bu özelliğiyle basıncın iletilmesinde damarların yırtılmasını önlemek için kan damarlarında bol miktarda bulunmaktadır. Elastin kollajen gibi fibroblastlardan veya düz kas hücrelerinden sentezlenmektedir (Üçgül, Aras, & Elibüyük, 2018). Fibronektinler, bazal membran kısmında yer alan kollajen gibi fibriller yapıdadır. Hem hücrelerin yapışmasını/tutunmasını hem de yara iyileşmesinde önemli rolü bulunmaktadır. Fibronektinin zincir yapısında bulunan Arjinin-Glisin-Aspartik asit (RGD) amino asit sekans bölgesinden hücrenin yüzey reseptörlerine (integrinler) bağlanmaktadır. Lamininler, hem kas hem de epitel dokuları dahil çeşitli dokularda bulunan hücrelerin yapışmasını, integrinler vasıtasıyla hücrelerin farklılaşmasını ve göçünü teşvik eden glikoproteinlerdir (Kular, Basu, & Sharma, 2014).



Görsel 2.2. HDM morfolojik yapısı ve hücreyle etkileşimleri (Xue & Jackson, 2015).

HDM, daha önce bahsedildiği gibi hücrelerin yapışması, büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve doku içerisinde göçünü teşvik eden kompleks yapıdan oluşmaktadır. Ayrıca dokunun büyümesinde, yeniden modellenmesinde ve iyileşme süreçlerinde rol almaktadır (Kusindarta & Wihadmadyatami, 2018).

HDM hücrelerin biyoaktivitesini yönlendirmenin yanı sıra dinamik ortamda mekanik destek sağlamaktadır. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi hücreler 2 boyutlu hücre kültürü ortamında yüzeyde yayılma eğilimi gösterirken 3 boyutlu ortamda doğal dokuya benzerliğinden dolayı çoklu uzuvlarla yüzeyde tutunma, yayılma ve kendi HDM yapısını üreterek bulunduğu ortamı şekillendirme eğilimine girmektedirler (Kular, Basu, & Sharma, 2014). Hücreler bulundukları ortama göre farklı davranış sergilemeleri doku iskelesi yapısını ve üretim tekniklerini doğrudan/dolaylı olarak etkilemektedir.

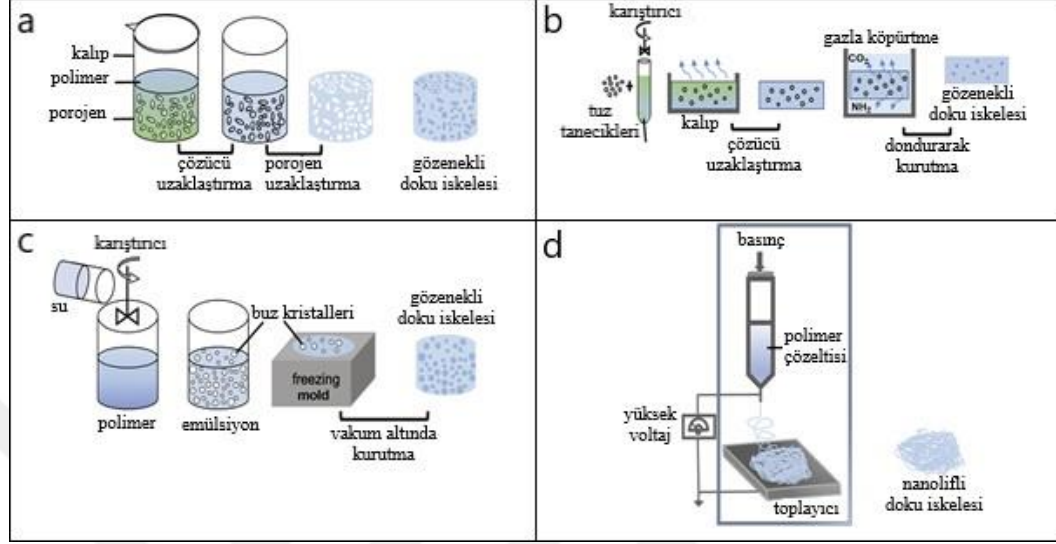


Şekil 2.2. Hücre dışı ortam farklılığının hücreler üzerine etkisi (Kular, Basu, & Sharma, 2014)

2.2. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Geleneksel Doku İskelesi Yöntemleri

Hücreler tutundukları bölgeye göre 3 boyutlu morfolojik yapısı değişmektedir. Hücre kültürü ortamında hücreler destek materyali olmadan tek başına doku oluşumunu sağlayamamaktadır. Destek materyali olarak kullanılan doku iskelesi, hücrelerin yeniden doku oluşturmak için destek ortamı oluşturur. Doku iskelesinin üretiminde kullanılan 3B biyofabrikasyon teknikleri doku iskelesinin gözenek boyutu, geometrik yapısı hücrelerin tutunması, çoğalması, farklılaşması ve göçünü etkilemektedir. Bir doku iskelesinden temel olarak hücrelerin geçebileceği boyutlarda gözenekler olmalı ve bu gözeneklerin arasında ara bağlantı bulunması gerekmektedir. Çünkü bu gözeneklerin hücrelerin beslenmesi, oksijen alması ve dolayısıyla hücre geçişinin kolay olması beklenmektedir. Bu özellikleri sağlarken aynı zamanda mekanik özelliklerini de koruması gerekmektedir. Doku iskelesi özelliklerini hücrelerin kendi hücre dışı matris yapısını üretip yeni doku oluşumu sağlayana kadar devam ettirir ve biyolojik olarak bozunarak ortamdaki hücrelere zarar vermeden uzaklaşmaktadır. Doku mühendisliğinde geleneksel olarak kullanılan 3B boyutlu biyofabrikasyon teknikleri Şekil 2.3'te yer almaktadır (Abbasi, Hamlet, Love, &

Nguyen, 2020). Gelişen teknoloji ile doğal dokuyu en iyi şekilde taklit edebilen yeni teknikler gelişmeye devam etmektedir.



Şekil 2.3. Doku mühendisliğinde sıkça kullanılan bazı biyofabrikasyon teknikleriyle doku iskelesi üretimi; Geleneksel üretim teknikleri; a) çözücü ve partikül uzaklaştırma tekniği, b) gaz ile köpük oluşturma tekniği, c) dondurarak kurutma, d) elektro-eğirme tekniği (Abbasi, Hamlet, Love, & Nguyen, 2020)

Sentetik ve doğal biyomalzemeleri doku iskelesine dönüştürmek için çeşitli üretim yöntemi bulunmaktadır. Çözücü ve partikül uzaklaştırma tekniği, gaz ile köpük oluşturma tekniği ve dondurarak kurutma tekniği bunlardan bazılarıdır (Zhu & Che, 2013).

2.2.1. Dondurarak kurutma tekniği

Genellikle sıcaklıktan etkilenebilen malzemelerin kurutulması için kullanılan bir tekniktir. Dondurarak kurutma tekniğinde çözelti veya yarı katı formdaki malzemenin içerisinde sıvıyı uzaklaştırmak için öncelikle dondurulmaları gerekir. Böylelikle oluşan su/sıvı kristalleri soğuk ortamda (-50 ila -90 °C) ve vakum altında süblimleşerek katı formdan gaz formuna geçmekte ve içerisindeki su/sıvı uzaklaşmasıyla malzeme kurumaktadır. Bu tekniğin avantajı, kurutmak için toksik kimyasallar yerine çevre dostu zararsız çözücüler kullanılabilesidir (Fereshteh, 2018).

2.2.2. Çözücü ve partikül uzaklaştırma tekniği

Bu teknikte doku iskelesinin gözenek boyutunu istenilen boyutta ayarlayabilmek için suda çözünebilen belirli çapta gözenek oluşturan (porojen) parçacıklar (tuz, şeker vb.) suda çözünmeyen polimer çözeltisi ile karıştırılmaktadır. Çözücü buharlaşarak uzaklaştırıldıktan sonra tuz partikülleri ile gömülü polimerik malzeme suya batırılarak tuzlar uzaklaştırılmaktadır. Böylelikle ortalama 500 µm boyutlarında ve %93'e varan gözeneklilik oluşturulabilmektedir. Bu tekniğin avantajı ayarlanabilir gözenek boyutu sağlaması olsa da yalnızca 3 mm kalınlığında doku iskeleleri üretmek için kullanılabilmektedir (Zhu & Che, 2013).

2.2.3. Gazla köpük oluşturma tekniği

Doku iskelesini oluşturacak polimer üzerine yüksek basınçla CO₂, H₂O ve N₂ gazları uygulanarak köpürtülmektedir. Böylelikle yaklaşık 100 ila 500 µm arasında değişen boyutlarda kabarcıkların oluşması sağlanmaktadır. Bu yöntemin avantajı organik çözücülere gerek kalmadan doku iskelesinin üretilmesidir. Dezavantajı ise gözeneklerin birbiri ile bağlantısının olmaması ve dış yüzeyinin gözeneksiz yapıda oluşturulmasıdır (Zhu & Che, 2013).

2.2.4. Elektro-eğirme tekniği

Bu teknikte polimer çözeltisine yüksek elektrik alanı uygulanarak nanofiberler üretilmektedir. Elektro-eğirme sistemi üç temel kısımdan oluşmaktadır. Bunlar; yüksek voltaj sağlayan güç kaynağı, nanofiber toplayıcısı ve polimeri enjekte eden metal uçlu hazneyi (şırınga vb.) içerir. Şekil 2.3.1.1'de görüldüğü gibi güç kaynağının pozitif ve negatif kablo uçları sırasıyla şırınganın metal ucuna ve nanofiber toplayıcısına bağlanır. Yüksek voltaj, elektriksel potansiyel fark oluşturur. Şırıngadaki polimer çözeltisi belirli hızda toplayıcıya doğru enjekte edilir. Şırınga ucundan elektriksel olarak yüklenmiş polimer lifleri elektriksel alanın kontrolünde toplayıcı yüzeyinde rastgele sarmallar olarak birirmektedir (Aslan, ve diğerleri, 2020). Bu esnada polimer çözeltisinin çözücüsü buharlaşarak ortamdan uzaklaşmaktadır. Üretilen nanofiberlerin çapı 3 nm ila 10 µm olabilmektedir. Polimer çözeltisinin derişimi, çözeltinin akış hızı, voltaj şiddeti ve iğne ucunun toplayıcıya olan mesafesi nanofiberin çapını doğrudan etkilemektedir. Bu tekniğin avantajı sistemin kolay kurulması, üretimdeki nanofiber çapını değişkenlerle

kontrol edilebilir olması, toplayıcı yüzeyindeki ağısı nanofiberlerin hücre dışı matrise benzer lifler oluşturmalarıdır. Dezavantajı ise buharlaşan organik çözücülerin toksik olabilmesi, rastgele iletilen sarmallar gözeneklerin kontrolünü zorlaştırmaktadır. Ayrıca üretim süresi uzun olması nedeniyle sadece yüksek gözenekliliğe sahip ince membranlar üretilmektedir (Dahlin, Kasper, & Mikos, 2011). Bu kullanılan tekniklerin avantaj ve dezavantajları (Tablo 2.1) bulunmaktadır (Eltom, Zhong, & Muhammad, 2019).

Tablo 2.1. Geleneksel doku iskelesi üretim tekniklerinin avantajları ve dezavantajları (Eltom, Zhong, & Muhammad, 2019)

Geleneksel Üretim Teknikleri	Avantajları	Dezavantajları
Dondurarak kurutma tekniği	Çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır.	Üretim süresi uzun ve enerji tüketimi yüksektir.
	Yüksek sıcaklıkların olumsuz etkisini önlemektedir.	Zararlı çözücü kullanılabilmekte ve küçük ölçekli üretim yapılabilmektedir.
	Gözenek boyutu dondurma sıcaklığı değiştirilerek kontrol edilebilmektedir.	Düzensiz gözenek boyutlarına sahip olmaktadır.
Çözücü ve partikül uzaklaştırma tekniği	Sadece ince membran üretilmektedir.	Yaygın olarak aşırı toksik çözücülerin kullanılmaktadır.
	Yüksek gözenekliliğe (%50-90) sahiptir.	Yalnızca ince membranlar kullanıldığı için üretim zaman almaktadır.
	Maliyeti uygundur.	
Gaz ile köpürtme tekniği	%85'e kadar gözeneklilik sağlamaktadır.	Dış yüzeyi kapalı sadece içi gözenekli yapı oluşturmaktadır.
Elektro-eğirme tekniği	Nanofibröz doku iskeleleri üretilmektedir.	Kullanılan çözücüler toksik olabilmektedir.
	Nanofiberlerin üretilmesi ve yönlendirilebilmesiyle dayanıklılık artırılabilir.	Üretim süreci birçok değişkene bağlıdır. Yeterli büyüklükte gözeneklerin yanı sıra ince membran üretilmesi nedeniyle 3B doku iskelesi üretimi sınırlıdır.

Doku mühendisliğinde geleneksel doku iskelesi üretim tekniklerinin zayıf yönleri fonksiyonel doku/organları oluşturmaları için yeni tekniklerin geliştirilmesini ve birden fazla tekniğin bir arada kullanılmasını teşvik etmiştir (Chansoria, Schuchard, & Shirwaiker, 2020).

2.3. Yeni Nesil Doku İskelesi Üretim Teknikleri; 3B Biyoyazıcılar

Geleneksel doku iskelesi üretim yöntemleriyle üretilen doku iskeleleri gözenekli yapısıyla hücrelerin tutunması ve çoğalması ortam sağlamaktadır. Fakat fonksiyonel doku/organ oluşturmak için bu tekniklerin yetersizliği yeni tekniklerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Karşılaşılan temel sorunlar ise gözenekliliğinin kontrol edilememesi, kişiye özel doku/organ şeklinin verilememesi, hücrelerle birlikte doku iskelesinin üretilmemesi, hücrelerin doku iskelesi içerisinde beslenmesinin dolayı fonksiyonel doku oluşturulamaması, doku/organların damarlanması sağlayacak 3B morfolojinin sağlanamaması şeklinde sıralanabilir ((Zhang, ve diğerleri, 2016); (Alaribe, Manoto, & Motaung, 2016)).

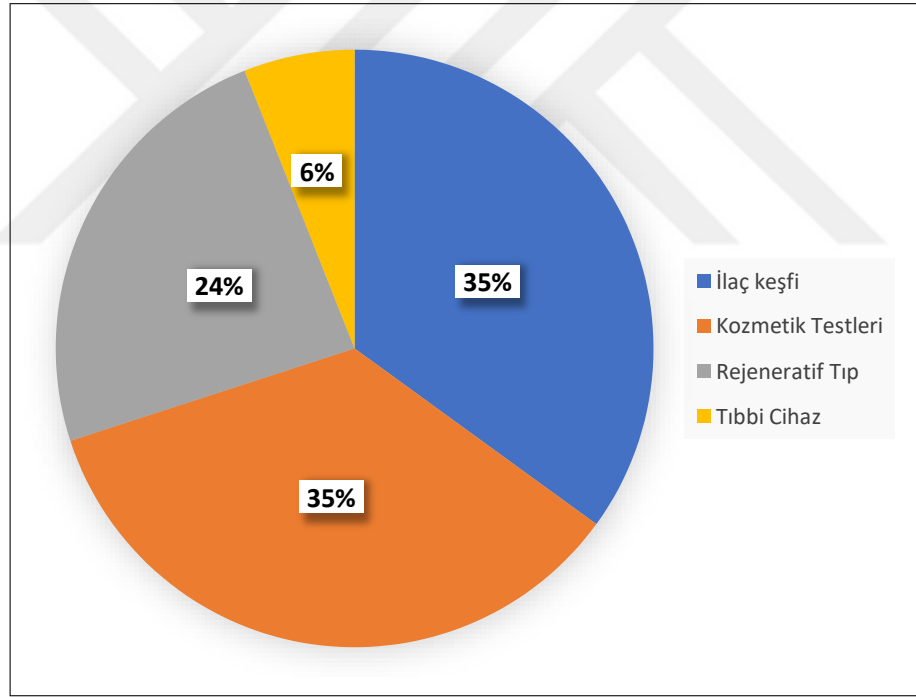
Bu gözenekler hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik etmektedir. Doku yenilenmesinin hızlı olabilmesi için doku iskelesinin gözenek boyutları hücrelerin geçebileceği ve beslenebileceği boyutta olması önemlidir (Yousefi, Akbarzadeh, & Yousefi, 2014). 3B doku iskelesinde karşılaşılan temel sorun hücreler ekildiği taktirde yapının ortasındaki hücrelerin canlılığını koruyamaması ve istenilen 3B doku iskelesi şeklinin verilememesidir.

3B biyoyazıcı tekniğinin temelini eklemeli imalat tekniği olarak da bilinen 3B yazıcılara dayanmaktadır. Dijital ortamda tasarlanmış nesneler, polimerik malzemelerin (ABS (akrilonitril bütadien stiren), PLA (poli-laktik asit) vb.) 3B yazıcı aracılığıyla çeşitli işlemlere maruz bırakılarak x-y-z eksenlerinde katman katman basılmakta ve istenilen boyutlarda katı nesneler oluşturulmaktadır. 3B yazıcılar sağlık sektöründe, eksik veya kaybedilen uzuvların yerini alması için çeşitli protezlerin (kulak, el, ampute ayak soketi) üretilmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntem sadece estetik ve fiziksel fonksiyon kazandırmaktadır. Fakat hasarlı dokuların kendini yenileyebilmesi için hücreli/hücresiz 3B biyoyazıcı ile basılan fonksiyonelleştirilebilir doku iskelelerine ihtiyaç vardır (Vijayavenkataraman, Yan, Lu, Wang, & Fuh, 2018).

3B biyoyazıcı tekniği, yetersiz sayıda gerçekleşen organ bağıışı sorununu çözebilecek potansiyeli taşımaktadır. Bu teknik, karmaşık dokuların 3B mikro ortamını veya hücre dışı matris mimarisini, fonksiyonel yapısını, dokuya özgü hücre dışı matris bileşimlerini ve mekanik dayanımını taklit ederek hücreli/hücresiz şekilde, istenilen boyutta ve ölçeklendirilebilir olarak üretimine imkân sunması sayesinde bu soruna bir

özüm getirebilir. Bu tekniğın avantajları, yüksek hassasiyet, otomasyon sistemine bağıllık, istenen geometrik şekillerin istenen özelliklerinin kontrollü bir şekilde oluşturulabilmesi (gözenek boyutu, gözenekler arası bağlantı kontrolü), çeşitli malzemelerle biyomürekkep geliştirip kullanılması olarak gösterilebilmektedir. Biyomürekkep içine eklenebilecek proteinler, büyüme faktörleri ve ilaçlarla birlikte ilk anda ortamda bulunması istenen hücre sayısının ayarlanarak tekrarlanabilir üretim sunması tekniğın diğeri avantajlarıdır (Vijayavenkataraman, Yan, Lu, Wang, & Fuh, 2018).

3B biyoyazıcı tekniğı yukarıda sayılan üstün özelliklerinden dolayı kendi pazarını oluşturmuş (Şekil 2.4) ve sektörde ilaç keşfinde, kozmetik testlerde, doku yenilenmesinde ve tıbbi cihaz ürünlerinde kullanılmaktadır (http-1).



Şekil 2.4. Biyoyazıcı uygulamaları küresel pazar dağılımı (http-1, 2017)

2.3.1. 3B baskının dijital modellenmesi

3B biyobaskının ilk aşaması üretilmek istenen doku/organın dijital tasarımının oluşturulmasıdır. Bilgisayar destekli tasarım (CAD) yazılımı kullanılarak üretilmek istenen parçanın dijital modeli hazırlanmaktadır. Son yıllarda karmaşık yapıların dijital 3B modellere dönüştürmek için dijital tarayıcılar kullanılmaktadır. Tarama

teknolojilerinde karmaşık ve hasarlı dokuları görüntülemek için manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve bilgisayarlı tomografi (BT) gibi klinik görüntüleme teknolojileri kullanılmaktadır. Böylelikle insan vücudunda bulunan karmaşık yapılar görüntülenebilmekte ve hastaya özel modeller, implantlar ve doku iskeleleri geliştirilebilmektedir. Dijital ortamda tasarlanan tüm modeller öncelikle 3B modelin yüzey geometrisini birbirine bağlı mozaik dil dosyası (STL) formatına dönüştürülmesi gerekmektedir. STL formatında çizilen veya taranan 3B modeller 3B biyoyazıcı/yazıcı sistemlerinde basılabilmektedir (Raman & Bashir, 2015).

2.3.2. 3B biyoyazıcı tipleri ve özellikleri

İlerleyen teknolojiyle birlikte yeni biyoyazıcı tipleri üretilmeye ve geliştirilmeye devam etse de temel olarak 4 farklı biyoyazıcı tipi bulunmaktadır. Bunlar farklı teknikler kullanarak 3B karmaşık şekilleri üretmeyi sağlamaktadırlar. Biyoyazıcı tipleri kullandıkları tekniklere göre isimlendirilmiştir. Bu teknikler ekstrüze etme, mürekkep gibi püskürtme, lazer ile kabarcık oluşturma, fotopolimerizasyonla karmaşık şekiller oluşturabilmektedir.

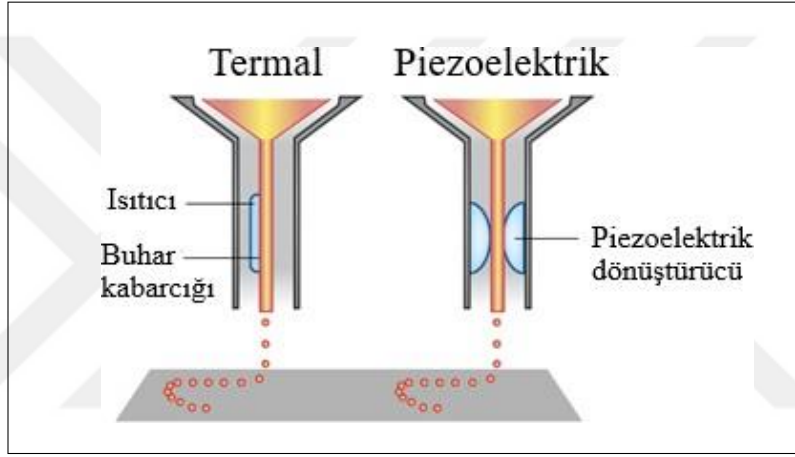
2.3.2.1. Mürekkep püskürtme temelli biyoyazıcı

Biyolojik baskı uygulamaları için kullanılan ilk mürekkep püskürtmeli biyoyazıcılar, ticari olarak satılan 2B mürekkep tabanlı yazıcıları temel almaktadır. Kartuştaki boyar madde, biyomalzemeye (biyomürekkep) değiştirilmekte ve üçüncü boyutu oluşturmak için (x-y eksenlerine ek olarak) z ekseninin kontrolünü sağlayan yükseltici kademe sisteme dahil edilmektedir. Böylelikle kontrollü bir şekilde yüksek hassasiyette, istenilen bölgeye istenilen hacimlerde damlacıklar gönderilebilmesi mürekkep püskürtmeli biyoyazıcı ile sağlanmaktadır. Mürekkep püskürtmeli biyoyazıcılar, son yapıyı destekleyebilen veya bir parçasını oluşturabilen bir alt tabakaya sıvı damlalarını püskürtmek için ısı (termal) veya akustik kuvvetler (Şekil 2.5) kullanmaktadır (Murphy & Atala, 2014).

Termal mürekkep püskürtmeli yazıcılar, elektrikle nozul ucunu ısıtarak oluşan buhar kabarcıklarını basınç ile yüzeye iletmektedir. Bu sıcaklık 200-300 °C arasında değişmektedir. Termal mürekkep püskürtmeli yazıcıların avantajları arasında yüksek baskı hızı, düşük maliyet ve geniş kullanılabilirlik bulunur. Bununla birlikte, hücreleri ve

malzemeleri termal ve mekanik gerilmeye maruz bırakma riski, düşük damlacık yönü, stabil olmayan damlacık boyutu, nozulda sık tıkanma sorunları 3B biyo-baskıda kullanımı için önemli dezavantajlar oluşturmaktadır (Murphy & Atala, 2014).

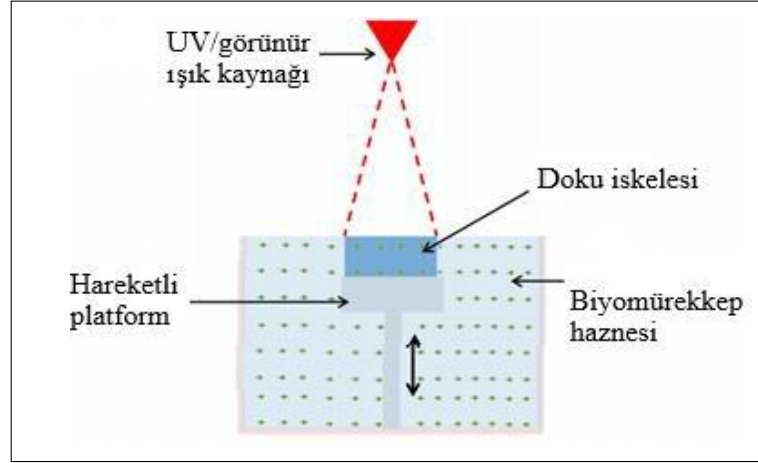
Piezoelektrik destekli mürekkep püskürtmeli yazıcı içerisinde, sıvıyı düzenli aralıklarla kabarcıklara ayırmak için nozzle içinde akustik bir dalga oluşturan bir piezoelektrik kristal bulunmaktadır. Bu kristale voltaj uygulandığı zaman hızlıca şekil değiştirir. Bu sayede biyomürekkebi kabarcık halinde iletme için gereken akustik basınç oluşmaktadır (Murphy & Atala, 2014).



Şekil 2.5. Mürekkep püskürtme temelli biyoyazıcının çalışma prensibi (Murphy & Atala, 2014)

2.3.2.2. Stereolitografi temelli biyoyazıcı

Işığa duyarlı polimerler kullanılarak Ultraviyole (UV) veya görünür ışığın yönlendirilmesi ile 3B doku/organ modeli oluşturabilen tekniğe “Stereolitografi” denilmektedir. Bu teknikte diğer tekniklere kıyasla nozul kullanılmaktadır. Katmanlı 3B yapının oluşmasını sağlayan fotopolimerizasyon aşaması Şekil 2.6’da görüldüğü gibi monomer haznesinin uç noktasında ışık enerjisiyle gerçekleşmektedir. Her katman polimerize edildikten sonra yapıyı destekleyen platform aşağı indirilerek üstte yeni bir katmanın fotopolimerizasyonu sağlanabilmektedir (Kačarević, ve diğerleri, 2018).

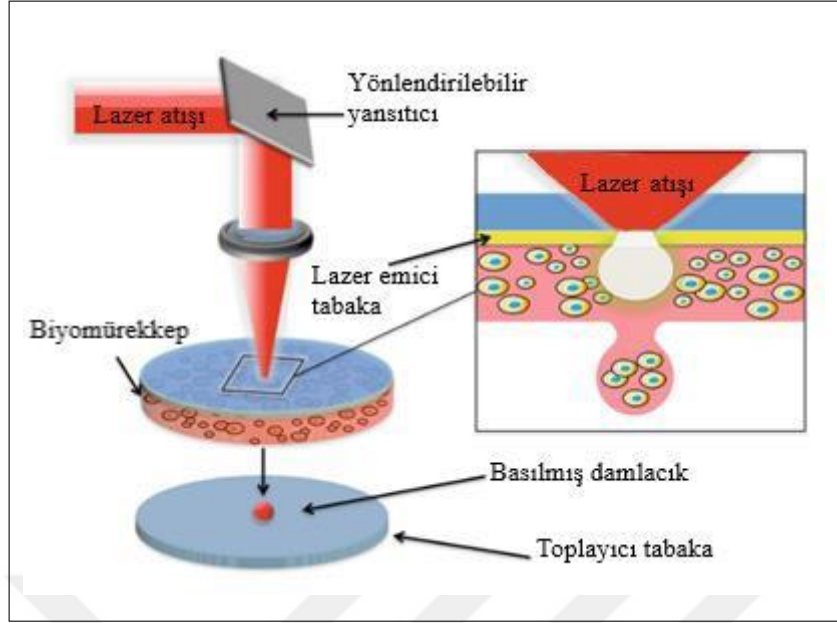


Şekil 2.6. Stereolitografi temelli biyoyazıcı bileşenleri (Kačarević, ve diğerleri, 2018)

Bu teknikte polimerizasyonu başlatan fotobaşlatıcılar, ışık enerjisine maruz kaldıklarında reaktif maddeler oluşturan ve bir malzemenin monomerleriyle reaksiyona girerek polimer zincirlerinin oluşumunu başlatan kimyasal moleküllerdir. Fotobaşlatıcıların derişimi 3B modelin sertliğini ve yoğunluğunu doğrudan etkilemekle beraber sitotoksik etkileri bulunmaktadır. Buna ilave olarak UV ışığın hücreler üzerindeki toksik etkisi, bu tekniği sınırlamaktadır. Görünür ışık fotobaşlatıcısı olan Eosin Y, UV ışık fotobaşlatıcısı olan Irgacure 2959'a kıyasla daha az toksik etki göstermesinden dolayı stereolitografi tekniğinde daha çok tercih edilmekte ve dezavantajları gidermek için alternatif yöntemler geliştirilmektedir (Kačarević, ve diğerleri, 2018).

2.3.2.3. Lazer destekli biyoyazıcı

Bu baskı yöntemi lazer kaynaklı ileri transfer (LIFT) etkisine dayanmaktadır. LIFT tabanlı biyoyazıcılar genellikle darbeli bir lazer ışını, bir odaklama sistemi, üzerine ince bir biyomürekkep tabakasının yayıldığı lazer emici bir metal tabakası ile kaplanmış bir şerit (şeffaf cam slayt) ve şeride bakan bir alıcı substrattan oluşmaktadır (Şekil 2.7). Lazer destekli biyoyazıcının fiziksel prensibi, darbeli lazer ışını ile metal filmin buharlaşmasına ve daha sonra şerit halindeki biyomürekkep kabarcık oluşturarak yüzeye transfer olmaktadır (Hakobyan, ve diğerleri, 2020).

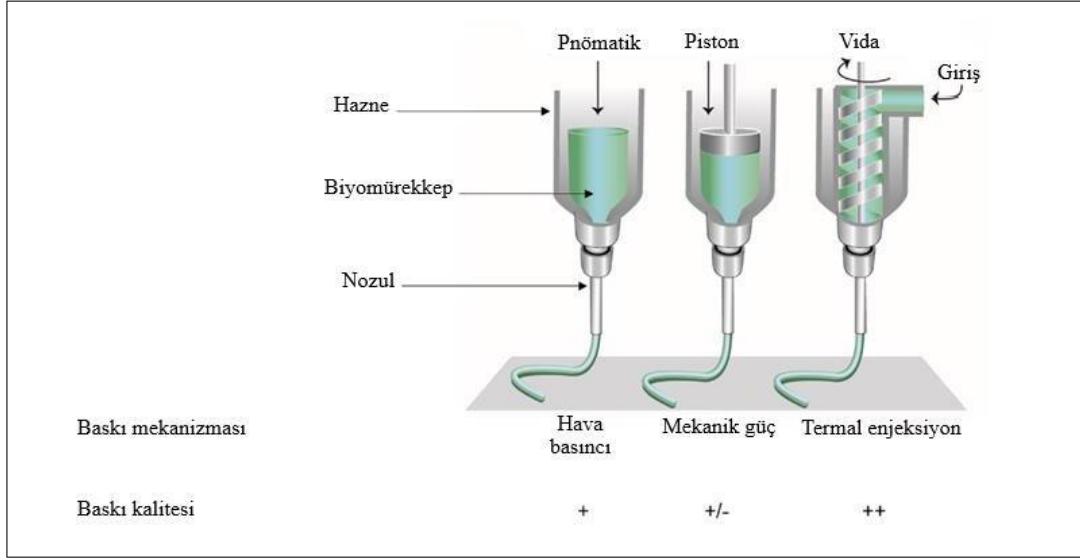


Şekil 2.7. Lazer destekli biyo-baskı (LAB) teknolojisinin şematik gösterimi (Hakobyan, ve diğerleri, 2020)

Bu teknikte yüksek hassasiyette (pikolitre seviyesinde) transfer gerçekleştirilebilmesi ve doku mühendisliğinde hücrelerin karmaşık doku yapılarını taklit ederek 3B organizasyonunu sağlayabilmesi nedeniyle gelecek vaat etmektedir. Tekrar üretilebilirlik ve yüksek verimlilik sağlaması bu tekniğin avantajıdır (Hakobyan, ve diğerleri, 2020).

2.3.2.4. Ekstrüzyon temelli biyoyazıcı

Farklı formlardaki malzemenin (hidrojel, yarı katı polimer vs.) bir hazne içerisinden dar alana doğru sıkıştırılarak fiber oluşturulmasına “ekstrüzyon” denilmektedir. Ekstrüzyon tabanlı biyo-baskının temel avantajı, in vivo implantasyonu sağlanabilen 3B doku mimarileri oluşturabilmesidir. Ekstrüzyon temelli biyoyazıcı cihazı x,y,z eksenlerinde hareket ederek haznesinde bulunan biyomürekkebi ekstrüde ederek tasarlanan 3B modeli katman katman üretilmesinde kullanılmaktadır. Biyürekkebi sıkıştırarak iletmek için 3 farklı çeşitte ekstrüzyon mekanizması (Şekil 2.8) bulunmaktadır. Bunlar pnömatis, piston ve vida temelli biyomürekkep enjekte etme sistemleridir (Schwab, ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.8. Ekstrüzyon temelli biyoyazıcı çeşitleri, mekanizması ve özellikleri (Schwab, ve diğerleri, 2020)

Pnömatik tabanlı enjeksiyon sistemi, hava basıncı ile enjeksiyonu kontrol edilmekte ve yüksek basınç etkisiyle yüksek viskoziteye sahip biyomürekkepleri bile fiber halinde enjekte edebilmektedir. Diğer enjeksiyon sistemlerinde hava basıncı yerine mekanik (vida ve piston kaynaklı) kuvvet uygulanmaktadır (Schwab, ve diğerleri, 2020).

Ekstrüzyon temelli baskı yönteminin avantajı, yüksek yoğunluklu hücre içeren biyomürekkeplerin basılabilmesidir. Bu tip biyoyazıcılarda nozzle çapı küçüldükçe, biyomürekkep viskozitesi ve biyobaskı basıncı arttıkça hücrelerin canlılıklarının azaldığı bildirilmektedir. Bu nedenle, baskıdan sonra yüksek hücre canlılığını sağlamak için nozulun boyutu ve basınç seviyesi dikkatlice seçilmelidir. Yüksek viskoziteli biyomürekkepler nozul ucunda damlacık oluşumunu önlemek ve düz filamentler oluşturulması için önemlidir (Özbolat, 2016). Ekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcı ile 30 ila 3×10^7 mPa/s arasında değişen viskozitelerdeki biyomürekkep basılabilmesi, biyomürekkep seçimi için geniş bir yelpaze sunmaktadır (Huh, Yoo, Atala, & Lee, 2020). Bu sayede 3B doku/organ üretiminde çeşitli özelliklere sahip biyomürekkeplerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Yukarda bahsedilen lazer destekli, mürekkep püskürtme ve ekstrüzyon temelli biyoyazıcı çeşitlerinin özelliklerinin karşılaştırması Tablo 2.2’de verilmiştir ((Murphy & Atala, 2014); (Hözl, ve diğerleri, 2016)).

Tablo 2.2. *Biyoyazıcı tekniklerinin karşılaştırması (Hölzl, ve diğerleri, 2016)*

Özellikler	Biyoyazıcı Tipleri		
	mürekkep püskürtme temelli	ekstrüzyon temelli	lazer destekli
Malzeme viskozitesi	3,5-12 mPa/s	30 mPa/s viskoziteden 6 x107 mPa/s kadar	1-300 mPa/s
Jelleşme tekniği	kimyasal ve foto çapraz bağlama	sıcaklık, kayma incelmesi, kimyasal ve foto çapraz bağlama	kimyasal ve foto çapraz bağlama
Hazırlanma süresi	yavaş	normal	hızlı
Baskı hızı	hızlı (1-10000 kabarcık/s)	yavaş (700 mm/s ila 10 mikron/s arası)	yarı hızlı (200-1600 mm/s)
Çözünürlük/ damlacık boyutu	50 mikron kabarcık boyutu	5 mikrondan 1 mm'ye kadar genişlik	mikron boyutta çözünürlük
Hücre canlılık	>%85	%80-90	>%95
Hücre yoğunluğu	düşük 10 ⁶ hücre/ml	yüksek, hücre kapsülleri	normal, 10 ⁸ cells/ml
Baskı maliyeti	düşük	normal	yüksek

Her üretim tekniğinin kendi içerisinde avantajları ve sınırlamaları bulunmaktadır. Bu özellikler ise Tablo 2.3'te bahsedilmiştir (Khoeni, ve diğerleri, 2021).

Tablo 2.3. *3B biyoyazıcı tekniklerinin avantajları ve sınırlamaları (Khoeni, ve diğerleri, 2021)*

Biyoyazıcı Teknikleri	Avantajları	Sınırlamaları
Ekstrüzyon Temelli Biyoyazıcı	- Yüksek doğruluk ve çözünürlüklü baskı kabiliyeti, bağımsız hareket edebilme yeteneği, - çok yönlü kullanımı, - maliyet etkinliği, - çeşitli biyomalzemeleri aynı anda basabilme yeteneği, - kullanıcı dostu, - cihazın sterilizasyonu mümkündür.	- Baskı esnasında (nozül ucunda) kayma gerilmesinin neden olduğu hücre hasarına neden olabilir, - Biyolojik olarak basılmış yapıların kararlılıkları sınırlıdır.
Mürekkep temelli biyoyazıcı	Üretim hızı yüksek, düşük maliyetli, bir seferde birden fazla biyo-baskı yapabilme özelliği bulunmaktadır.	- Çalıştırması ve bakımı zor, - sık sık nozül tıkanması yaşanabilir, - düşük viskoziteli biyomürekkeplerle sınırlıdır.

Tablo 2.3. (Devam) 3B biyoyazıcı tekniklerinin avantajları ve sınırlamaları

Stereolitografi temelli biyoyazıcı	• Üretim hızı, • Yüksek kararlı ve çözünürlüklü pürüzsüz yüzeyler oluşturabilme kabiliyeti bulunmaktadır.	• Biyolojik bağlantılar fotopolimerler olmalıdır. • Kullanılan foto çapraz bağlayıcılar toksiktir. • Birden fazla biyomalzemeyi aynı anda basması zordur.
Lazer destekli biyoyazıcı	• Nozul bulunmaması, hücreleri yüksek çözünürlüklü dağıtabilme yeteneği bulunmaktadır.	• Düşük akış hızı ve biyomürekkep kısıtlaması bulunmaktadır. • Çok yüksek sıcaklık (1.400 °C'ye kadar) gereklidir. Çalıştırılması zor ve kurulumu pahalıdır.

2.3.3. 3B biyoyazıcı baskı parametreleri

Biyomürekkep geliştirilirken veya kullanırken geometrik kararlılığa ve hücre canlılığına dikkat edilen çeşitli baskı parametreleri bulunmaktadır. (Tezin kapsamı ekstrüzyon temelli biyoyazıcı sistemi olduğu için baskı parametreleri buna göre incelenmektedir.) Nihai baskı öncesinde basım sıcaklığına, süresine, uygulanan basınca/kuvvete, basım hızına ve nozul ucunun iç çapına karar verilmesi gerekmektedir. Bu parametreler biyomürekkebin kayma kuvvetlerini etkilediği için hücrelerin canlılığını korumasında önemli rol oynamaktadır. İğne ucunun çapının artırılması kayma gerilmesini azaltmakta böylelikle hücrel hasar azaltılabilmektedir. Fakat iğne ucunun çapının çok geniş olması geometrik kararlılığı azaltarak istenilen 3B yapının oluşmasını engellemektedir. Uygulanan basıncın artırılması baskıyı kolaylaştırırken filament çapının artmasına neden olmakta ve hücrel canlılığı azaltmaktadır. Baskı hızının artırılması daha hassas ve ince filamentlerin üretilmesini sağlamaktadır. Uygulanan sıcaklık ise biyomürekkebin jelleşme kinetiği üzerine ve viskozite değerlerini etkilemektedir (Merceron & Murphy, 2015); (Ng, Yeong, & Win Naing, 2016); (Webb & Doyle, 2017)).

2.3.3.1. Basılabilirlik

3B ekstrüzyon temelli biyoyazıcıda basılabilirlik kavramı, biyomalzemenin veya biyomürekkebin 3B yapı oluşturma ve yüzeydeki stabilitesi ile ilişkilendirilmiştir. Biyomürekkep baskı esnasında viskoz veya viskoz olmayan haldedir ve baskı sonrasında yüzeyde yayılabilmektedir. Bu durumda 3B yapının mimarisi bozulacağı için

basılabilirliğe uygun kabul edilmemektedir. Basılabilirliği incelemek için yaygın olarak tasarlanan ve basılan şekillerin fiber çapı ile gözenek boyutu karşılaştırılmaktadır. Biyomürekkebin basılabilirliği, yüzey temas açısından, akışkanlık özelliklerinden ve çapraz bağlanma mekanizmasından etkilenebilmektedir (Chen, 2019).

2.3.4. Biyomürekkep özellikleri

In-vitro ortamda doku gelişimini sağlamak için geliştirilen hidrojin biyomürekkep olarak kullanılabilmesi için birkaç özelliği bulundurması gerekmektedir. Öncelikle, biyoyumlu olmalı (hücrelere toksik etki göstermemeli) ve implantasyon sonrası bağışıklık sisteminde yan etki (immün yanıt) oluşturmamalıdır. Diğer bir özellik hücrelerin dokuya özgü HDM üretme kabiliyetini oluşturma ve fonksiyonel doku oluşturma kadar yapıyı destekleyen buna göre uygun bozunma davranışı sergilemesi gerekmektedir. Son olarak biyomürekkebin doğal dokunun HDM benzer veya destekleyecek malzemelerden üretilmesi ve dokunun hacmini korumak için uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır (Merceron & Murphy, 2015).

2.3.4.1. Biyoyumluluk

Biyomürekkebin biyoyumluluğu fonksiyonel doku iskelesi tasarlanırken ve imal edilirken dikkate alınması gereken parametrelerdendir. İmplant edilebilir hücresiz veya hücreli doku ikamelerinin ve 3B biyobaskıda kullanılan malzemelerin biyoyumlu olması önemlidir. Bu özellik kullanılabilecek malzeme sayısını sınırlamaktadır. Seçilen biyomürekkebin hücrelerin tutunmasını, büyümesini, çoğalmasını ve göçünü desteklemelidir. Ayrıca sitotoksik yan etkilere ve immün reaksiyonlara neden olmamalıdır. Karmaşık doku yapılarını oluştururken birden fazla malzemenin kompozit olarak kullanıldığı durumda biyomürekkebi oluşturacak malzemenin seçimi önemlidir. Bunun haricinde malzemelerin özelliklerini değiştirerek biyoyumluluğunu artırmakta mümkündür. Malzemenin kimyasal bileşimi, morfolojisi, yüzey özellikleri (hidrofobik/hidrofilik özelliği, yüzey yükü, yüzey modifikasyonu) biyoyumluluk üzerine doğrudan etkisi bulunmaktadır. Malzemenin mekanik ve biyoyumluluğunu iyileştirmek için polimerler kompozit olarak kullanılabilir. Doku mühendisliğinin doğal dokuyu taklit etme ilkesine göre *in-vivo* ortamdaki HDM yapısına benzer yapı ve

fonksiyona sahip malzemeler geliştirilerek biyouyumluluğu artıran yaklaşımlardan biridir (Mao, ve diğerleri, 2020).

2.3.4.2. Biyobozunurluk

Biyobozunurluk, doku mühendisliği ürünü biyomürekkeplerin ve doku iskelelerinin önemli bir özelliğidir. Biyoyazıcıda basılan hidrojel ve biyomürekkepler suda çözünebilir, toksik olmayan, vücutta karaciğer tarafından metabolize edilebilen ve böbrek yoluyla vücuttan atılabilen monomerler/bileşenlere ayrışması gereklidir. Ayrıca bozunma yan ürünlerinin de dokulara zarar vermemelidir. Biyomürekkepler, hidrolitik reaksiyonlar, iyon değişimi veya enzimlerle bozunabilir. Hidrojellerin bozunma hızının kontrolü birçok yolla sağlanabilir. Hücreler, matris yeniden şekillenme proteazlarının kaynağıdır ve bu nedenle, nispeten daha düşük hücre yoğunlukları ve daha yüksek polimer derişimleri, bozulma sürelerini uzatabilir. Bununla birlikte, hücre yoğunluklarının düşürülmesi, zayıf doku yenilenmesine de yol açabilir. Hidrojel bozunma süresini ayarlayan bir diğer yolu, biyomürekkebin çapraz bağlanma derecesini kontrol etmektir. Bozunma hızını yavaşlatmak veya yeni doku oluşana kadar fonksiyonlarını korumak için biyomürekkep içerisindeki polimer derişimi artırılabilir, kullanılan çapraz bağlayıcı ajanın derişimi artırılabilir ve maruz kalma süresi uzatılabilmektedir (Chen, 2019).

2.3.4.3. Biyomürekkep reolojisi

Reolojik analiz ile biyomürekkep üzerine uygulanan kuvvete karşı oluşan tepki, viskozite ve akışkanlık davranışı incelenmektedir. Viskozite bir malzemenin akmaya karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanmaktadır. Biyobasım esnasında viskozitenin düşmesi ve sonrasında ise biyomürekkebin yapısal bütünlüğünü koruması için reolojik analizler önemlidir. Akışkanın reolojik davranışına göre iki gruba ayrılmaktadır. Birisi newtonumsu akışkan olup değişen kayma hızlarında sabit viskozite sergilemektedir. Newton olmayan akışkan ise viskozitesi kayma hızına göre değişmektedir. Biyomürekkeplerin çoğu Newton olmayan akışkanlardır. Ayrıca biyobasım esnasında uygulanan kuvvetle biyomürekkep içerisindeki polimer zincirlerin yapısal özellikleri değişerek viskozitesi düşmekte ve kayma incilmesi davranışı ortaya çıkmaktadır. Biyomürekkebin viskoelastik davranışı, reometre cihazı ile rotasyon veya salım testleri

kullanılarak analiz edilir. Biyomürekkebin viskozitesi, içerisindeki polimer çözeltisinin derişimi ve moleküler ağırlığı ile ilişkilidir. Yüksek viskozite genellikle düz fiber üretmenin yanı sıra baskı sonrası 3B yapı katmanlarının çökmesini önlemekte ve şekilsel uygunluğunu doğrudan etkilemektedir. Biyomürekkep geliştirirken reolojik analizler yapılması, doku yenilenmesi çalışmaları için biyobasımın viskozite aralığının standartlaştırması ve üretimin tekrarlanabilir olması açısından faydalıdır (Pati, Jang, Lee, & Cho, 2015).

Biyomürekkep geliştirirken yalnızca baskı parametrelerini karşılaştırmak, şekilsel uygunluğunu değerlendirmek yeterli değildir. Yüksek viskoziteli biyomürekkeplerin kayma gerilmesinin fazla olmasından dolayı hücreli baskılarda hücrelerin canlılığını kaybetmesine neden olabilmektedir. Bu yüzden biyomürekkebin hücre canlılığını koruması ve sürdürmesini sağlayacak malzemelerden seçilmesi gerekmektedir (Özbolet, 2016).

3B biyobaskıda biyomürekkeplere gömülü hücrelerle 2B hücre kültürü ortamı karşılaştırıldığına yüksek kayma gerilmesinin hücreleri anlık gerilmelere karşı dayanıklı hale getirmektedir. Çünkü her hücre çeşidi farklı basınçlara karşı dayanıklılık sergilemektedir. Örneğin, kıkırdak dokusunun hücreleri (kondrosit) 1-10 Pa kayma gerilmesinde hücre morfolojisi ve metabolik aktivitesi değişirken, endotel hücreleri ise 1150 kPa'ya kadar kayma gerilimi uygulandığında canlılığını korumaya devam etmektedir (Pati, Jang, Lee, & Cho, 2015).

2.3.4.4. Biyomürekkebin çapraz bağlanma stratejileri

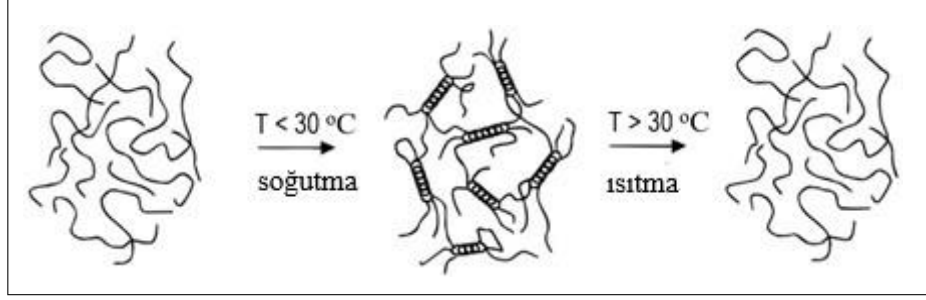
Biyomürekkepler baskı sonrası 3B yapının stabilitesini sağlamak, bozunma süresini uzatmak ve mekanik özelliklerini iyileştirmek için çapraz bağlanabilmektedir. Biyomürekkepler biyoyazıcıda basılmadan öncesinde, sonrasında veya basılırken çapraz bağlanarak yapının stabil kalması sağlanmaktadır. Çeşitli fiziksel ve kimyasal çapraz bağlanma stratejileri (Şekil 2.9) bulunmaktadır. Fotopolimerizasyon ajanları ve çapraz bağlayıcı kimyasal ajanlar biyomürekkebin polimer zincirleri üzerindeki fonksiyonel gruplarını kalıcı olarak çapraz bağlamaktadır. İyonik ve elektrostatik etkileşimler ise biyomürekkebi fiziksel olarak bağlar ve kalıcı değildir. Her bir çapraz bağlanma stratejisi yöntem ve maruz kalma süresine bağlı olarak biyomürekkep içerisindeki hücrelerin canlılığı üzerine olumsuz etki gösterebilir (Aydin, Kucuk, & Kenar, 2020).



Şekil 2.9. *Biyomürekkeplerin baskı öncesi, baskı anında veya sonrasında çapraz bağlama stratejileri; a) UV ışın maruziyeti, b) ısı değiştirme, c) daldırma, d) yüzey spreyleme (Aydın, Kucuk, & Kenar, 2020)*

Fiziksel çapraz bağlanma stratejileri:

Doku mühendisliği alanında kimyasal kontaminasyonları ve bunların toksisite riskini en aza indiren polimerlere olan ilgi artmaktadır. Bu tür polimerik hidrojellerin avantajı, hücreler ve proteinler için uygun taşıyıcı ortam sağlamasıdır. Zıt yüklü polimerler (polielektrolitik), amfolitik polimerler, hidrojen bağı ve iyonik etkileşimler aracılığıyla fiziksel olarak çapraz bağlanabilmektedir. Bazı hidrojeller en az 2 değerlikli iyonlara (kalsiyum vb.) ihtiyaç duyarlar. Çünkü bu iyonlar, zıt yüklü polimerleri (örneğin; aljinat) kendine çekerek iyonik olarak bağlamaktadır. Ortama iyon bağlayıcı (şelat yapıcı) eklendiğinde çapraz bağlanma tersine dönebilmektedir (Hospodiuk, Dey, Sosnoski, & Ozbolat, 2017). Sıcaklığa bağlı olan hidrojellerin konformasyonundaki değişiklikler, farklı sıcaklıklarda fiziksel çapraz bağlanmasını sağlamaktadır. Örneğin çözelti halindeki jelatin sıcaklık değişimine bağlı olarak jelleşebilmektedir. Jelatin soğutulduğu zaman şekil 2.10’da görüldüğü gibi peptit zincirleri arasında sarmal oluşturarak jelleşmektedir. Isıtıldığı zaman ise sarmal yapı açılarak viskozitesi düşmekte ve sıvı forma geçmektedir (Li, ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.10. Jelatinin sıcaklığa bağlı jelleşmesinin şematik gösterimi (Li, ve diğerleri, 2018)

Zıt yüklü polimerlerin etkileşimleri incelenecek olursa, örneğin kitosan katyonik bir polimerdir ve yüzeyinde bulunan amin (NH_2) gruplarının protonlanması ($-\text{NH}_3^+$) ile zayıf asit içerisinde çözünmektedir. Diğer polimerlerin negatif yüklü grupları (COO^- vb.) ile protonlanmış gruplar arasında elektrostatik etkileşim oluşmaktadır (Mndlovu, ve diğerleri, 2020). Ortamın pH değeri bu grupların aktifleşmesi için önemli rol oynamaktadır. Kitosan pH < 6 olduğu zaman pozitif yüklü iken jelatin pH > 4.7 olduğu durumda hem negatif hem de pozitif yüklü amfolitik özellik göstererek negatif gruplar üzerinden kitosana elektrostatik etkileşime girmektedir (Ng, Yeong, & Win Naing, 2016).

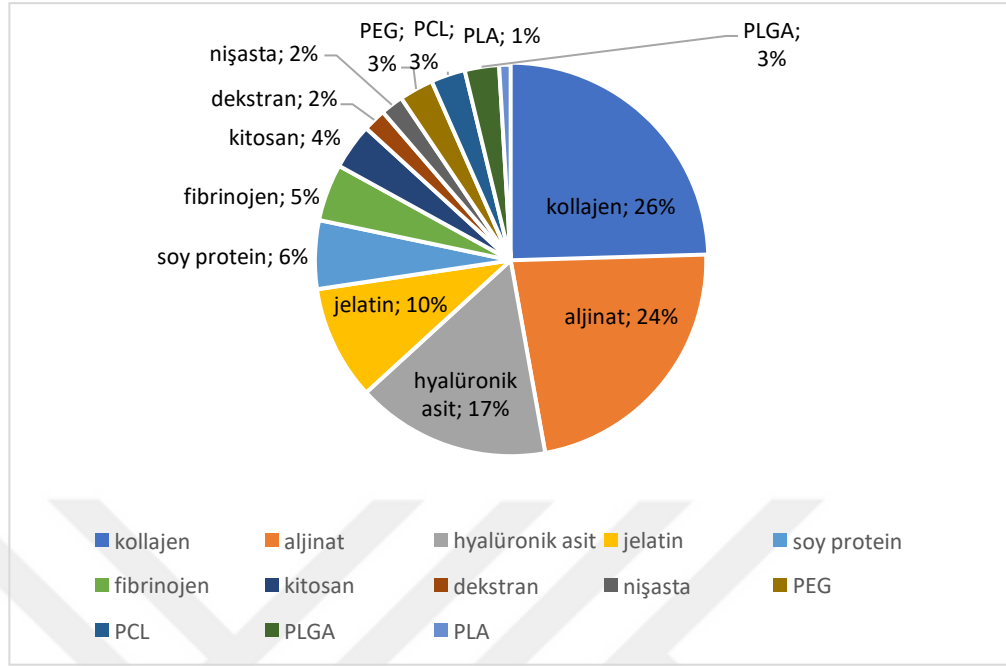
Kimyasal çapraz bağlanma stratejileri:

Hidrojel içerisindeki polimerlerin birbiri arasında bir kimyasal ajan kullanılarak kovalent bağlanmasına kimyasal çapraz bağlanma denir. Fiziksel çapraz bağlama stratejilerine göre daha iyi mekanik dayanıklılık göstermesini sağlar. Bu çapraz bağlama stratejilerinde kullanılan kimyasal ajanlar ve foto çapraz bağlayıcılar hidrojel yüzeyinde sitotoksik etki gösterebilmektedir. Kimyasal çapraz bağlanma mekanizmasında polimerin amin, karbonil, hidroksil fonksiyonel veya aktif grupları üzerinden çeşitli çapraz bağlatıcılar (gluteraldehit, polialdehit, sodyum bikarbonat, formaldehit, karbodiimit, genipin) varlığında tek aşamada veya iki aşamada polimer zincirleri kovalent olarak bağlanabilmektedir (GhavamiNejad, Ashammakhi, Wu, & Khademhosseini, 2020). Çapraz bağlayıcının derişimi çapraz bağlanma derecesini etkilemektedir. Yüksek çapraz bağlanma hidrojin mekanik özelliklerini güçlendirirken bozunma süresini uzatmaktadır (Hospodiuk, Dey, Sosnoski, & Ozbolat, 2017). Düşük çapraz bağlanma derecesi ise bu özelliklerin tam tersi özellik sağlamaktadır.

Fotopolimerizasyon ışık ile aktifleşen monomerlerin çapraz bağlanarak polimerik ağ oluşturmaya denilmektedir. Biyomürekkebin baskı öncesi, baskı esnasında veya sonrasında stabilizasyonunu sağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomürekkep içerisine genellikle foto-başlatıcı ajan ilave edilmektedir. Belirli dalga boyunda enerjiye sahip ışık enerjisi (Ultraviyole/görünür ışık) foto-başlatıcıyı aktifleştirerek yüzeyi akrilat grupları içeren polimerleri (jelatin metakrilat, polietilen glikol dimetakrilat vd.) çapraz bağlayabilmektedir (Hospodiuk, Dey, Sosnoski, & Ozbolat, 2017). Bu stratejinin sınırlayıcı tarafı fotobaşlatıcıların serbest radikal gruplar oluşturmaları ve sitotoksik etki göstermesidir. Bu yüzden çok düşük oranda kullanılması önerilmektedir. Bu durum 3B yapının stabilitesini olumsuz etkileyebilmekte ve şişme oranının artmasına neden olarak implant bölgesinde 3B yapı uyumsuzluğuna neden olabilmektedir. Bu yöntemde kullanılan UV ışıklar da dalga boyuna göre sitotoksik etki gösterebilmektedir. UV-A (320-400 nm) ışığı genetik mutasyonlara neden olabildiği, UV-B ışığın (290-320 nm) CD95 hücre reseptörünü aktifleştirerek hücrelerin ölümüne (apoptoza) neden olabilmektedir. UV ışığın uygulanan dalga boyu ve uygulanma süresi önemlidir (Serna, ve diğerleri, 2019).

2.3.5. Biyomürekkep tasarımı ve bileşenleri

Doku mühendisliğinde fonksiyonel biyobaskı ürünü elde etmek için biyomürekkebin uygun biyomalzemelerden hazırlanması kritik öneme sahiptir. Biyomürekkepler, hem doğal hem de sentetik biyomalzemelere dayanmakta fakat basılabilirlik, işlevsellik, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve uygun fiziksel özellik gösteren biyomalzemeler kullanılarak geliştirilmektedir. Seçilen biyomalzemenin baskı işlemlerin uygun olması için jelleşme yöntemi ve viskozitesi önemlidir. Ayrıca hastada bağışıklık tepkisi oluşturmaması için biyouyumlu ve biyobozunur olmalıdır. Mekanik özelliklerinin oluşturulan dokuya uygun olması ve malzemelerin dokuya özgü HDM yapısını taklit etmesi gerekmektedir. Bu özellikleri sağlamak için doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan doğal (kollajen, aljinat, hyaluronik asit, jelatin, soy proteinler, fibrin, kitosan dekstran, nişasta vd.) ve sentetik polimerlerden (PLGA (polilaktikoglikolik asit), PCL (polikaprolakton), PEG (polietilenglikol), PLA (polilaktik asit) vd.) faydalanılmaktadır. Şekil 2.11’de bu polimerlerin biyobaskıda kullanım oranları verilmektedir (Hacıoğlu, Yılmaz, & Ustundag, 2018).



Şekil 2.11. *Biyobaskıda biyomürekkep bileşeni olarak doğal ve sentetik polimerlerin kullanım oranları (Hacıoğlu, Yilmazer, & Ustundag, 2018)*

Biyomürekkep bileşenlerini seçerken HDM yapısını taklit etmek için çoğunlukla polimerik malzemeler seçilmektedir. Sentetik polimerler mekanik dayanımı artırmak ve bozunma süresini uzatmak için tercih edilse de doğal polimerlere kıyasla daha zayıf biyoyumluluk sergilemektedirler. Doğal polimerler ise hücrelerin tutunması, çoğalması ve göçünü teşvik eden üstün özellikleri sebebiyle daha çok tercih edilmektedir. Zayıf mekanik özellik dezavantaj oluştursa da daha önce bahsedilen çapraz bağlama stratejileri ile stabilitesi güçlendirilebilmektedir.

2.3.5.1. Çok bileşenli veya katkılı biyomürekkepler

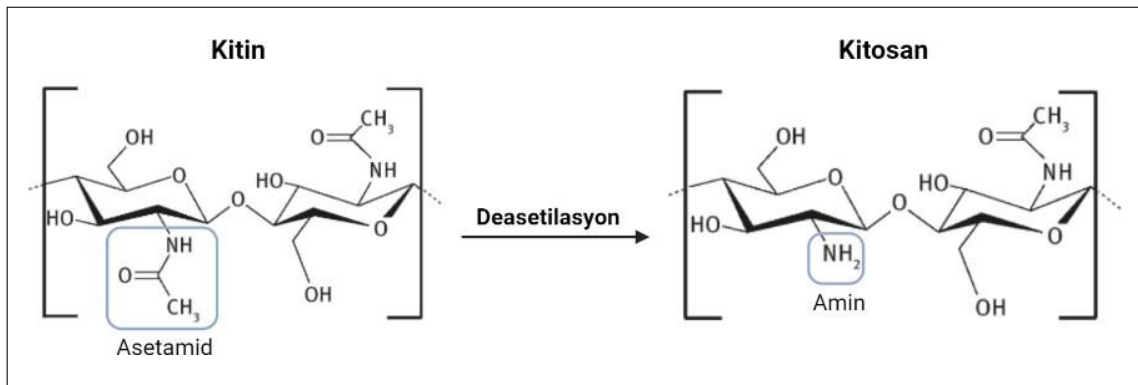
Tek polimerden veya bileşenden oluşan biyomürekkepler özellikle ekstrüzyon temelli biyobaskı için basılabilirliği zorlaştırmaktadır. Bu nedenle son yıllarda araştırmacılar biyomürekkebin basılabilirliğini, şekilsel uygunluğunu ve biyolojik özelliklerini iyileştirmek için iki veya daha fazla biyomalzemeden oluşan çok bileşenli biyomürekkeplere odaklanmaktadır (Cui, ve diğerleri, 2020). Bu özellikleri iyileştirmek için nanomalzemelerden (nanotüpler, nanopartiküller), metaller ve seramiklerden faydalanılarak nanokompozit yapılar oluşturulabilmektedir. Nanokompozitler

kullanılarak geliştirilen çok bileşenli biyomürekkepler, nanoyapıların benzersiz özellikleri sayesinde yenilikçi 3B biyoyazıcı ve biyobaskı araştırmalarında kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Can, ve diğerleri, 2020).

Nano boyuttaki biyoaktif malzemeler, hücrelerin yapışmasını indükleyebilir, farklılaşmasını sağlayabilir ve hücresel davranışı yönlendirebilmektedir. Örneğin, biyomürekkebe nanolifler ilave edildiği takdirde protein adsorbsiyonunu, hücrelerin yapışmasını ve mezenkimal kök hücrelerin (MKH) kondrojenik farklılaşmasını sağlamaktadır. Nanofiberlere nano boyutta hidroksiapatit eklendiği takdirde ise mekanik özellikleri artırdığı ve ekilen MKH'ler osteojenik farklılaşmaya yönlendirmektedir (Prasopthum, Shakesheff, & Yang, 2018); (Di Marzio, Eglin, Serra, & Moroni, 2020)). 3B biyoyazıcılar ile nanoteknolojinin sinerjik etkileşimi yeni çalışmaların ortaya çıkmasını teşvik etmektedir. Bu çalışma kapsamında biyomürekkep üretiminde kitosan ve jelatin polimerleri ve hBN nanopartikülleri kullanılmıştır.

2.3.5.2. Kitosanın özellikleri

Kitinin deasetillenmiş formu olan kitosan (Şekil 2.12); karides, yengeç ve ıstakoz gibi kabukluların dış iskeletinde bulunan bir polisakkarittir. Değişken sayıda rastgele yerleştirilmiş N-asetil glukozamin gruplarına sahip d-glukosazin kalıntılarına bağlı (β -1-4) glikozidik bağlardan oluşan doğrusal yapıya sahip doğal bir polimerdir (Saravanan, Leena, & Selvamurugan, 2016).



Şekil 2.12. Kitinin deasetilasyon işlemi ile kitosana dönüşümü (Saravanan, Leena, & Selvamurugan, 2016)

Hücre dışı matristeki GAG'lara benzerlik göstermektedir. Kitosan, vücut içerisinde toksik bileşen oluşturmada bozunması, bağ dokusunun tedavisinde, kemik oluşumunu hızlandırıcı ve kanama durdurucu etkisi, antimikrobiyal aktivitesi, hücrelerin tutunabileceği ortam sağlaması, anti-kanser, anti-kolesterol gibi üstün özellikleri bulunmaktadır.

Kitosan ve türevlerinin dikkat çeken en önemli özelliği antimikrobiyal aktivitesidir. Kitosan, antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktiviteye sahiptir. Kitosanın çözelti pH değerleri 6'dan düşük çözeltilerde glukozamin bileşeninin ikinci karbonundaki amino grubu ($-NH_2$) proton bağlayıp pozitif yüklü ($-NH_3^+$) forma dönüştüğünden kitosanın antimikrobiyal aktivitesi kitine göre daha yüksektir. Molekül ağırlığı (MA) ve deasetilasyon derecesi (DD) kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmektedir. Kitosanın DD ve MA değerleri (Tablo 2.4), çözünürlüğünü, kristal yapısını, biyobozunurluğunu, viskozitesini, biyoyumluluğu, antimikrobiyal aktivitesi, hemostatik ve antioksidan özellikleri dahil olmak üzere polimerin kimyasal ve biyolojik özelliklerini doğrudan etkilemektedir (Yıldırım, Öncül, & Yıldırım, 2016); (Duru, ve diğerleri, 2017)). Kitosan DD'si ne kadar yüksek olursa, hücre yapışması o kadar güçlü olmaktadır (Mao, ve diğerleri, 2004). Kitosanın üstün özelliklerinin yanı sıra fibroblastlar gibi HDM'yi yenileyen ve kollajen üreten hücrelere karşı bazı sitostatik özelliklere sahiptir (Galli, ve diğerleri, 2016). Kitosanın sitotatik etkileşim göstermesi hücrelerin bölünmesini engelleyerek hücrel aktivitenin yavaşlamasına neden olabilir.

Tablo 2.4. Kitosanın bazı özellikleri üzerine molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesinin etkisi (Yıldırım, Öncül, & Yıldırım, 2016)

Özellik	Deasetilasyon derecesindeki artışın etkisi	Molekül ağırlığındaki artışın etkisi
Çözünürlük	Artar	Azalır
Kristal Yapısı	Azalır	Artar
Biyobozunurluk	Azalır	Azalır
Viskozite	Artar	Artar
Biyoyumluluk	Artar	-

Antimikrobiyal özellik	Artar	Azalır
Antioksidan özellik	Artar	Azalır

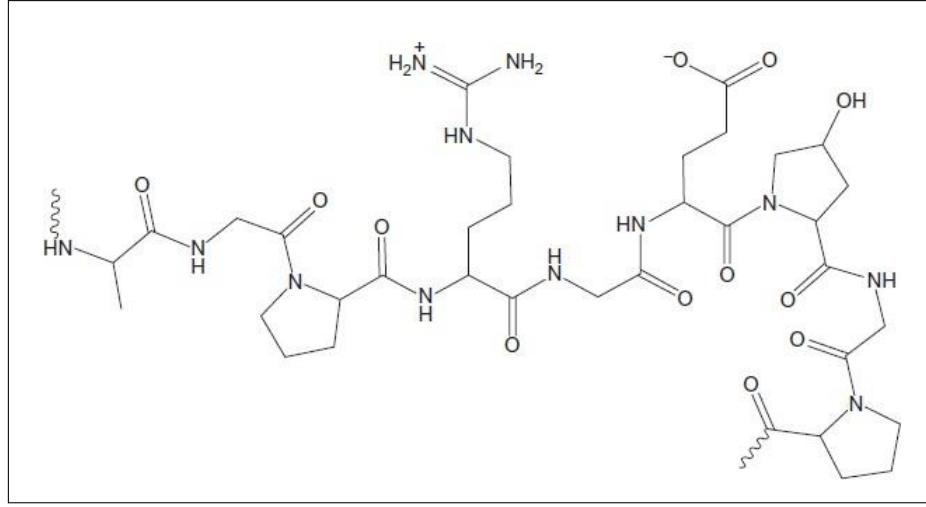
Bettini ve arkadaşları, kitosanın su içeriğini artırmak için sükröz veya rafinozla zenginleştirilmiş çözeltiler kullanılarak kitosanın modifiye edilmesiyle hücre yanıtlarının iyileştirilebileceğini bildirdi (Bettini, Romani, Morganti, & Borghetti, 2008).

Kitosanın düşük su tutma kapasitesi nedeniyle jelleşmeden hemen sonra ortamda hacim kaybetmesi biyomalzeme üretiminde dezavantaja oluşturmaktadır. Bu yüzden tek başına kullanılmasını sınırlamakta ve kompozit olarak kullanılması önerilmektedir.

Kitosan antimikrobiyal özelliğinin yetersiz kaldığı durumlarda gram negatif ve gram pozitif patojen bakterilere karşı metal oksit (Perelshtein, ve diğerleri, 2013) veya hekzagonal bor nitrür (hBN) ile bu özelliği artırılabilir. Deri yüzeyinde bulunan patojenik *E.coli* ve *S. Aureus* (metisilin dirençli) karşı polihidroksialkonat (PHA), kitosan ve hBN (70 nm) kompoziti incelenmiş PHA-kitosanın birlikte kullanımı bakteri inhibisyonunda yetersiz kaldığı %1 hBN nanopartiküllerinin ilavesiyle hem antibakteriyel hem de insan keratinosit (HaCaT) hücrelerine karşı düşük sitotoksik etki göstermiştir (Mukheem, ve diğerleri, 2019).

2.3.5.3. Jelatinin özellikleri

Hayvan kaynaklı deri, kemik, tendonlarında bolca bulunan kollajenin kısmi hidrolizi ile elde edilen yarı saydam, biyoyumlu, biyobozunur ve doğal bir polimerdir. Kollajenin dayanıklılığını artıran moleküller arası bağlar ve zincirler arası hidrojen bağları jelatin üretimi esnasında kırılarak kısa zincirli polipeptid zincirleri oluşmaktadır. Ağırlığının 5-10 katı sıvıyı içerisinde hapsedip şişebilme özelliği sayesinde kolaylıkla hidrojel oluşturur. Jelatinin (Şekil 2.13) amino grupları pozitif yüklü iken karboksil grubu negatif yüklü olmasından dolayı amfoterik davranış sergilemektedir (Kariduraganavar, Kittur, & Kamble, 2014). Jelatin termal-tersinir özelliğe sahiptir. Çözeltisini hazırlamak için 40 °C sıcaklık kullanılırken jel haline dönüştürmek için 30°C altına soğutulması gereklidir. Isıya duyarlı yapısı itibarıyla kovalent bağlı olmayan yapılar kolaylıkla ısıyla kırılabilir ve fiziksel çapraz bağlı jeller oluşturulabilmektedir (Li, ve diğerleri, 2018).



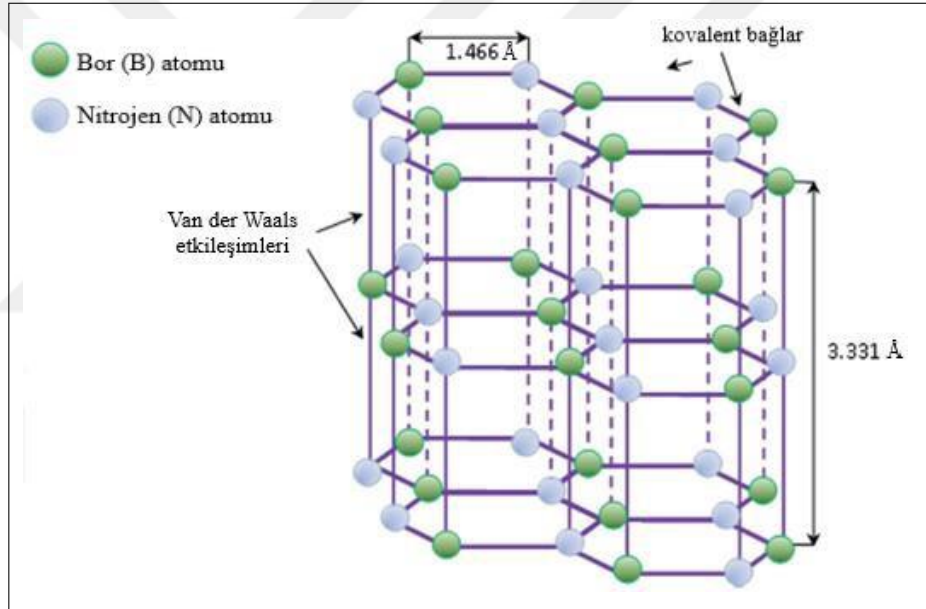
Şekil 2.13. Jelatinin moleküler yapısı ve aktif grupları (Kariduraganavar, Kittur, & Kamble, 2014)

Jelatinin peptid zincirindeki amino asitler, glisin (%30) ve prolin/hidroksiprolin (%25) bakımından oldukça zengindir. Ayrıca hücrelerin tutunmasında ve çoğalmasında aktif rol oynayan RGD-benzeri motifleri içermesi nedeniyle jelatinin doku mühendisliği alanında değerli bir malzeme haline getirmiştir. Jelatinin reseptör tanıma motifi olan RGD bölgeleri, iki değerlikli (Mg^{+2} vb.) iyonlar aracılığıyla integrine bağlanmaktadır. İntegrinler, hücre-hücre, hücre-HDM etkileşimlerine aracılık eden ve hücre davranışını kontrol eden heterodimerik transmembran hücre reseptörüdür. Bu bölgeler biyomalzemenin yüzey kimyası ve 2B/3B yapısıyla ilişkili olarak hücre yapışmasını teşvik etmektedir (Davidenko, ve diğerleri, 2016). Ayrıca RGD bölgeleri hücrelerin tutunmasının yanı sıra hücrenin canlılığı artırarak hücrelerin çoğalmasını ve göçüne katkı sağlamaktadır (Egorikhina, ve diğerleri, 2020). Jelatin bu özellikleri sayesinde kontrollü ilaç salım sistemleri, biyosensörler ve doku mühendisliği gibi birçok alanda büyük ilgi görmektedir.

Ayrıca jelatinin özelliklerini iyileştirmek için nanomalzemelerle bir araya getirildiğinde yeni fiziko-kimyasal özellikler (gerilme mukavemeti, iletkenlik ve anti-mikrobiyal vd.) kazandırılabilir (Yang, Chaieb, & Hemar, 2021). Polimere yeni özellikler kazandırması nanomalzemelere olan ilgiyi artırmaktadır.

2.3.5.4. Hekzagonal bor nitrürün özellikleri

Genellikle beyaz grafit olarak adlandırılan bor nitrür kendine özgü fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı birçok alanda kullanımı bulunan seramik bir malzemedir. Bor nitrürün morfolojik ve spesifik yüzey alanı sentez yöntemine göre değişiklik göstermektedir. Genellikle yüksek sıcaklık ve/veya yüksek basınç altında sentezlenmektedir. Literatürde bor nitrür nanotüpler, tabakalar ve şeritler gibi çok farklı formlarda üretilebilmektedir. Bor nitrür atomik boyutta bor (B) ile nitrojen/azot (N) arasındaki etkileşimlere bağlı olarak kübik ve hekzagonal (Şekil 2.14) formlarda olabilmektedir. Tablo 2.5'te hBN'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri yer almaktadır (Jedrzejczak-Silicka, Trukawka, Piotrowska, & Mijowska, 2020).



Şekil 2.14. Hekzagonal bor nitrürün moleküler yapısı ve tabakalar arası etkileşimleri (Jedrzejczak-Silicka, Trukawka, Piotrowska, & Mijowska, 2020)

Tablo 2.5. hBN'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Jedrzejczak-Silicka, Trukawka, Piotrowska, & Mijowska, 2020)

Görünüm	Kokusuz, beyaz toz
Kovalent bağ uzunluğu	1.466 Å° (katmanlar arası mesafe 3.331 Å°)
Moleküler ağırlık	24.82 g/mol
Yoğunluk	2.1 g/cm ³
Molekül yapısı	Kristal; hekzagonal
Erime noktası	2973 °C
Yüzey alanı	0,82-30 cm ² /g

Kırılma indisi	1.74
Kararlılık	Kimyasal olarak inert ve stabil
Sertlik	1-2 Mohs
Özgül ısı kapasitesi	19.7 J/(K.mol)
Entalpi	~254.4 kJ/mol
Gibbs serbest enerjisi	~22 kJ/mol
Sürtünme katsayısı	<0,3

Hekzagonal bor nitrür özellikleri, hidrofobiklik, elektronegatif yüzey yükü, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve suda yüksek dağılıbilirlik gibi ilaç dağıtımı ve kanser terapisi dahil biyomedikal uygulamalar için önemlidir.

Elektrik devrelerinde yalıtkan malzeme olarak, ilaç yüklenmesi, kanser tedavisi, hidrojen depolama, su arıtma, kozmetik, nanotıp ve uzay teknolojilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda termal kararlılığa sahip olması, ısıl şoklara dirençli olması ve elektriksel yalıtım özelliğine sahiptir. NIH 3T3 hücrelerine karşı biyoyumlu olduğu belirlenmiştir (Ramirez Leyva, ve diğerleri, 2018).

Bor nitrür nano-tabakaları (BNNS'ler) polimerik kompozitlerde kullanılmaktadır. Örneğin polimetil metakrilat (PMMA) filmin elastik modülü, BN nano-tabakaları polimere dahil edilerek artırılmıştır (Golberg, ve diğerleri, 2010). Aynı zamanda kozmetik endüstrisinde kayganlaştırıcı olarak kullanılan popüler bir inorganik bileşiktir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) raporundan elde edilen veriler, bor nitrürün 643 kozmetik formülasyon bulunmaktadır. Kozmetikte örneğin, göz farı formülasyonunda (%16 BN) ve ruj formülasyonunda (%2 BN) yüksek derişimde BN kullanılmaktadır (Fiume, ve diğerleri, 2015); (Jedrzejczak-Silicka, Trukawka, Piotrowska, & Mijowska, 2020)).

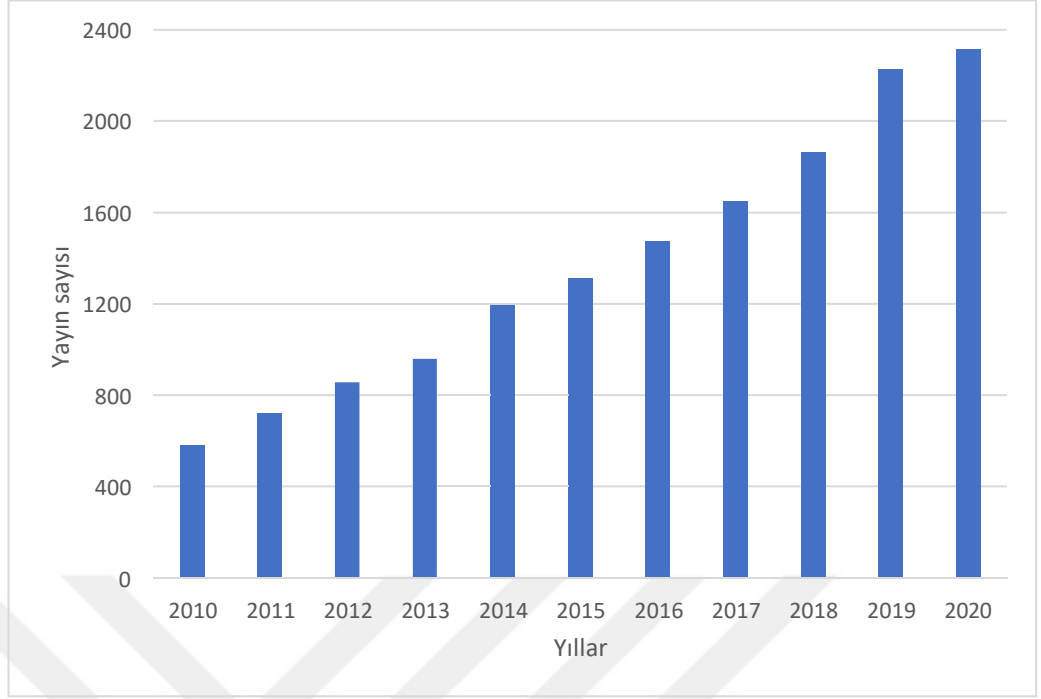
hBN nanopartiküllerinin vücut içerisinde toksik değerlerini incelemek için damar yolu ile wistar albino sıçanlar üzerinde farklı derişimlerde hBN enjekte edilmiştir. Biyokimyasal, hematolojik ve antioksidan değerleri ölçülerek hBN'nin yüksek derişimlerde kullanımının karaciğer, böbrek, kalp, dalak ve pankreas gibi organlara zarar verebileceğini fakat 50-800 mikrogram/kg derişimde toksik olmadığını ve biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceği belirtilmektedir (Kar, ve diğerleri, 2021). Ayrıca hBN bozunma ürünü borik asite dönüşerek parçalanmaktadır. Bu yüzden kullanılan derişim

önemlidir. hBN'ler hücreler için toksik olmayan derişimlerde oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir. Yavaş bozunma özelliğı sayesinde sağık sektöründe kullanılabileceğı vurgulanmaktadır (Taskin, Sen, Emanet, Culha, & Yilmaz, 2020)

In vitro çizik testi sonuçları, hBN'lerin hücre göçünü ve yara kapanmasını pozitif olarak etkilediğini göstermiştir (25 ve 100 µg / mL derişimlerde). HBN'lerle tedavi edilen HUVEC'lerin proliferasyon ve migrasyon kabiliyetinin yanı sıra, anjiyogenez kabiliyeti de düşük derişimde (25 µg / mL) umut verici sonuçlarla ortaya çıktı. Düşük hBN derişimlerinde (100 µg / mL'ye kadar), hBN'lerin hücreleri G2 / M fazında tutmadığı ve hücrelerin DNA sentezinden sorumlu olan S fazına geçmesini indüklediğı gösterilmiştir (Şen, Emanet, & Çulha, 2019).

hBN, farklı endüstri sektörlerinde (ilginç fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı) kullanılabilen çekici bir katmanlı malzemedir. Pul pul ayrılan tabakalı formu bir grafen analogu olarak kabul edilmektedir. Yığın halindeki hBN, zayıf bir şekilde çözünürdür ve su / sulu çözeltilerde hidrofobik bir karakter sergilemektedir. Bu nedenle hBN hazırlama (örn., pul pul dökülme, işlevselleştirme), özellikle in vitro ve / veya in vivo uygulamalarda gerekli olan en iyi özellikleri sergileyen bir nanomalzeme elde etmek için çok önemlidir. Sunulan birkaç katmanlı hBN bazlı nanokompozitlerin biyolojik çevre üzerindeki etkisi, test edilen hücrelerin tipine, işlevlerine ve hücrelerin bu nanopartiküllere maruz kalma süresine bağılı olarak değişebilmektedir. hBN katkılı nanokompozitlerin biyomedikal uygulamalarda kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Jedrzejczak-Silicka, Trukawka, Piotrowska, & Mijowska, 2020).

“Scopus” veritabanında göre “hexagonal boron nitride” ve “hBN” kelimeleri konu bazlı taratıldığında yıllara göre yapılmış olan yayın sayısı (Şekil 2.15) dinamik bir artış sergilemektedir. Yayın sayısındaki artışın bu konu hakkında yapılan çalışmaların hızlandığını göstermektedir. Bu malzemenin üstün özellikleri kullanım alanlarının çeşitlendirmekle birlikte yeni kullanım alanları ortaya çıkarmaktadır (Shtansky, Firestein, & Golberg, 2018).



Şekil 2.15. Yıllara göre hBN içeren makalelerin sayısı

Belirli derişimlerdeki hBN'nin biyouyumlu olması ve diğer özellikleri sayesinde diğer sektörler gibi sağlık sektöründe de kullanımı yaygınlaşmaktadır. Doku mühendisliği alanında biyomalzemelerin özelliklerini iyileştirmek amacıyla kompozit olarak kullanılabilmesi, 3B biyoyazıcılarda biyomürekkep olarak kullanımının önünü açmaktadır (Aki, ve diğerleri, 2020).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Kitosan (100-300 kDa, >%75 Deasetilasyon) ACROS, Jelatin (250 bloom, sığır kaynaklı, Tip B) Kimbiotek A.Ş., hBN (150 nanometre) BORTEK A.Ş. ve diğer kimyasallar Sigma Aldrich'den temin edilmiştir.

Karakterizasyon ve deney süreçlerinde şu cihazlar; FTIR-ATR (Bruker Tensor 27, Almanya), SEM (Zeis Supra 50 VP), DSC (DSC Q2000 TA-instruments, ABD), 3B biyoyazıcı (Envisiontech 3D-Bioplotter), Stereo mikroskoplar (Leica M26, Zeiss Stemi 508), Reometre (Anton Paar MCR-102), Partikül analiz cihazı (Malvern Instrument, Hydro 2000G, İngiltere), XRD (Rigaku miniflex 600, Japonya), Yüzey temas açısı ölçer (Krüss DSA 100, Almanya), Liyofilizatör (Operon FDB 7003, Kore), Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Four e's), Su banyosu (Daihan MaXturdy18), Hassas Terazî (Radwag AS 220 R2), Etüv (Binder ED53) ve Floresan mikroskobu (LEICA DM2500) deney yaparken ve karakterizasyonda kullanıldı.

3.2. Deneylerin Yapılışı

Deneyler; biyomürekkeplerin hazırlanması, basılabilirlik analizleri ve biyomürekkebin özelliklerinin karakterizasyon şeklinde yer almaktadır.

3.2.1. Biyomürekkep bileşenlerinin ön hazırlığı

Biyomürekkebi oluşturan polimer çözeltileri (jelatin ve kitosan) ve hBN nanopartikülleri ayrı ayrı hazırlandı.

3.2.1.1. *Biyomürekkep polimerlerinin hazırlanması*

Kitosan çözeltisi, Roehm ve Madihally ısıya duyarlı jelatin-kitosan hidrojel çalışmasından faydalanılarak hazırlandı (Roehm & Madihally, 2017). 0,25 M asetik asit içerisinde %5 kitosan çözeltisi; 2 gram kitosan 40 mL asit içerisinde 60 °C 6 saat çözünmesi için 250 rpm manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Viskozite yükselince su banyosu içine alınıp 60 °C sıcaklıkta 90 rpmde çalkalandı. Kirlilik ve safsızlıkları

uzaklaştırmak için 4000 rpmde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant +4 °C derecede saklandı.

Jelatin çözeltisinin hazırlanması; jelatin su veya fosfat tamponu (PBS) içerisinde alınarak %10 ve %15 derişimde hazırlandı. Çözünmesi için 40 °C derecede 1 saat boyunca 90 rpm çalkalamalı ortamda inkübe edildi.

3.2.1.2. hBN çözeltisinin hazırlanması

hBN hassas terazide tartıldı ve % 0,1 derişimde olacak şekilde 15 mL distile suya ilave edildi ve karıştırıldı. Ardından hBN sulu çözeltisi 5 dakika vortekslenip 50 mL cam şişe içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak 24 saat 350 rpm hızda karıştırıldı. Daha sonra 5 dakika ultrasonik su banyosunda (35 kHz) bekletildi. (Süpernant kısmı alınıp partikül boyut görüntülemesi stereo mikroskopta yapıldı). 24 saat sonra çöken kısımlar alınmadan askıda duran hBN kısımları toplandı (Ayrıca dipte çöken kısım etüvde kurutulup tartılarak ağırlıkça kayıp miktarı belirlendi) ve 12-13 mL otomatik pipetle çekilip manyetik karıştırıcıya alındı. hBN üst fazları 50 mL şişe içerisinde birleştirildi ve homojen olana kadar 500 rpm hızda 1 saat karıştırıldı.

Polimerler ile hBN sulu çözeltisi doğrudan karıştırılması çözeltilerin son derişimini değiştireceği için jelatin, hBN sulu çözeltisi içerisinde çözündürüldü. 18 mL hBN üzerine 2 gram jelatin eklenerek 20 mL %10 jelatin-hBN (JBN) çözeltisi hazırlandı (20 mL kullanılmamasının nedeni jelatinin kendi hacminin olmasıdır). 17 mL hBN üzerine 3 gram jelatin eklenerek 20 mL %15 JBN çözeltisi hazırlandı. JBN çözeltileri hazırlanırken jelatinin çözünmesi ve homojen dağılımı sağlamak için 1 saat boyunca 40 °C derecede ve 90 rpm hızda çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. Jelatinin %5 ve %7,5 derişimde hBN ile reolojik etkileşimi ve basılabilirlik durumu değerlendirildi.

3.2.2. Biyomürekkebin hazırlanması

İyonik olarak bağlı jelatin-kitosan hidojelleri (JK) atfedilen yöntemle hazırlandı (Ng, Yeong, & Win Naing, 2016). JKBN hidrojelini hazırlamak için distile su içerisinde disperse edilmiş hBN (ağ. %0,1) nanopartiküllerinin üst fazı kullanılarak (yaklaşık %0,076), jelatin içerisinde hidrojele karıştırılmıştır. Kitosan (%5), jelatin (%10/15), jelatin-hBN (J; %10/15, hBN; %0,076) ile 1:1 oranında karıştırıldı ve jelatinin son

derişimlerine göre (5JK, 5JKBN, 7,5JK, 7,5JKBN) gruplandırıldı. Biyomürekkepler jelatin derişimindeki değişikliğe ve hBN içeriğine göre adlandırıldı (Tablo 3.1). Biyomürekkepler, pH değeri sodyum hidroksil (1 molar) ve PBS (10x) ile pH 5 ila 6 arasına yükseltildi.

Tablo 3.1. *Biyomürekkep adlandırılması ve bileşenleri*

Biyomürekkep Kodları	Biyomürekkep bileşenlerinin son derişimi
5JK	%5 Jelatin ve %2,5 Kitosan içerir.
5JKBN	%5 Jelatin %2,5 Kitosan ve yaklaşık %0,038 hBN içerir.
7,5JK	%7,5 Jelatin ve %2,5 Kitosan içerir.
7,5JKBN	%7,5 Jelatin %2,5 Kitosan ve yaklaşık %0,038 içerir.

3.2.3. Biyomürekkebin 3B baskı öncesi reolojik özelliklerinin incelenmesi

Biyomürekkepler reometre cihazının 5 cm çapındaki standının üzerine 1 cm çapında yerleştirildi ve 1 mm y kselikten konik milin dönmesiyle biyomürekkeplerin viskozitesi 25  C sabit sıcaklıkta 0,01-100 shear/s dönme hızında mekanik etkiye bağlı viskozite değişimi incelendi.

Biyomürekkeplerin viskoelastik özelliklerini incelemek için aynı cihaz ile amplitude modunda 10 rad/s ve %1 strain oranıyla mekanik mukavemet uygulandı. Bu esnada biyomürekkeplere 25 ila 40  C derece arasında sıcaklık uygulanarak her 1  C’de 1 ölüm alacak şekilde elastikiyet modülü (G’) ve kayıp modülü (G’’)  l mleri alındı ve viskoelastik davranışları incelendi.

3.2.4. Biyomürekkebin basılabilirliği ve 3B biyoyazıcıyla doku iskelesi  retimi

3B biyoyazıcıyla (Envisiontech 3D-Bioplotter) biyobaskı öncesi hidrojellerin baskı hızı ve kalitesini incelemek için jelatin ve kitosan ile optimizasyonu yapılmış çalışma referans alınarak parametreler belirlendi (Ng, Yeong, & Win Naing, 2016). Biyomürekkepler sabit sıcaklıkta (28  C) ve 0,5-2,4 bar basınçta, farklı baskı hızları (10,15 ve 20 mm/s) ile 25G iğne uçlu veya konik nozul kullanıldı ve yaklaşık 1 cm uzunluğunda şeritler bastırılarak test edildi. Basılan şeritlerin çapları dikkate alınarak doku iskelesi basımı öncesi biyomürekkeplerin basılabilirlik parametreleri incelendi.

Biyomürekkeplerin basılabilirlik değerlendirmesi sonucunda gözenekli doku iskelesi dış boyutları 15 mm x 15 mm ve iki fiber arası boşluk ise 1,5 mm olacak şekilde CAD programında  ızıldı ve belirlenen optimum baskı hızı ve uygun basınçta malzemeler üretildi. Daha sonra stereo mikroskop ile doku iskeleleri görüntülendi ve ImageJ programıyla gözenekli ağ yapıları incelenerek biyomürekkeplerin basılabilirliği (Pr) değerlendirildi (O'Connell, ve diğerleri, 2020).

Baskı sonrası iyonik olarak bağlı JK ve JKBN grupları üzerine stabilizasyonu artırması için %1 glutraldehit  eker ocak altında püskürtülerek uygulandı. Çapraz bağlanmış gözenekli doku iskelesi 10 dakika sonra PBS ile 3 kez yıkanarak ortamdaki fazla çapraz bağlayıcı uzaklaştırıldı. Doku iskeleleri -20  C'de dondurulduktan sonra liyofilizatör cihazı ile -70  C'de 16 saat boyunca vakum altında kurultuldu. Kurutulmuş doku iskeleleri 4  C sıcaklıkta saklandı.

3.3. Deneylerin ve Malzemelerin Karakterizasyonu

Biyom rekkepleri, bunları oluşturan bileşenleri ve doku iskelelerinin fiziksel ve kimyasal karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

3.3.1. hBN partikül analizi

Partikül boyut analizi cihazı (Malvern Instrument, Hydro 2000G) ile 500 rpm karıştırma hızında %70 ultrasonik ortamda hBN partikül boyutu belirlendi.

3.3.2. hBN XRD analizi

Bu analiz ile malzemenin içerdiği fazları belirlenmekte, nicel faz analizinde, sıcaklık, basınç ve fiziksel parametrelere bağlı faz değişimlerinde tanecik boyutu, tanecik yönelimi ve kimyasal kompozisyonu belirlemede ve örgü sabitlerini bulmada kullanılabilmektedir. X ışını kırınımı cihazı (Rigaku miniflex 600) tarafından hBN yapısı ve moleküler içeriği değerlendirildi. hBN içerisinde safsızlık olup olmadığı incelendi.

3.3.3. Biyomürekkep ve bileşenlerinin fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektrometresi ile analizi

Polimerlerin birbiri arasında ve arasındaki etkileşimleri incelemek için FTIR Spektrometresi (Bruker Tensor 27) kullanılarak incelendi. Biyomürekkep içerisindeki hBN nanopartikülleri, jelatin ve kitosan polimerleri kuru ve hidrojel formları hazneye yerleştirildi. Daha sonra $700-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda ATR modu kullanılarak spektrumlar alındı. Ölçümler üç kez tekrarlandı.

3.3.4. Differansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

DSC analizi (DSC Q2000 TA-instruments), kuru kitosan ve jelatinin haricinde jelatin-kitosan (5JK) ve jelatin-kitosan-hBN (7,5JKBN) biyomürekkeplerinin sıcaklığa karşı davranışı incelendi. Ayrıca bu biyomürekkeplerin basım sonrası çapraz bağlanmış doku iskelesi halleri de test edildi. DSC analizi 50 mL/dk azot akışında $10\text{ }^{\circ}\text{C/dk}$ sıcaklık artışı ile $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ila $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında malzemelerin bozunma sıcaklıkları değerlendirildi.

3.3.5. Biyomürekkep bileşenlerinin yüzey temas açısına etkisinin belirlenmesi

Hazırlanan biyomürekkeplerin (5JK, 5JKBN, 7,5JK, 7,5JKBN) yüzey temas açısını ölçebilmek için 3B doku iskelesi üzerinden yüzeyinin gözenekli olması temas açısının net olarak belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu yüzden düz zemin oluşturan ince filmler halinde hazırlanıp temas açısının ölçüldü. Alüminyum folyo üzerine ince film olacak şekilde biyomürekkepler yayıldı ve etüv içerisinde $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 16 saat inkübe edilerek kurutuldu. Krüss DSA 100 cihazı ile kurutulmuş filmler üzerine farklı noktalara belirli hacimde su damlatılarak temas açısı belirlendi.

3.3.6. Doku iskelelerinin su tutma kapasitesi

Çapraz bağlanmış ve çapraz bağlanmamış doku iskelelerin şişme davranışı, nötr pH'da olan fosfat tampon (PBS) kullanılarak test edildi. PBS içerisinde 6 saat bekletilen doku iskeleleri süre sonunda fazla su üzerinden alınarak tartıldı. Kuru ağırlığı ve 6 saat sonraki ıslak ağırlığı üzerinden şişme oranı belirlendi. Malzemeler, 3 tekrarlı yapılmış olup ortalamalarındaki sapmalar $\pm$ olarak ifade edildi. Su tutma oranları aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır. W_s ; son ağırlığı, W_o ; ilk ağırlığı temsil etmektedir.

$$W = (W_s - W_o) / W_o$$

3.3.7. Doku iskelelerinin biyobozunurluk testi

Kurutulmuş çapraz bağlı doku iskelelerinin vücut içerisinde bozunma davranışını taklit etmek için nötr pH fosfat tampon (PBS) içerisine malzemeler alınır, 37 °C sıcaklık ve 50 rpm çalkalamalı ortamda 1, 2, 4, 7 ve 14 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası malzemeler kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları tartılarak bozunma oranı hesaplandı. Malzemeler, 3 tekrarlı yapılmış olup ortalamalarındaki sapmalar +/- olarak ifade edildi. (W_d; kurutulduktan sonraki ağırlık, W_o; başlangıç kuru ağırlık). Bozunma oranları şu şekilde hesaplanır;

$$W_d (\%) = ((W_o - W_d) / W_o) \times 100$$

3.3.8. Doku iskelelerinin biyoyumluluk testi

3B biyobaskı sonrası çapraz bağlanmış doku iskeleleri liyofilize edildikten sonra hücrelere karşı biyoyumlu olduğunu kanıtlamak için canlı-ölü boyama yöntemi kullanıldı. Canlı-ölü boyama öncesinde doku iskeleleri %1 penisilin-streptomisin antibiyotiği ile güneşirisi inkübe edilerek dezenfeksiyonu sağlandı ve fosfat tamponu ile yıkama yapıldı. Ardından her doku iskelesine 1,1x10⁵ adet 3T3 fare fibroblast hücreleri (NIH / 3T3 (ATCC® CRL-1658™)), %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM f-12 besiyeri kullanılarak ekildi. Hücre ekilmiş doku iskeleleri 7 gün boyunca 37 °C'de, %5 CO₂ %99 bağımlı nem ortamında inkübe edildi. Daha sonra doku iskelesi üzerindeki hücrelerin canlılığını incelemek için canlı-ölü boyama kiti (Live or Dead™ Fixable Dead Cell Staining Kit, ATT Bioquest) kullanılarak hücreler besiyeri içerisinde 37 °C'de ve %5 CO₂ kültüre ortamında karanlıkta 1 saat Calcein-AM (2 µM)/PI (4 µM) ile inkübe edilerek hücreler canlılık şartları sağlanarak (canlı boyama) boyama yapıldı ve fosfat tamponu ile yıkayıp floresan mikroskopunda (Carls Zeiss Axio Bioobserver D1) floresan boyalı hücreler görüntülendi ((Samie, ve diğerleri, 2020); (Mora-Boza, Włodarczyk-Biegun, Del Campo, Vázquez-Lasa, & Román, 2020)).

3.3.9. 3B doku iskelesinin stereo mikroskop görüntülemesi ve analizi

Biyomürekkepler doku iskelesi basıldıktan sonra Leica M26 marka stereo mikroskop ile x0,63 ve x0,8 kat büyütmede görüntülendi. Daha sonra kurutulmuş çapraz bağlı doku iskeleleri stereo mikroskopta (Zeiss, Steremi 508) görüntülenerek karşılaştırıldı. Görüntüler ImageJ programı ile baskı kalitesi, gözenek çevresi ve alanı dikkate alınarak incelendi.

3.3.10. 3B doku iskelesinin SEM görüntülenmesi

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile çapraz bağlı ve çapraz bağlı olmayan kurutulmuş doku iskeleleri yüzey morfolojisi ve gözenek yapısı incelendi. Kurutulmuş doku iskeleleri karbon bant üzerine sabitlendi ve altın (Au)-paladyum (Pd) kaplamak için manuel püskürtmeli kaplama cihazı (Agar Sputter Coater) ile 20 saniye boyunca kaplandı ve görüntülenmesi yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Biyomürekkep Bileşenlerinin Ön Hazırlığı

4.1.1. hBN çözeltisinin hazırlanması ve dispersiyon çalışmaları

Çalışmalara hBN su içerisinde dağıtılarak başlanması gereklidir. Çünkü hBN su içerisinde çökme eğilimi göstermektedir. Biyomürekkebin bileşeni olarak kullanılabilmesi için pul pul ayrılmasını ve disperse olma oranının artırılması gerekmektedir. hBN %1 derişimin altında çalışılması, hücreler için toksik etki göstermemesinden dolayı distile su içerisinde disperse olma çalışmaları %1-0,1 oranları arasında çalışıldı (Mukheem, ve diğerleri, 2019). Karıştırma ve ultrasonikasyon işlemleri sonrasında, deneylerde sadece %0,1 derişimin altında suda askıda kaldığı ve homojen dağıldığı tespit edilmiştir. Sadece karıştırma veya vorteks işlemi hBN çözeltisini hazırlamak için yeterli değildir. Ultrasonikasyon işlemi dahil edildiği taktirde yapının disperse olmasına kolaylaştığı gözlemlendi. Sulu hBN çözeltisi hazırlandıktan sonra disperse olmayan ve çöken alt fazdaki hBN miktarını belirlemek için falkonların darası alınıp kaydedildi. Daha sonra dipte kalan 2-3 mL çökmüş hBN kuru miktarı 75 °C de 24 saat etüvde kurutularak belirlendi. Bu hesaplamaya göre; 15 mL hBN için %0,1 kullanıldığında 15 mg hBN kullanılmıştır. Çöken kuru hBN miktarı ise 3,5 mg'dır. Buna göre su içerisinde hBN yaklaşık %0,076 oranında iyi disperse olduğu belirlenmiştir.

4.1.2. Biyomürekkep polimerlerinin hazırlanması

Kitosan düşük su tutma kapasitesi nedeniyle jelleşmeden sonra ortamda hacim kaybetmesi gibi sınırlamalar bulunmaktadır. Ayrıca tek başına kullanılması fibroblast hücrelerine karşı biyouyumluluğunun az olduğu belirtilmektedir. Bu yüzden kitosanı farklı bir polimer ile su tutma kapasitesini artırmayı sağlayarak biyomürekkebin baskı sonrası stabilizasyonu sağlanması hedeflenmiştir. Ayrıca Ng ve arkadaşları (2016) jelatin ve kitosanın belirli bir pH aralığında polimer zinciri üzerinde pozitif ve negatif gruplar oluşturarak iyonik bağlanma ile jelleşmenin daha kararlı olacağını belirtmişlerdir. Ng, aynı zamanda yüksek viskozitede olan kitosan (%2,5) ve jelatin (%7,5) ile basımın zor olduğu belirtilmektedir (Ng, Yeong, & Win Naing, 2016). Bu bilgiler doğrultusunda kitosan ve jelatin hazırlandı. Kitosan 0,1-0,25 M asetik asit içerisinde çözündürülmeye

bırakıldı. Sıcaklık uygulanmasına rağmen 0,1 M asetik asitte kristallenmeler ve çözünmeme durumu gözlemlenirken asitlik derecesi artırılarak 0,25 M asetik asit muamelesinde sıcaklık ve karıştırmanın etkisiyle homojen olarak çözündüğü gözlemlendi. Ayrıca ortamdaki kirlilikler santrifüj edilerek ortamdan uzaklaştırıldı (Roehm & Madihally, 2017). Jelatin hem su hem de PBS içerisinde hazırlanabilme kolaylığına sahip olması pH ayarlama ve hBN nanopartiküllerinin biyomürekkep içerisine eklenmesini kolaylaştırdığı gözlemlendi.

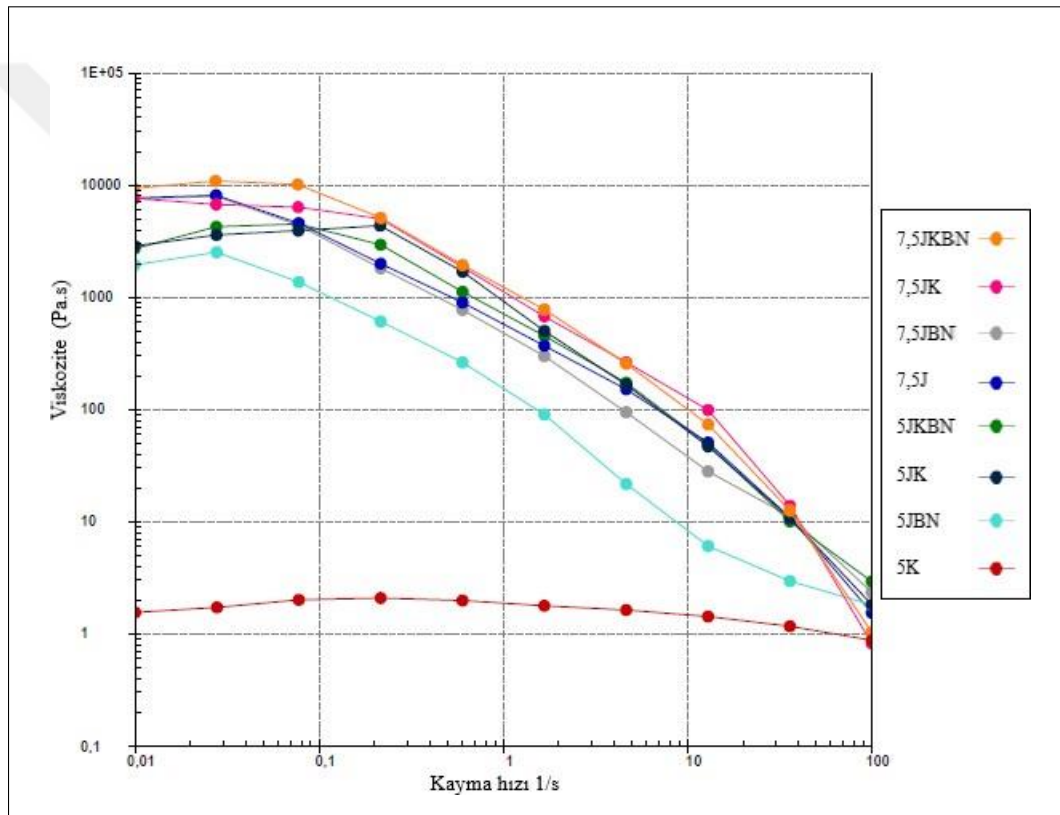
4.2. Biyomürekkep Hazırlanması

Oda sıcaklığında viskozitesi yüksek olan polimer çözeltileri karışmanın zor olduğu gözlemlendi ve homojen olabilmesi için 80 °C sıcaklıkta karıştırıldı. PBS içerisinde çözündürülen jelatin pH değeri 7 iken kitosan ile karıştırılması durumun da pH 4'e düşmektedir. Düşük pH'da JK çözeltileri akışkan halde iken pH 5-6'ya yükseltildiğinde jelleşerek daha viskoz hale gelmektedir. JK çözeltilerinin iyonik olarak bağlandığı, şişe içerisinde ters çevrilerek akmaya karşı direnç ile fiziksel olarak gözlemlendi. Biyomürekkep hazırlanırken hBN doğrudan JK çözeltisi içerisine eklendiğinde homojen dağılım sağlanmamaktadır. Ayrıca viskozitedeki artış hBN'nin pul pul dağılmasını engellemektedir. Bu yüzden sulu hBN, suda çözünebilir jelatin ile karıştırılarak çok bileşenli biyomürekkep içerisine dahil edildi. Böylelikle homojen dağılım sağlanmaktadır. Biyomürekkepler karşılaştırmak için Ng ve arkadaşları (2016) tarafından optimizasyonu yapılmış 5JK grubu ile basımı zor olan 7,5JK grupları ve bunların hBN içeren grupları hazırlandı. Tüm gruplar pH 5-6 aralığına yükseltildiğinde viskozite artışı gözlemlendi (Ng, Yeong, & Win Naing, 2016).

4.3. Biyomürekkebin 3B Baskı Öncesi Reolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Biyomürekkep adaylarının 25 °C sıcaklıkta viskozite değişimi (Şekil 4.1) öncelikle JK grubunu oluşturan %5 kitosan (5K) ve %7,5 Jelatin (7,5J) çözeltileri incelendi. Kitosan çözeltisi akmaya karşı zorlandığında newtonumsu akış sergilediği, jelatin çözeltisinin ise uygulanan stres altında newton olmayan davranış sergilemektedir. Jelatin içerisine hBN eklenen gruplar (5JBN, 7,5JBN) 7,5J grubu ile karşılaştırıldığında belirli kayma hızlarında viskoziteyi düşürme davranışı sergilemediği gözlemlendi. Kayma hızı yavaş (0,01-0,1/s aralığında) olduğunda malzemeler üzerinde direnç oluşturarak

viskozitesinde artış olarak yansımaktadır. 7,5J grubunun başlangıç viskozitesi 5JK ve 5JKBN gruplarından daha yüksek olsa da içerisinde %5 jelatin olmasına rağmen iyonik bağlanmış biyomürekkeplerin mekanik strese karşı viskozitesi daha yüksek olduğu görülmektedir. 7,5JK ve 7,5JKBN, kayma hızı 30/s olana kadar yüksek viskozite davranışını korumaktadır. Yüksek viskoziteye sahip 7,5JKBN ve 7,5JK gruplarının strese karşı davranışı optimizasyonu yapılmış 5JK grubuna kıyaslandığında ekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcıda basılırken uygulanacak baskı parametreleri (baskı basıncını, baskı hızını vd.) ayarlandığı takdirde biyomürekkep olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

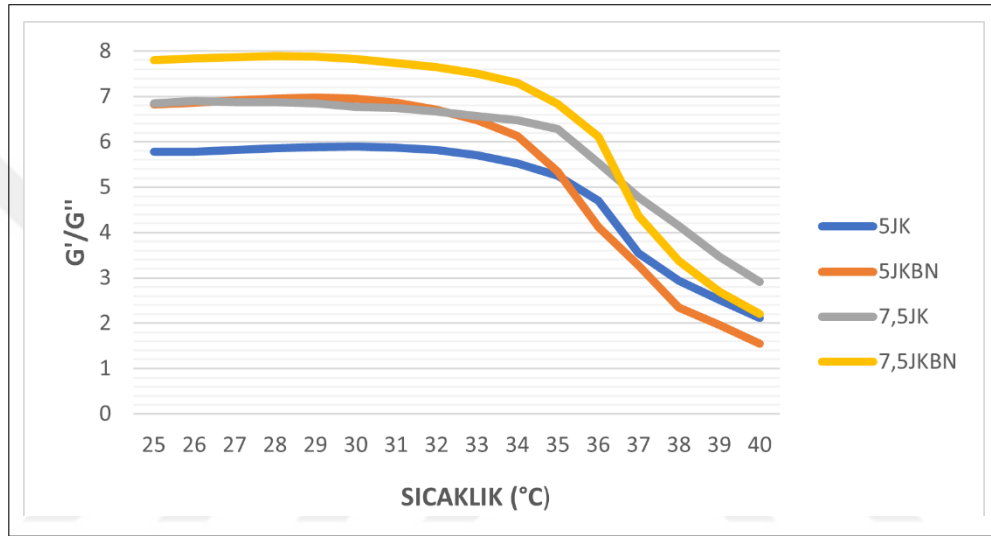


Şekil 4.1. Biyomalzemelerin mekanik strese karşı viskozite değişim grafiği

Biyomürekkepler durağan halde viskoz fakat akmaya zorlandığında viskozitesi düşerek akışkan hale gelmesi ve stres uzaklaştığında tekrar viskoz hale geçmesi beklenmektedir. Çünkü baskı sonrasında stabil şekil oluşturması için viskozitenin tekrar yükselmesi gerekmektedir (Bedell, Navara, Du, Zhang, & Mikos, 2020). Biyomürekkebin viskoelastik davranışı baskı sonrası stabilizasyon hakkında bilgi vermektedir. G' (elastikiyet; depolama modülü) ve G'' (kayıp modülü) biyomürekkebin karakteristik özelliğini ve viskoelastisitesi belirlemektedir. G'/G'' oranı eğer " >1 " ise

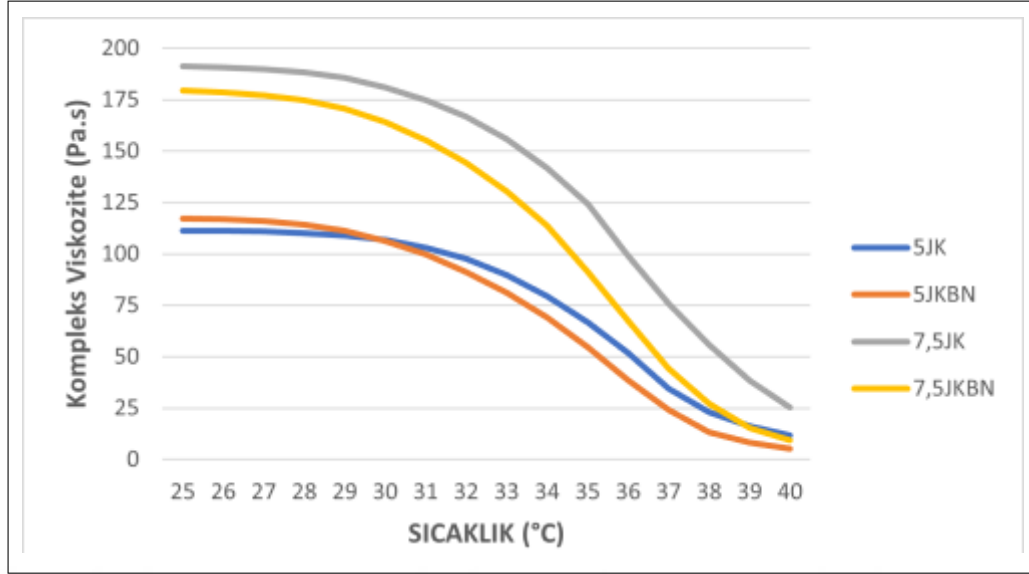
şekilsel doğruluğunun iyi olduğu belirtilmektedir (Ng, Yeong, & Win Naing, 2016). Çünkü G'/G'' oranı “<1” ise malzeme jel özelliğini kaybederek istenmeyen sıvı/akışkan forma geçmektedir.

Reoloji ölçümleri sonucunda (Şekil 4.2) hBN içeren JK biyomürekkebinin yüksek derişimde bile biyomürekkep içerisinde ısının dağılmasını sağladığı ve mekanik stres altında basılabilirliği kolaylaştırdığı belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Hidrojelin sıcaklığa bağlı viskoelastik davranışı

Mekanik gerilme altında sıcaklığın artırılarak yapılan reoloji analizinde G'/G'' oranı haricinde malzemenin bu esnada viskozitesindeki değişim incelendi. Bu bulgular doğrultusunda hBN'nin biyomürekkeplerin akışkanlığını artırdığı belirlendi.

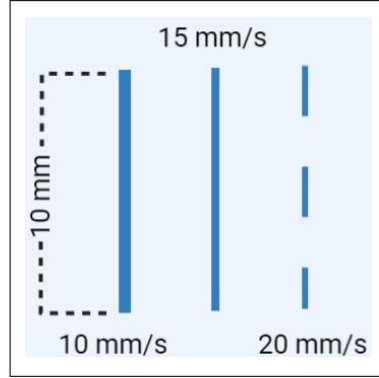


Şekil 4.3. Sıcaklık ve strese bağlı viskozite değişim grafiği

4.4. Biyomürekkebin Basılabilirliği ve 3B Biyoyazıcıyla Doku İskelesi Üretimi

Hazırlanan biyomürekkepler jelatinden dolayı termal jelleşme özelliği göstermektedir. Sıcaklığın yükseltilmesi düşük viskoziteli malzemelerin viskozitesini daha da düşüreceği için bu tip sorunlarla karşılaşılmasına neden olabilmektedir. Burada seçilen sıcaklık jelatinin akışkan halden hazneden ekstrude edilirken ortam sıcaklığının etkisiyle baskı tablası üzerinde soğuyarak katılaşması için istenilen bir sıcaklıktır. Eğer daha yüksek bir sıcaklık seçilirse soğuma gecikecek ve malzeme kendini yanlara doğru şerit kalınlığını artıracaktır. Jelatine uygulanan sıcaklık yapısındaki zincirlerin formunu değiştirmesine neden olduğu bilinmektedir. Bu yüzden G'/G'' tablosundaki kritik sıcaklık seviyeleri kullanılmadan jelatinin jelleşme sıcaklığı olan 28 °C derece baskı sıcaklığı seçilmiştir (Wang, ve diğerleri, 2017). Sıcaklık sabit tutularak diğer baskı parametreleri değiştirilmiştir.

3B doku iskelesi basımı öncesinde filament kalitesini incelemek ve diğer parametreleri belirlemek için baskı hızı analizi yapıldı. 10 mm uzunluğunda şeritler basılarak 28 °C sıcaklıkta 10, 15, 20 mm/s farklı hızlarda baskı hızı ve basıncı belirlenmiştir. Bu bulgulara (Şekil 4.4) göre sıcaklık ve baskı basıncı sabit tutulduğu takdirde biyomürekkepler yavaş hızda basılırsa filament çapı daha kalın ve enine genişlemektedir. Biyomürekkepler hızlı baskı yapılırsa filamentler daha ince olmakta ve sürekliliğini kaybederek kesikli filamentler oluşturmaktadır. En iyi sonuç nozul çapına yakın filament çapı oluşturan baskı hızlarının kullanılmasıdır.



Şekil 4.4. Baskı hızının filament üzerine etkisi

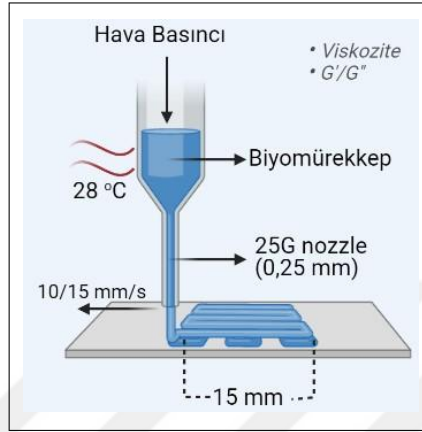
Baskı hızları ayarlanırken aynı zamanda uygun hava basıncının ayarlanabilmektedir. Yüksek hava basıncı biyomürekkebin aşırı birikmesine ve filament çapının artmasına neden olmaktadır. Düşük hava basıncı ise biyomürekkebin daha az enjekte edilmesini ve nozul ucunda birikerek tıkanma gibi problemlerle karşılaşıldı. Basılabilirliği uygun bir biyomürekkep nozul ucunda damlacık oluşturmamalıdır. Bu yüzden damlacık oluşturan J ve JBN grupları biyomürekkep olarak kullanılamamıştır. Biyomürekkeplerin (JK ve JKBN grupları) baskı parametreleri çizgi tekniği sonucunda ideal baskı hızı, baskı basıncı ve nozul cinsi belirlendi (Tablo 4.1). Yüksek viskoziteli biyomürekkeplerin (7,5JK ve 7,5JKBN) iğne tipi metal nozul kullanılarak baskı yapılması durumunda yüksek basınç (2,8-3,4 bar) uygulanması gerektiği gözlemlendi. Bar basıncını düşürmek için konik şekilli plastik nozullar tercih edildi.

Tablo 4.1. Biyomürekkepler ve ideal baskı parametreleri

Biyomürekkep kodları	Baskı basıncı (bar)	Baskı hızı (mm/s)	Nozul cinsi (25 G)
5JK	1,3	15	Metal uç
5JKBN	1	15	Metal uç
7,5JK	1,8-2,2	10	Plastik uç
7,5JKBN	1,2-1,5	10	Plastik uç

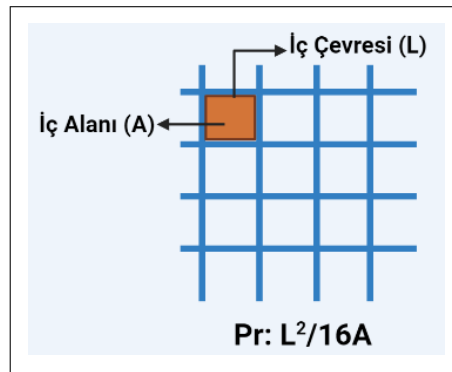
Biyomürekkepler arasında karşılaştırma yapıldığında hBN içeren grupların daha düşük basınçta basılabilirliğinin sağlanması bu malzemenin yüksek viskoziteli biyomürekkeplerin basımını kolaylaştırdığı görülmektedir.

Bu bulgular sonucunda 3B doku iskelelerinin basımı Şekil 4.5'te gösterildiği gibi gerçekleştirildi. Literatürdeki bilgiler doğrultusunda bazı değerlerin (baskı sıcaklığın ve nozul çapının) sabit tutulup diğer parametrelerin değiştirilmesi ideal baskı özelliklerinin belirlenmesini kolaylaştırmaktadır.



Şekil 4.5. 3B doku iskelesinin baskı parametreleri ve biyobasımın şematik görüntüsü.

İdeal baskı parametreleri ile üretilen gözenekli doku iskeleleri Pr değerlerini belirlemek için $Pr = L^2/16A$ eşitliği kullanıldı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Gözenekli doku iskelesinin Pr hesaplamasının şematik gösterimi (O'Connell, ve diğerleri, 2020)

ImageJ programıyla görüntü analizi yapılarak doku iskelesinin gözeneklerinin iç çevresi ve iç alanı hesaplandı. Daha sonra Pr değerleri (Tablo 4.2) belirlendi. Basılabilirlik değerleri eğer 1 olduğu takdirde yani baskı sonrası şekilsel stabilitenin sağlandığı bilinmektedir. 5JK içerisine hBN katılması durumunda $Pr < 1$ değerine

bağlantılı olarak gözeneklerin kapandığı ve yapısal bütünlüğün korunmadığı gözlemlenmiştir.

Tablo 4.2. Doku iskelelerinin gözenek kalitesinin incelenmesi ve Pr değerleri

Biyomürekkep kodları	Pr değerleri
5JK	0,997 ± 0,003
5JKBN	0,773 ± 0,006
7,5JK	1,118 ± 0,020
7,5JKBN	0,936 ± 0,095

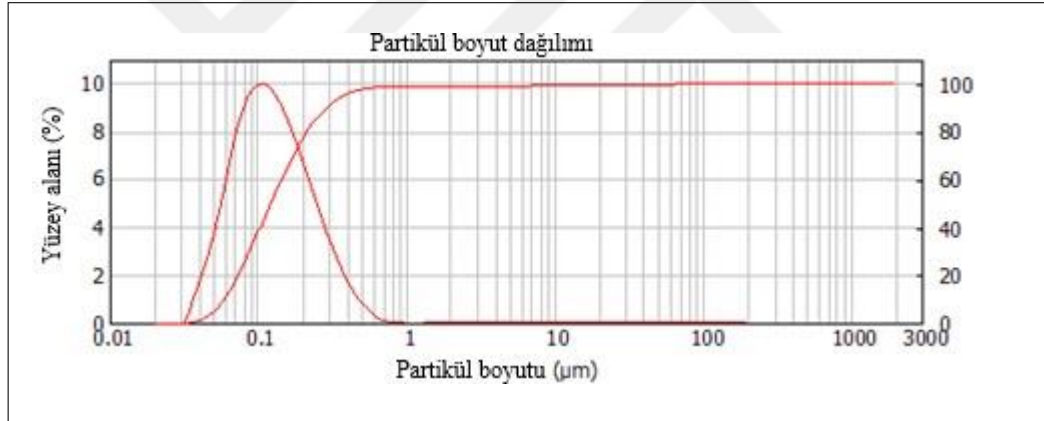
Yüksek viskoziteli 7,5JK biyomürekkebi içerisine hBN nanopartiküllerinin katılması durumunda stabilitesini iyileştirerek Pr değerini 1'e yaklaştırmış ve yüksek basınç ihtiyacını azaltmıştır. hBN içeren jelatin-kitosan biyomürekkebinin daha yüksek viskozitede bile basılabilirliği kolaylaştırdığı belirlenmiştir.

Doku iskelelerinin 3B biyoyazıcıdan basılmadan önce boyutu ve gözenek aralığı bilgisayar destekli tasarımlarla modellendi. Doku iskelesinin dış boyutu 15 mm kare şeklinde 1,5 mm aralıklarla 9-10 filament genişliğinin olması ve 2/3 kat baskı yapıldı. 25G nozuldan 250 mikrometre çapına sahip filament ekstrüde edildi. Optimize edilmiş baskı parametrelerine (Tablo 4.1) göre biyomürekkepler basıldı. İyonik olarak bağlı biyomürekkepler ıslak halde uzun süre muhafaza edilmesi, ürünün bozunmasına ve kontamine olması riski bulunmaktadır. Bu yüzden liyofilizasyon sistemi ile kurutularak doku iskelesinin filament yüzey özelliklerinin gözenekli ve pürüzlü olması sağlandı. Baskı sonrası biyomürekkepler stabilitesini koruyamamakta ve zamanla filament çapı genişleyebilmektedir. Bunu engellemek için gluteraldehit çapraz bağlayıcı ajanı kullanılarak yapının kovalent bağlarla stabilizasyonu sağlandı. Gluteraldehit %0,01-2,5 oranında literatürde kullanımı mevcuttur. Ayrıca serbest kimyasal ajanların ortamda bulunması hücreler için toksik etki oluşturmaktadır (Thakur, Rodrigues, & Singh, 2018). Bu yüzden çapraz bağlanmamış gluteraldehit gruplarını ortamdan uzaklaştırmak için tampon ile yıkanarak uzaklaştırıldı.

4.5. Deneylerin ve Malzemelerin Karakterizasyonu

4.5.1. hBN partikül boyut analiz sonucu

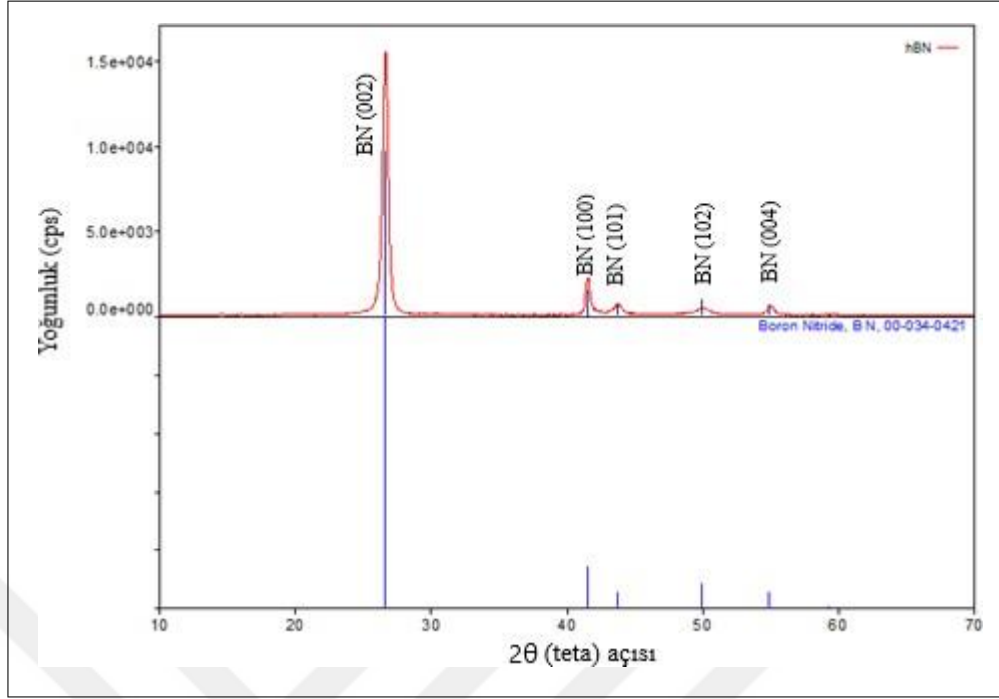
JK biyomürekkeplerin katkı malzemesi olan hBN partikül boyutu (Şekil 4.7) ve dağılımı incelendi. Bu bulgular doğrultusunda hBN partikül boyutunun yaklaşık 0,1-0,15 mikrometre (μm) aralığında olduğu belirlendi. hBN'nin tabakalarının van der Waals etkileşimleri ile üst üste tabakalar halinde birikmesi daha büyük partikül boyutlarının oluşmasına neden olmaktadır. Tabakalar pul pul ayrıldığı ve partikül boyutunun düştüğü takdirde hBN'nin homojen dağılmasının kolaylaştığı gözlemlendi. Bölüm 4.1.1'de yapılan hBN dispersiyon çalışmalarında çöken %23,3 (3,5 mg / 15 mg) oranındaki kısmın Şekil 4.7'de 1 μm partikül boyutuna yakın veya aglomere olmuş hBN yapıları olduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 4.7. hBN partiküllerinin boyut dağılım grafiği

4.5.2. hBN XRD analizi

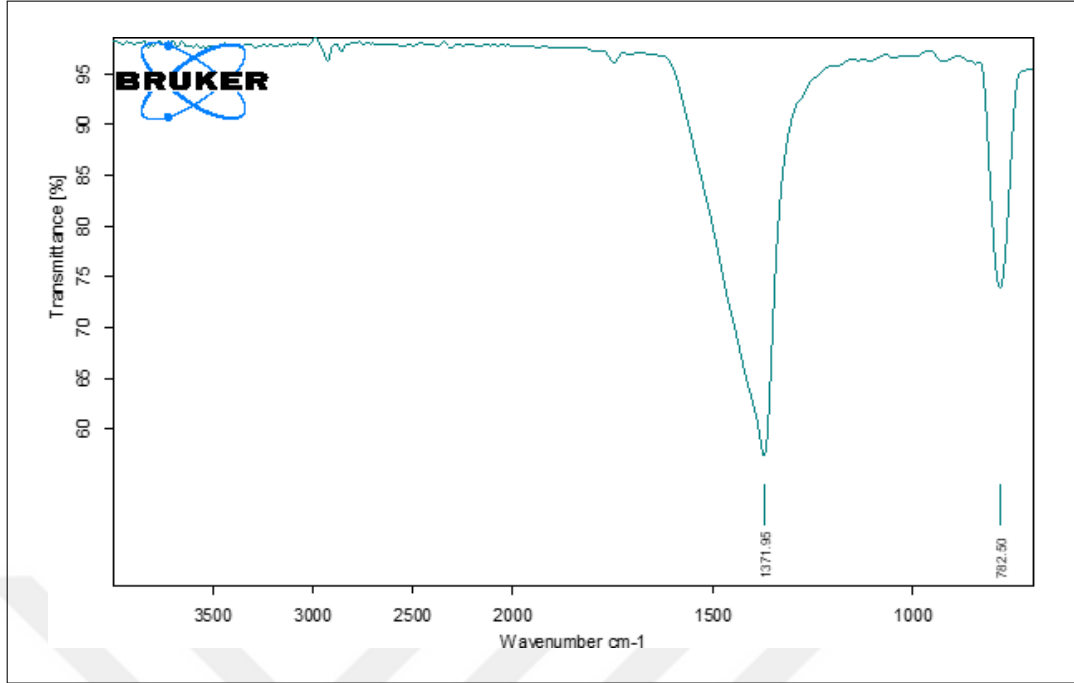
X ışını difraksiyonu ile hBN yapısı ve içeriği değerlendirildi. hBN yüksek kristalliteye sahip olduğunu, 2θ açısının $25-30^\circ$ BN (002) ve $40-45^\circ$ BN (100) arasındaki keskin pikler (Şekil 4.8) göstermektedir. Diğer zayıf pikler BN (101), BN (102) ve BN (004) ise BN kristalografik düzleminde kaynaklanmaktadır (JCPDS PDF no; 034-421). Bu bulgular literatür ile karşılaştırıldığında yapının saf BN olduğunu kanıtlamaktadır. Pik yükseklikleri incelendiğinde (004) / (100) oranının değişmesi tabaka sayısının azaldığına atfedilmektedir (Matović, ve diğerleri, 2016); (Gao, Zhao, & Yin, 2018)).



Şekil 4.8. hBN'ye ait XRD paternleri

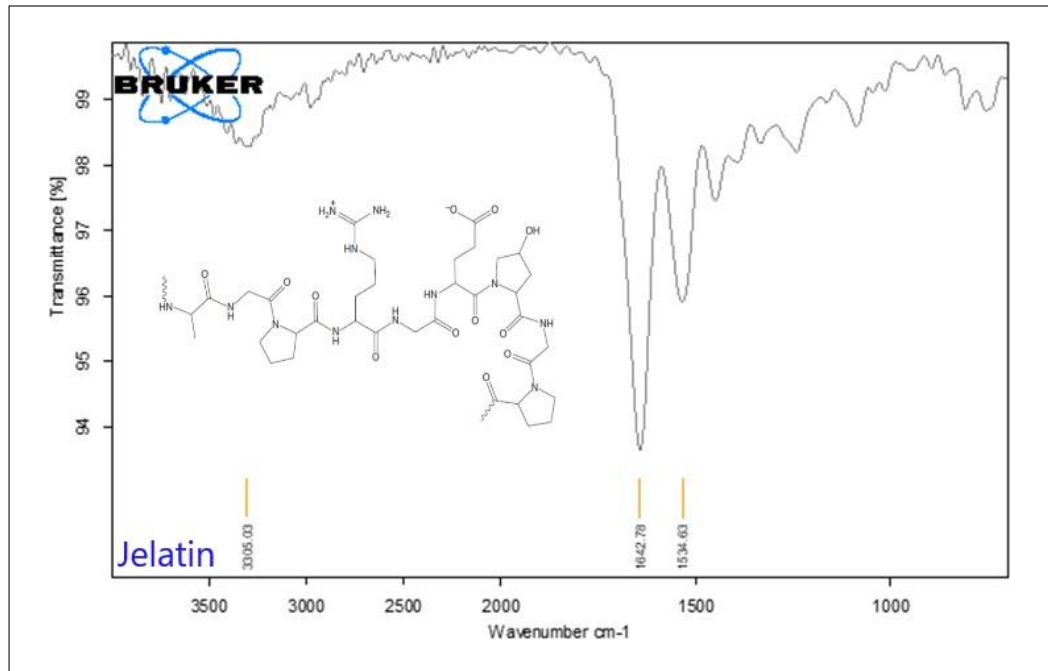
4.5.3. Biyomürekkep ve bileşenlerinin FTIR spektrometresi ile analizi

Biyomürekkebin ana bileşenlerini oluşturan jelatin, kitosan ve hBN ayrı ayrı FTIR sonuçları alındı ve karakteristik pikleri incelendi. hBN içerisindeki B-N gerilme titreşimi 1371 cm^{-1} dalga ve B-N-B düzlem dışı bükülme titreşimi 782 cm^{-1} dalga boyunda (Şekil 4.9) pik vermektedir.



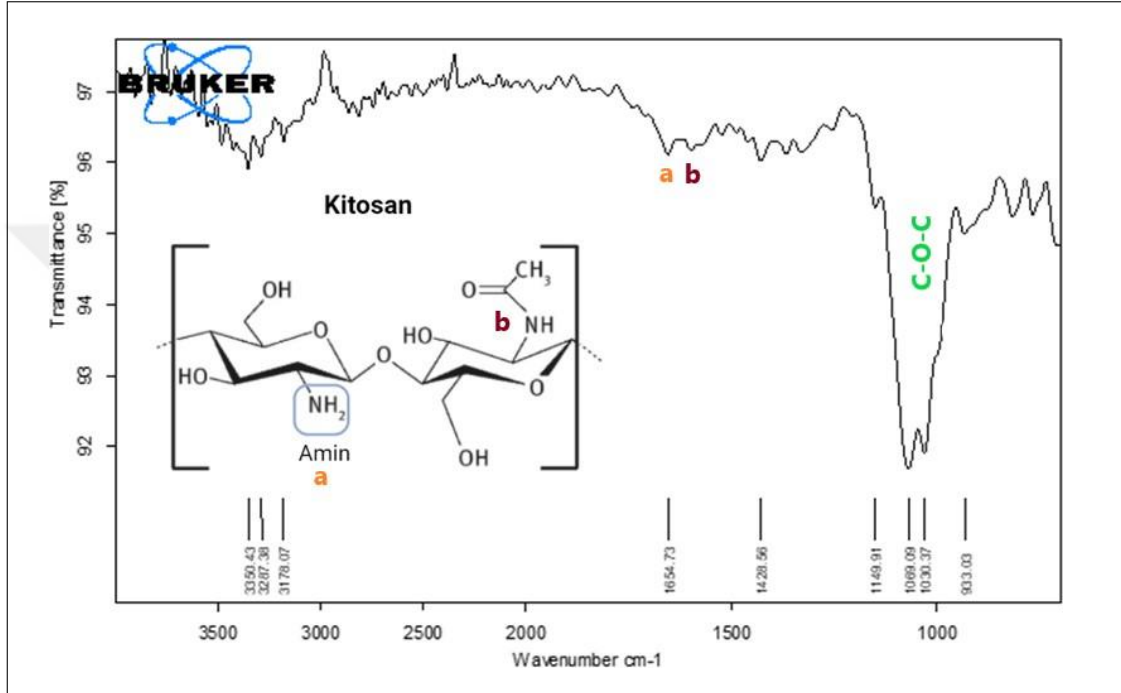
Şekil 4.9. hBN FTIR spektrumları

Jelatinin (Şekil 4.10) amino piki 1534 cm^{-1} ve karbonil piki 1642 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenmektedir. 3305 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik jelatinin kuru olmasına rağmen içerisinde bulunan neme bağlı -OH ve yüzeydeki -NH_2 aktif grupların pikleridir.



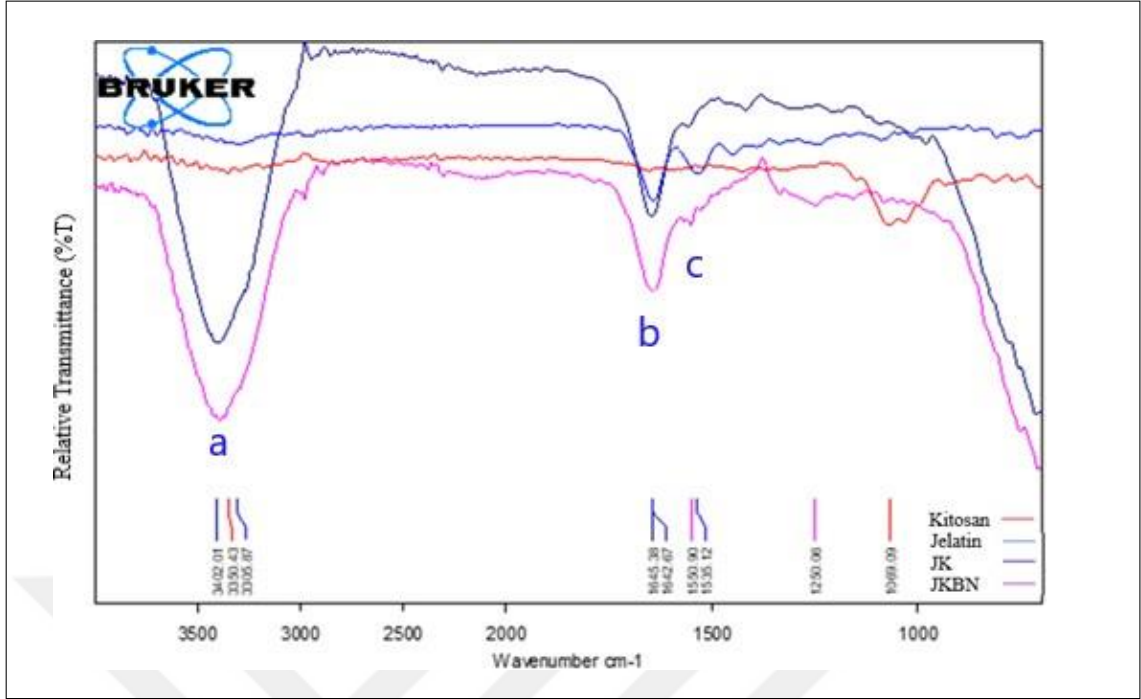
Şekil 4.10. Jelatinin FTIR spektrumları

Kitosanın yüzeyindeki sakkarit (C-O-C) bileşenleri 933 cm^{-1} ile 1149 cm^{-1} dalga boyunda ve amino piklerini ise 1550 cm^{-1} dalga boyunda, asetil grubunun amid-I bağını 1654 cm^{-1} dalga boyunda (Şekil 4.11) pik vermektedir. Kitosanın düzlemsel ve yüzeysel -NH_2 ve -OH grupları 3350 cm^{-1} dalga boyunda görülen geniş pik atfedilmektedir.



Şekil 4.11. Kitosanın FTIR spektrumları ve aktif grup işaretlemeleri

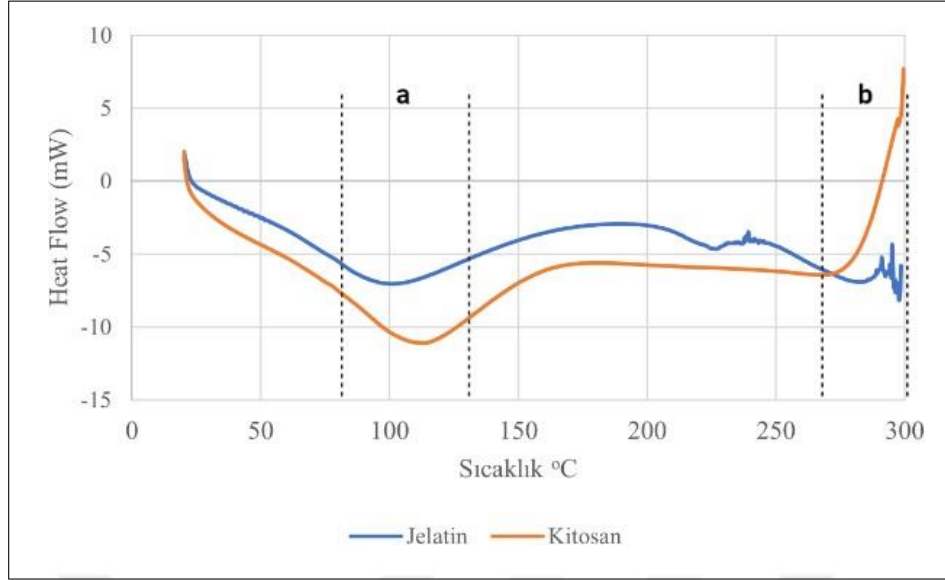
Biyomürekkeplerin yüzeyindeki -OH ve -NH aktif gruplarının gerilme piki $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda görülmektedir. Aynı zamanda biyomürekkepin sulu formda olması bu pikin geniş ve kuvvetli olmasını etkilemektedir. JK biyomürekkebinin IR spektrum sonucunda (Şekil 4.12) karbonil grubunda (1645 cm^{-1} dalga boyunda) net bir değişim olmazken ve amino bantlarının ise 1550 'den 1535 cm^{-1} dalga boyuna doğru kaydığı gözlemlenmiştir. Bu iyonik olarak bağlı kitosan ve jelatin molekülleri arasında zayıf hidrojen bağının oluştuğunu göstermektedir. Sonuçlar literatür ile uyumlu olup iyonik bağlanmanın pikler üzerinde kayma oluşturabileceği belirtilmektedir (Ng, Yeong, & Win Naing, 2016).



Şekil 4.12. Kuru kitosan ve jelatin ile JK ve JKBN biyomürekkeplerin spektrum karşılaştırması

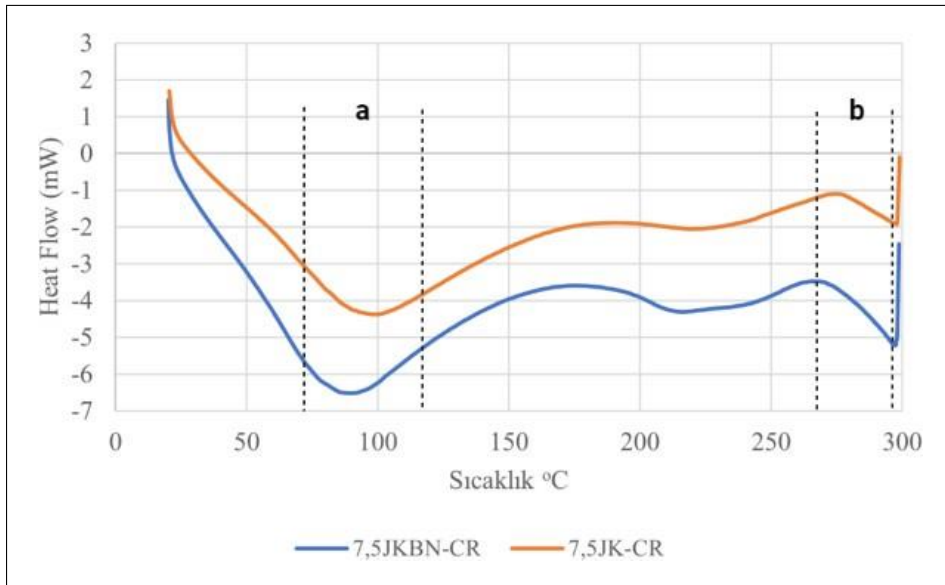
4.5.4. Biyomalzemelerin DSC analizi

Doğal polimerler yüksek sıcaklığa karşı hassasiyeti nedeniyle bozunabilmektedir. Jelatin ve kitosan polimerleri (Şekil 4.13) 20-300 °C sıcaklık arasında termal davranışı incelendi. Bu bulgular sonucunda jelatin ve kitosan 100 °C ve üzerinde endotermik pik (Şekil 4.13a) ve 260 °C ve üzeri sıcaklıkta jelatin ve kitosan polimerlerinin ekzotermik pik (4.13b) oluşturarak moleküllerin parçalandığı belirlendi. Jelatinin protein temelli doğal polimer olması polisakkarit temelli kitosana göre daha hızlı bozunma davranışı sergilediği gözlemlenmiştir. Jelatin ve kitosanın endotermik ve ekzotermik davranışı literatür ile uyumludur (Parvez, ve diğerleri, 2012).



Şekil 4.13. Jelatin ve kitosanın DSC termagramı; a) endotermik bölge, b) ekzotermik bölge içerir.

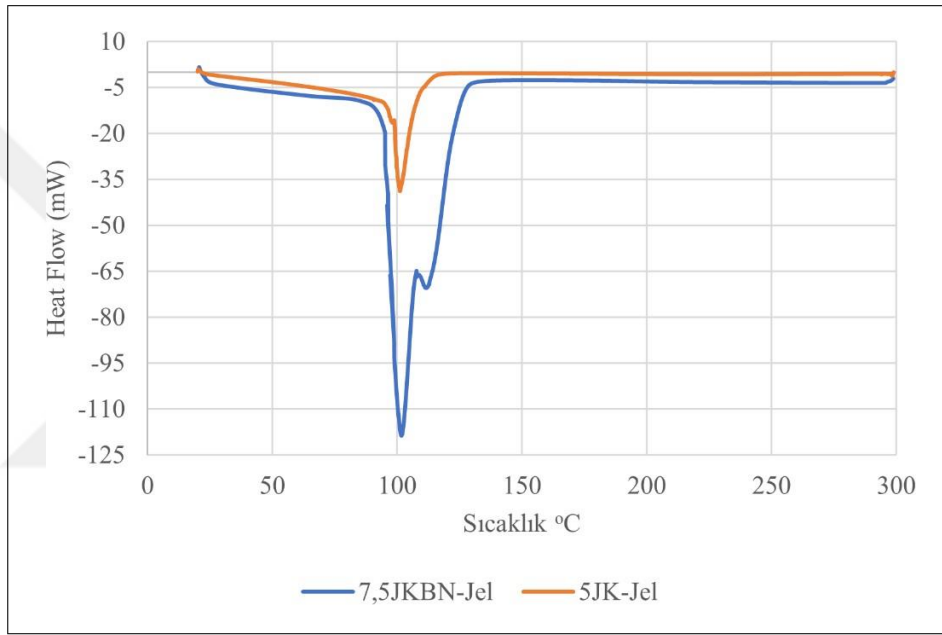
Doku iskeleleri hBN içeriğine göre termal davranışının farklılık gösterdiği gözlemlendi. Çapraz bağlanmış 7,5JKBN doku iskelesi (7,5JKBN-CR) hBN içermeyen (7,5JK-CR) gruba göre daha düşük sıcaklıkta endotermik ve ekzotermik pik oluşturduğu belirlendi. Bu sonuçlar hBN'nin sıcaklığı homojen dağıtma özelliğinin bir sonucu olarak sıcaklığa bağlı bozunma işleminin daha düşük sıcaklıkta başlamasına neden olduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 4.14. Doku iskelelerinin termal davranışı

DSC analizinde ilk endotermik pik genellikle hidrojel içerisindeki suyun ortamdan uzaklaşmasına veya kurutulmuş doku iskelesinin içerisinde hapsolmuş nem içeriğinin buharlaşmasına atfedilmektedir (Nieto-Suárez, López-Quintela, & Lazzari, 2016).

Biyomürekkeplerin yüksek sıcaklığa karşı davranışı incelendiğinde (Şekil 4.15) yaklaşık 100 °C sıcaklıkta endotermik pik vermektedir. Burada su buharlaşması ve termal bozunma gerçekleşmektedir. hBN içeren grup yüksek endotermik pik vererek sıcaklığı bozunmaya karşı direnç gösterdiği ve yaklaşık 120 °C sıcaklıkta bozunduğu gözlemlendi.



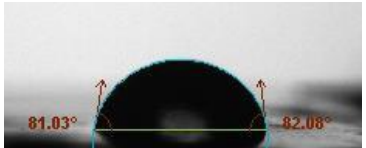
Şekil 4.15. Biyomürekkeplerin termal davranışı

4.5.5. Biyomürekkep bileşenlerinin yüzey temas açısı analizi

Hücrelerin tutunmasını ve yayılmasını etkileyen faktörlerden biri malzeme yüzeyinin ıslana bilirliliğidir (hidrofiliklik / hidrofobiklik olmasıdır). Hücrelerin protein adsorpsiyonu yoluyla tutunmasında ve biyoyumlu olmasında etkilidir. Doku iskelesinin yüzeyinin hidrofilik/hidrofobik özelliklerini belirlemek için su temas açısı ölçümü yapılmaktadır. Yüzey temas açısı; katı veya kuru yüzeyin bir sıvı tarafından ıslatılabilirliğini ölçen bir yöntemdir. Zemin ile damlacığın teğet noktasından yüzeyine doğru açı oluşturulur bu iç açı 90° büyük ise hidrofobik, 90° küçük ise hidrofilik davranış sergilemektedir (Polini & Yang, 2017). Biyomürekkeplerin üzerine hücre ekildiği veya hücreli baskı yapıldığı taktirde hücrelerin hidrofilik/hidrofobik etkileşimlerden

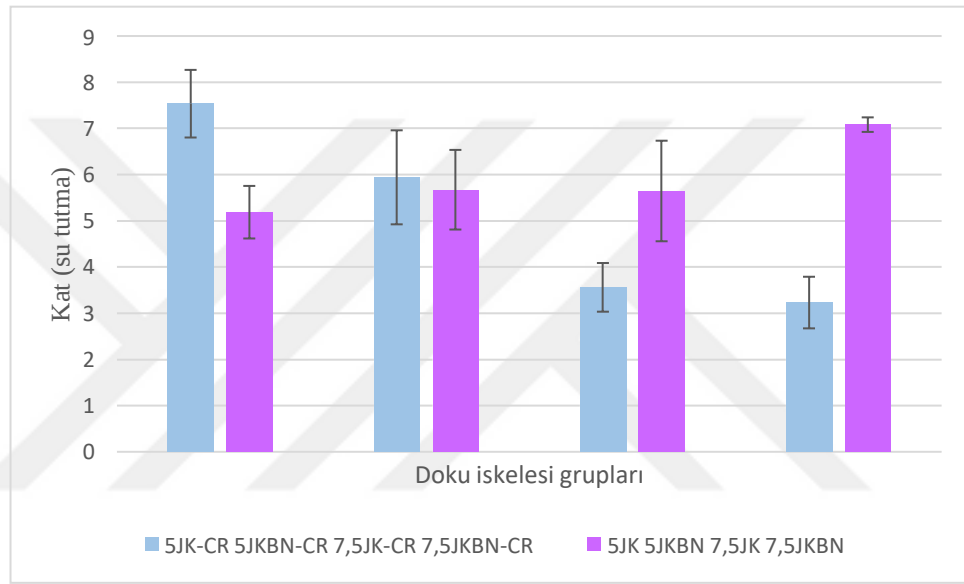
etkileneceği için film halinde dahi olsa biyomürekkebi oluşturan bileşenlerin temas açısını belirlemek önemlidir. Biyomürekkeplerin temas açısı ölçümleri ve damlacık görünümleri (Tablo 4.3) incelendiğinde hBN'nin hidrofobik yapısı hidrofilik özellik gösteren jelatin ve kitosanın daha hidrofobik davranış sergileterek yüzeyde yayılma değil, toparlanma ve küre halinde durmaya zorladığı gözlemlendi. 5JKBN grubuna göre 7,5JKBN grubunda jelatin oranının daha fazla bulunması temas açısını $85,43^\circ \pm 0,90^\circ$ değerinden $81,58^\circ \pm 2,40^\circ$ değerine düşmesini sağlayarak hidrofilik özelliğini artırmaktadır. Bu sonuçlar 3B biyobaskı sonra yapının yüzeyde stabil olarak yayılmadan kalması için de önemlidir.

Tablo 4.3. Biyomürekkepler ve bileşenlerinin temas açısı değerleri ve görünümleri.

Bileşen isimleri	Temas açısı değerleri	Damlacık görünümleri
Jelatin	$63,14^\circ \pm 2,38^\circ$	
Kitosan	$26,19^\circ \pm 2,05^\circ$	
5JK	$59,20^\circ \pm 2,98^\circ$	
5JKBN	$85,43^\circ \pm 0,90^\circ$	
7,5JK	$53,70^\circ \pm 8,45^\circ$	
7,5JKBN	$81,58^\circ \pm 2,40^\circ$	

4.5.6. Doku iskelelerinin su tutma kapasitesi

Kovalent çapraz bağlanmış JK ve JKBN grupları liyofilize edilerek kurutulmuş doku iskelelerin şişme davranışı incelendiğinde (Şekil 4.16) hBN nanopartiküllerin doku iskelesinin su tutma kapasitesini düşürdüğü fakat yapısal stabilitesini artırdığı belirlendi. Şişme oranları (Tablo 4.4) incelendiğinde malzemelerin kuru ağırlıklarına kıyasla düşük viskoziteli biyomürekkeplerin en az 5,94 kat, yüksek viskoziteli biyomürekkeplerin ise en az 3,23 kat suyu içerisinde tuttuğu gözlemlendi.



Şekil 4.16. Çapraz bağlanmanın su tutma kapasitesine olan etkisi

İyonik olarak bağlı JK ve JKBN grupları ise liyofilize edilip kurutulduktan sonra PBS ile ıslatıldığında suyu kovalent bağlı gruplardan daha fazla içerisinde tuttuğu gözlemlendi. Jelatin oranının artması su tutma kapasitesinin artmasını sağladığı görülmektedir. hBN nanopartikülleri iyonik bağlı gruplarda oluşturduğu boşluklar ile daha fazla su çekmesine etki ederken kovalent bağlı gruplarda yapının aşırı şişmesini engelleyerek 3B yapısının daha stabil olduğu belirlendi.

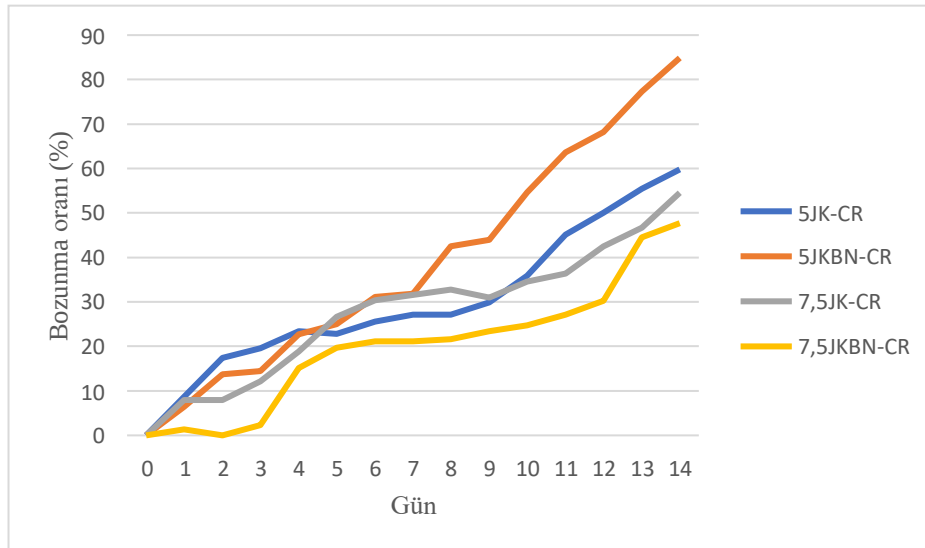
Tablo 4.4. Doku iskelelerinin su tutma oranları

Doku iskelesi grupları	Kimyasal olarak çapraz bağlanmış (CR) doku iskeleleri su tutma kapasitesi (kat)	İyonik olarak bağlanmış doku iskeleleri su tutma kapasitesi (kat)
5JK	7,53 ± 0,73	5,19 ± 0,57

5JKBN	$5,94 \pm 1,02$	$5,67 \pm 0,86$
7,5JK	$3,56 \pm 0,53$	$5,64 \pm 1,09$
7,5JKBN	$3,23 \pm 0,56$	$7,08 \pm 0,16$

4.5.7. Doku iskelelerinin biyobozunurluk testi

Biyomalzemeler doku rejenerasyonu gerçekleşene kadar bölgede durması ve zamanla hücreler HDM oluştururken biyomalzemenin bozunması istenen bir durumdur. Biyomalzemelerin bozunma süresi doku yenilenmesi süresiyle uyumlu olması gerekmektedir. Eğer biyomalzemeler erken bozunursa 3B dokunun HDM yapısı oluşmamasına ve rejenerasyonun gecikmesine neden olabilmektedir. Bozunma süresini ve yapı stabilizasyonunu korumak için kovalent bağlanmış (CR) JK ve JKBN gruplarının 14 günlük vücut içi taklit edilen ortamdaki inkübasyonu sonrası bozunma oranları (Şekil 4.17) incelendi. Tüm malzemeler 4. Günde yaklaşık %20 oranında bozunurken 14. Gün sonunda 5JK %60, 5JKBN %85, 7,5JK %55, 7,5JKBN ise %48 bozunduğu gözlemlendi. Yapısal bütünlük açısından en dayanıklı malzemenin 7,5JKBN grubu olduğu belirlendi. 5JK içeresine hBN ilave edildiği takdirde düşük polimer yoğunluğu ve polimerler arasında inert yapısıyla boşluk oluşturan hBN etkisiyle daha hızlı bozunma davranışı sergilediği gözlemlendi.

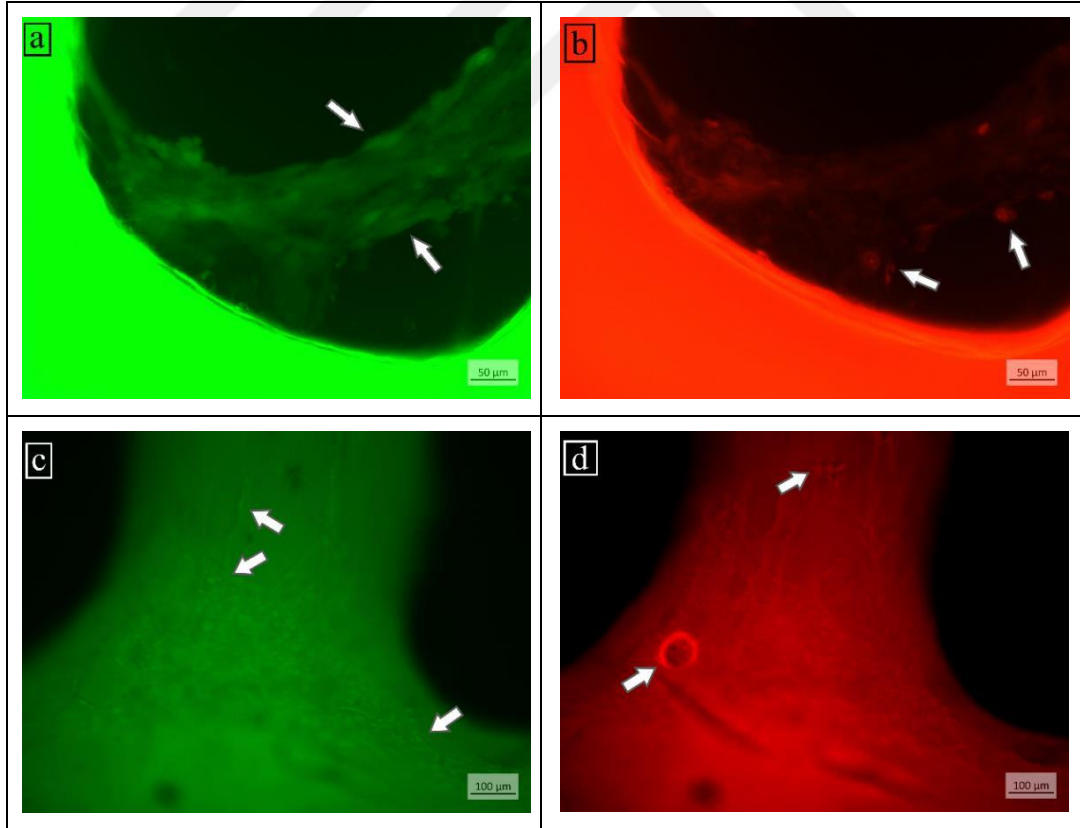


Şekil 4.17. Kovalent bağlı doku iskelelerinin 14 günlük bozunma grafiği

4.5.8. Doku iskelesinin biyouyumluluk testi

Doku iskelelerinin biyouyumluluğunu incelemek için yapılan canlı-ölü boyama işleminde floresan boyalar kullanılmaktadır. Calcein AM canlı hücrelerin zarına nüfuz ederek yeşil floresan renk yaymaktadır. Propidiyum iyodür (PI) canlı hücrelerden geçmekte ve ölü hücrelerin DNA'sına bağlanarak kırmızı floresan renk yaymaktadır. Farklı renkte floresan renklerin ışınları sayesinde doku iskelesi ile hücrelerin etkileşimleri incelenebilmektedir. Hücrelerin doku iskelesi üzerinde tutunmasını, yayılmasını ve toksisitesini incelemek için etkili bir yöntemdir (Risbud, Karamuk, Moser, & Mayer, 2002).

Fare embriyonik fibroblast hücreleri (3T3 hücre hattı) ekilen doku iskelerinin canlı-ölü analizi floresan mikroskop ile (Şekil 4.18) incelendi. Floresan boyalar doku iskelelerinin gözenekleri üzerinde otofloresan (aşırı parlama) özellik gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.18. Doku iskelelerinin floresan mikroskop görüntülemesi a-c) calcein AM ile canlı hücre boyaması b-d) PI ile ölü hücre boyaması

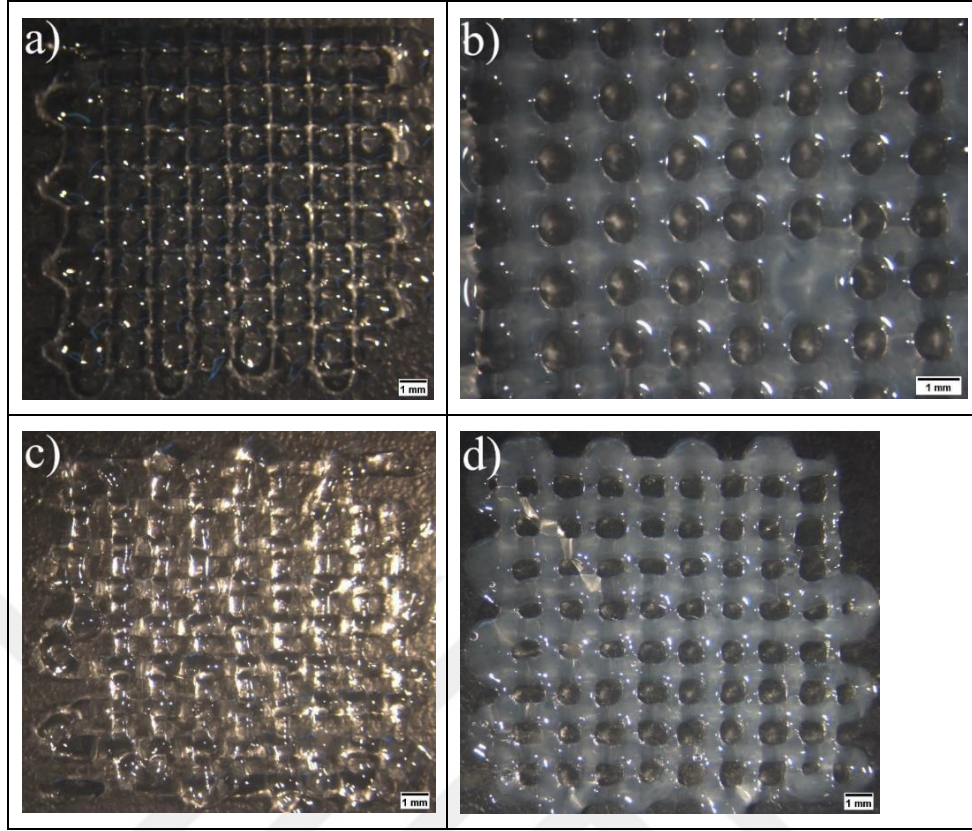
JK doku iskeleleri (Şekil 4.18-a) üzerinde filament boyunda çoğalıp göç ettiği ve köprü oluşturduğu gözlemlendi. Şekil 4.18-b bu hücrel aktiviter esnasında hücrelerin bazılarının öldüğü belirlendi. hBN içeren JK grupları (Şekil 4.18-c) ise filament kesişim noktasında hücrelerin yoğun bir şekilde çoğalıp filament boyunca göç ettikleri gözlemlenmektedir. Ölü hücreler (Şekil 4.18-d) JK grubuna göre nispeten daha az olduğu görölmek ve doku iskelelerinin biyoyumlu olduğunu kanıtlamaktadır.

4.5.9. 3B doku iskelelerinin stereo mikroskop görüntülemesi ve analizi

Biyomürekkepler, Tablo 4.1'deki parametreler kullanılarak basılmış ve baskı sonrası filament stabilitesinin birbirinden farklı olduğu (Şekil 4.19) gözlemlenmiştir. Baskı sonrası filamentlerin düz ve yayılmadan kalması 3B yapı mimarisinin korunması basılabilirliğe uygunluk açısından önemlidir (O'Connell, ve diğerleri, 2020).

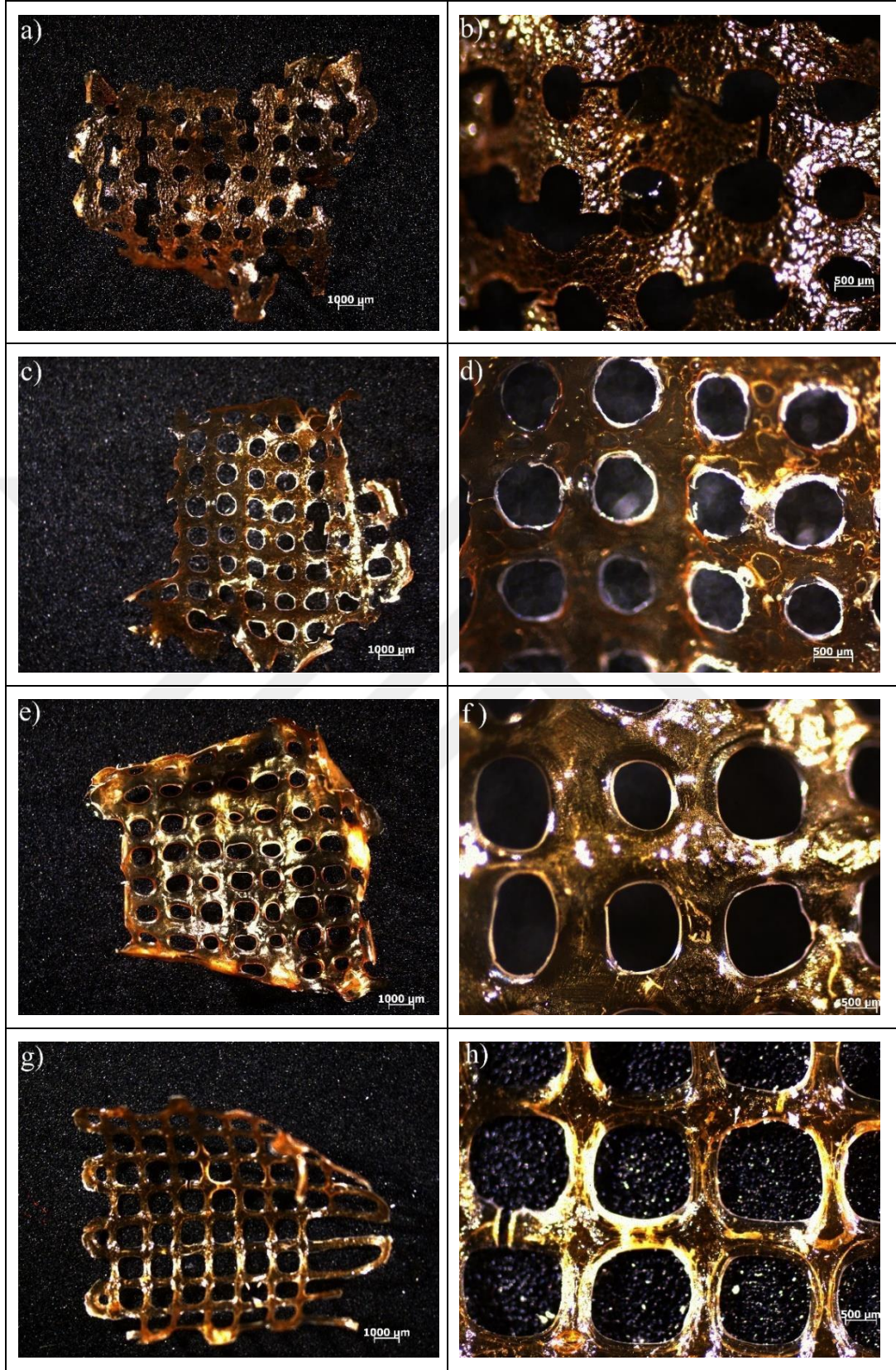
Stereo mikroskop altında 3B yapılar incelendiğinde 5JKBN biyomürekkebinin baskı sonrası filament çapının genişlediği, yüzeyde yayıldığı dairesel gözeneklerin oluştuğu ve kapandığı belirlendi. 5JK biyomürekkepleri ise gözenek şeklinin basıldığı gibi kare olması basılabilirliğe uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca 3B yapısal şeklini koruyarak filament enine yayılmadığı, sürekliliğini koruduğu ve aynı kalınlıkta filamentler oluşturduğu belirlendi. 7,5JK grubunun ise filament yapısı düzensiz, kesikli ve büzüşmüş yapıda olduğu gözlemlendi. Yüksek viskozitesinden dolayı filament çapının kalınlığı bazı noktalarda incelendiği bazı noktalarda kalınlaştığı görölmektedir. Bu gözlemler basılabilirlik için uygun olmadığını göstermektedir. 7,5JKBN grubu ise hBN içermeyen gruba nispeten daha düzgün filamentlerin oluşmasına, yapının kararlı olmasını ve gözenek boyutunun kareye yakın olduğu görölmektedir.

Bu gözlemler sonucunda yüksek viskoziteli grupların uygun olmayan gözenek ve filament yapısını hBN ilave edildiğinde yapıyı daha basılabilir ve basıldıktan sonra kararlı yapı sunduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 4.19. *Biyomürekkeplerin baskı sonrası stereo mikroskop görüntüsü; a) 5JK, b)5JKBN, c)7,5JK, d)7,5JKBN*

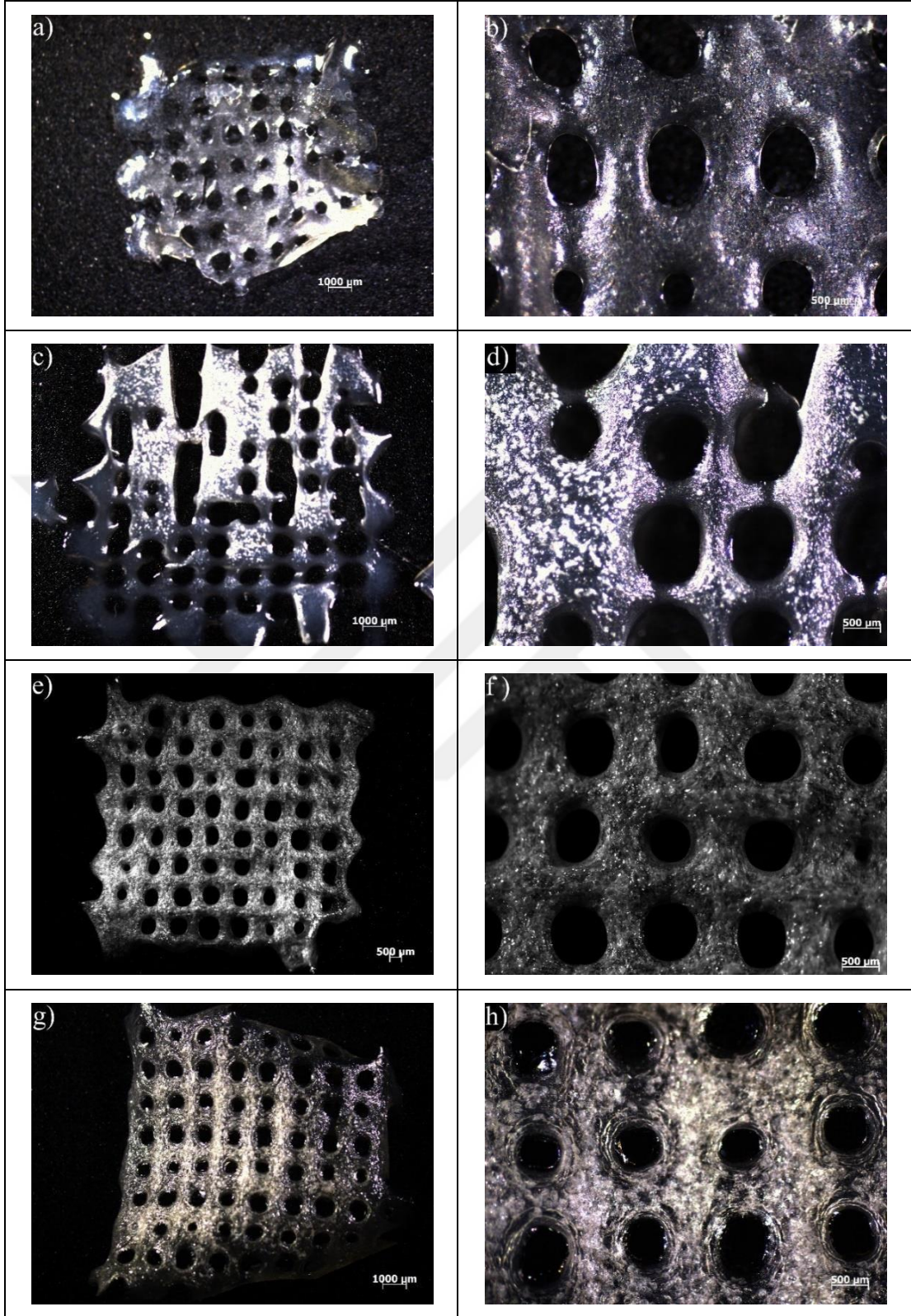
Liyofilizasyon işleminde malzemeler kururken su kristallerinin süblimleşerek oluşturduğu boşluklar/gözenekler doku iskelesinin yüzeyini hücrelerin tutunmasını kolaylaştırmaktadır. Kimyasal ajan ile çapraz bağlanmış doku iskelelerinin liyofilizasyon sonrası görüntüleri (Şekil 4.20) incelendiğinde, düşük derişime sahip (5JK ve 5JKBN) grupların daha fazla kırılmalar gözlenmekte, vakum altında kare gözeneklerin dairesel olduğu ve filament çapının genişlediği gözlemlendi. Yüksek derişime sahip 7,5JK grubunun asimetrik gözenek yapısı daha kararlı hale geçtiği ve dairesel gözenekler oluşturduğu belirlendi. Liyofilizasyon işlemi doku iskelesi bütünlüğünde katlanmalara neden olsada kırılmalar gözlemlenmemiştir. Buda yapının jelatin miktarının fazla olmasından ve kimyasal çapraz bağlayıcı etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 7,5JKBN grubu diğer gruplardan daha iyi gözenek şekline sahip olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.20. Liyofilize edilmiş kimyasal olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin stereo mikroskop görüntüsü; a) 5JK, c) 5JKBN, e) 7,5JK ve g) 7,5JKBN grubunun 0,63 kat büyütmedeki görüntüleri (ölçek çubuğu 1000 µm), b) 5JK ve d) 5JKBN grubunun 2 kat büyütmede, e) 7,5JK ve g) 7,5JKBN grubunun 2,5 kat büyütmedeki (ölçek çubuğu 500 µm) görüntüleridir.

3B baskı sonrası 5JK grubu baskı sonrası gözenekleri kareye yakın gözlemlenirken çapraz bağlamadan sonra liyofilizasyon işlemi uygulanan 7,5JKBN grubunun gözeneklerinin kareye yaklaştığı ve filament çapının azaldığı belirlendi.

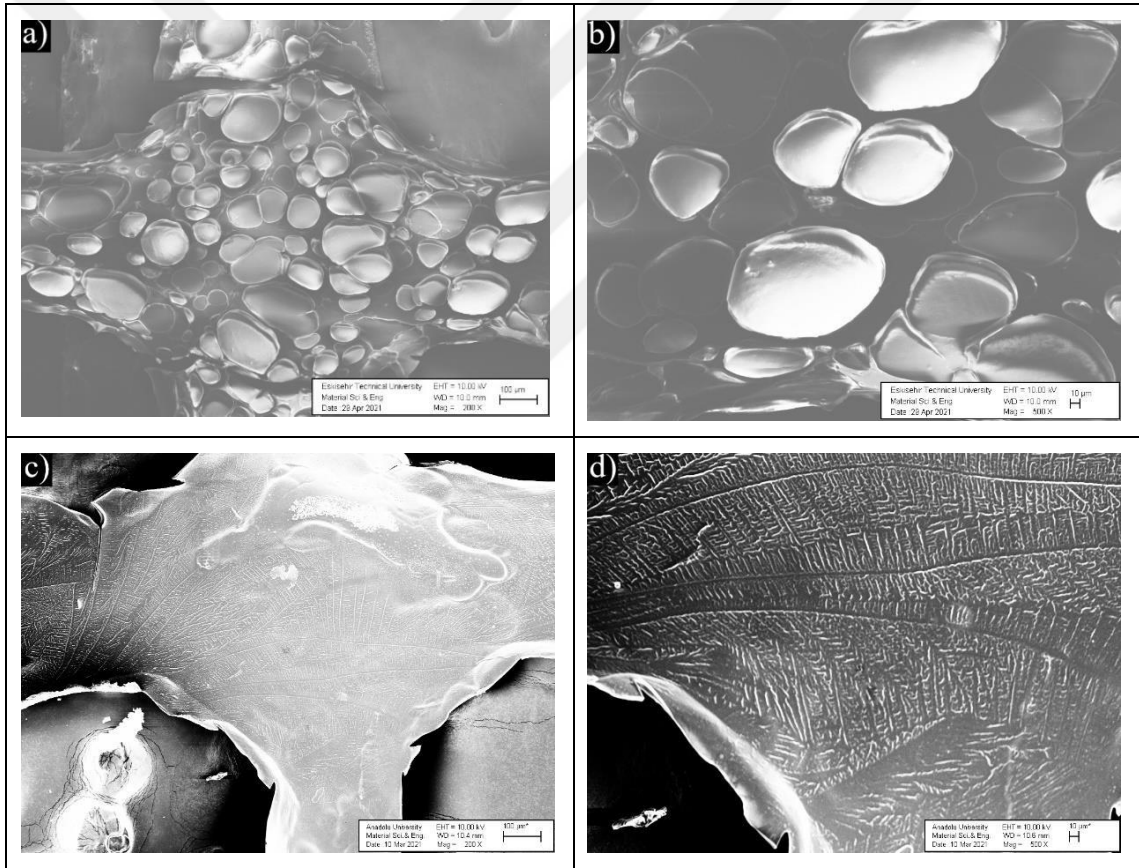
İyonik çapraz bağlanmış kuru doku iskeleleri (Şekil 4.21) stereo mikroskop altında incelendiğinde kimyasal çapraz bağlı yapılara kıyasla liyofilizasyon işlemindeki vakuma (mekanik etkiye) karşı dayanıksız olduğu ve baskı sonrası 3B şeklini koruyamadığı görülmektedir. Doku iskelelerinin 3B baskı sonrası şekilsel stabilitelerini koruyamadıkları ve filament çapının genişleyerek gözenekleri kapattığı belirlendi. 3B baskı sonrası uygulanan işlemler sonucunda düşük derişimli grupların yapı bütünlüğünü kaybettiği ve 2 boyutlu film oluşturduğu gözlemlendi.

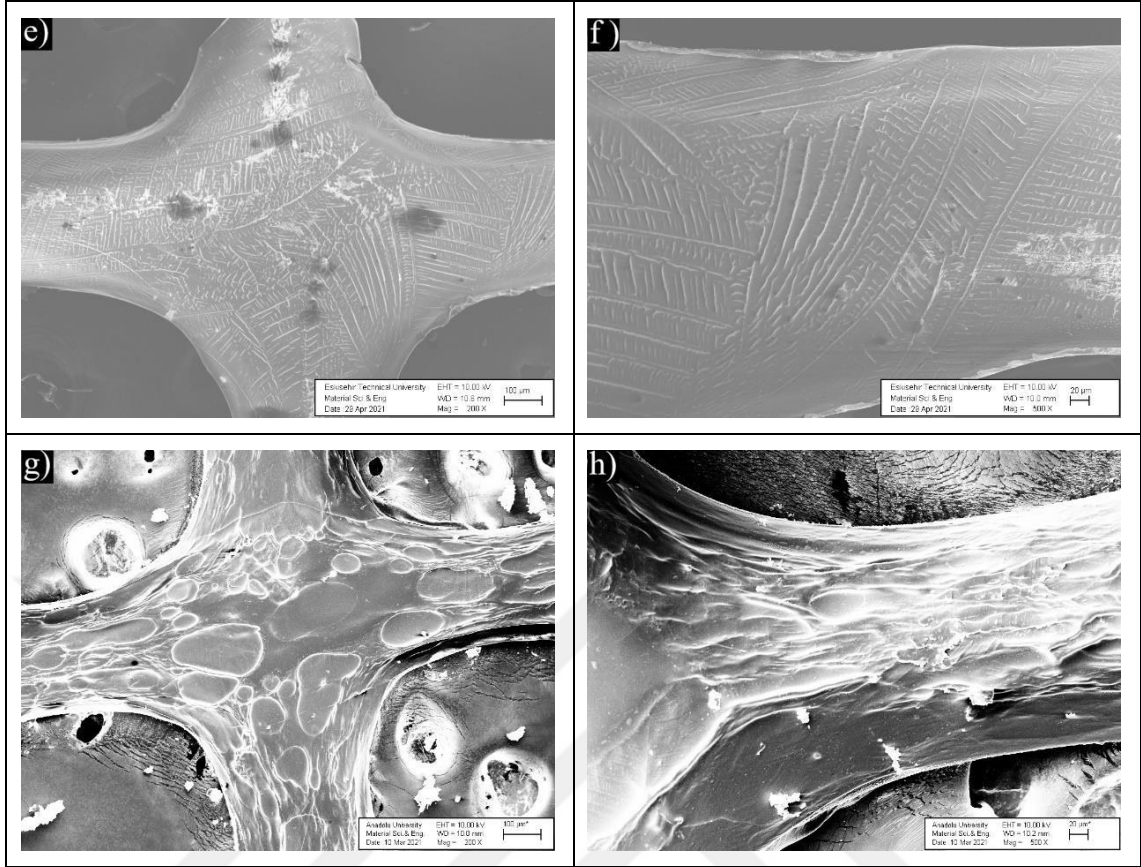


Şekil 4.21. İyonik olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin stereo mikroskop görüntüleri; a)5JK, c)5JKBN, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 0,63 kat büyütmadaki görüntüleri, b)5JK ve d)5JKBN grubunun 2,5 kat büyütmeye, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 2 kat büyütmeye (ölçek çubuğu 500 μm) görüntüleridir.

4.5.10. 3B doku iskelesinin SEM görüntülenmesi

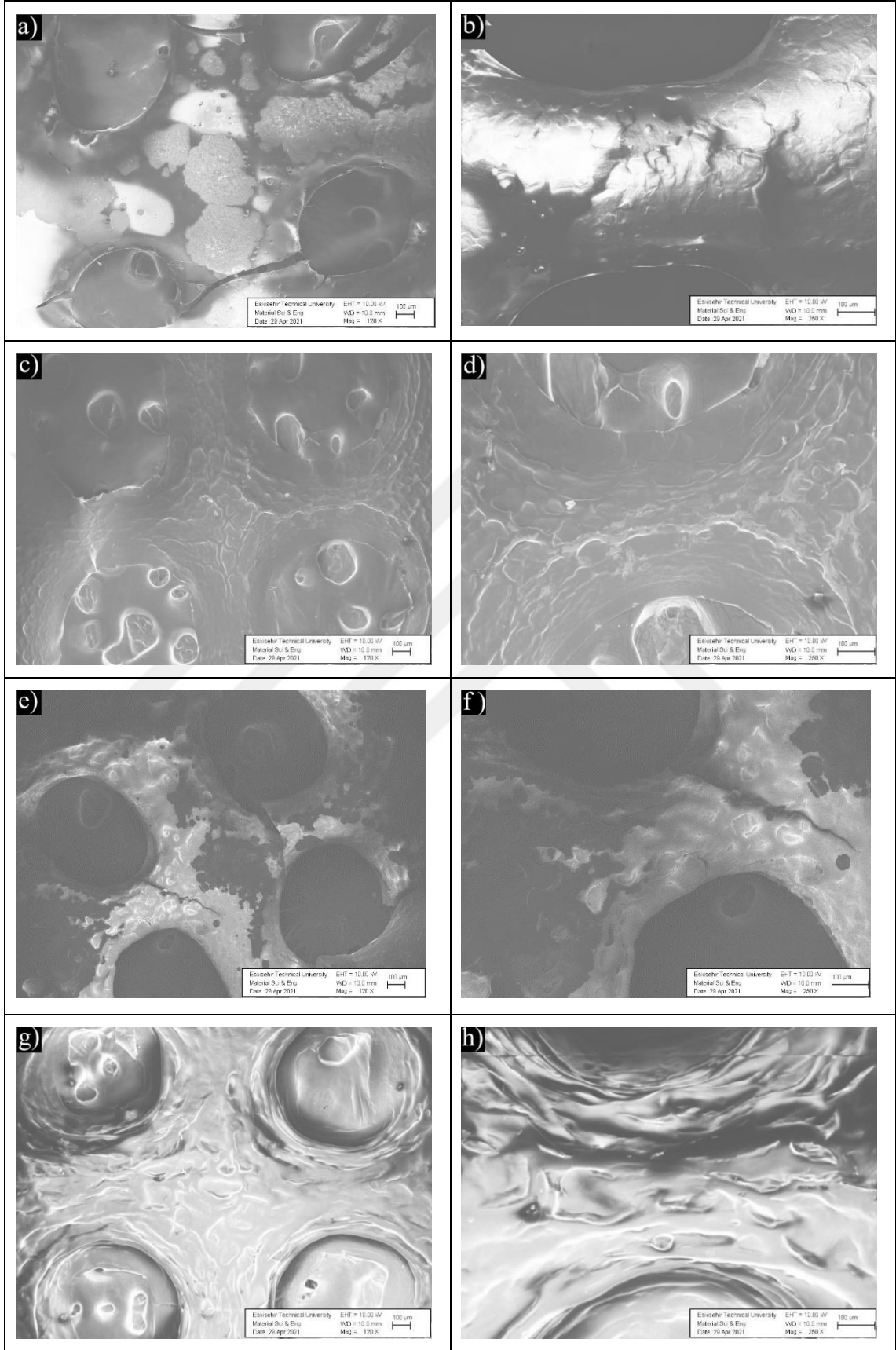
Doku iskelesinin veya biyomalzemenin yüzeyinin gözenekli ve pürüzlü olması hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını etkilemektedir (Chang & Wang, 2011). Doku iskelesinin yüzey morfolojisini incelemek için SEM kullanılarak yapılan görüntülemeler yapıldı. Kimyasal olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin 5JKBN ve 7,5JK grubunun gözeneksiz ve pürüzlü yüzey yapısına sahipken 5JK grubunun yaklaşık 100 μm genişliğinde porlar oluşturduğu (Şekil 4.22) gözlemlendi. Ayrıca 7,5JKBN grubunun ise filament yönelimi boyunca hücresel göçü teşvik edecek çıkıntılar oluşturduğu ve porlu yüzey yapısı sergilediği görülmektedir.





Şekil 4.22. Liyofilize edilmiş kimyasal olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin SEM görüntüleri; a)5JK, c)5JKBN, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 200 kat büyütmedeki görüntüleri (ölçek çubuğu 100 μ m), b)5JK, d)5JKBN, e)7,5JK ve h)7,5JKBN grubunun 500 kat büyütmedeki (ölçek çubuğu 10 μ m) görüntüleridir.

İyonik olarak çapraz bağlı 5JK grubunun gözeneksiz yüzeyinde kırılmalar ve tuz oluşumu (Şekil 4.23) gözlemlendi. 7,5JK grubu 5JK grubundan farklı olarak yüzeyinde çıkıntılar mevcuttur. hBN içeren 5JK grubunun ise yüzeyde yayıldığı, filament çapının genişlediği ve yüzeyinde lifsi ve gözneklili çıkıntılar oluşturmaktadır. 7,5JKBN grubunun ise 5JKBN grubu gibi yüzey özellikleri gösterdiği fakat yapının yayılmadan stabil kaldığı görülmektedir. İyonik olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde hBN içermesi durumunda yapının kırılmalara karşı daha dayanıklı ve yüzeyinin daha gözenekli olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.23. İyonik olarak çapraz bağlı doku iskelelerinin SEM görüntüleri; a)5JK, c)5JKBN, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 120 kat büyütmedeki görüntüleri ile b)5JK, d)5JKBN, e)7,5JK ve g)7,5JKBN grubunun 250 kat büyütmedeki (ölçek çubuğu 100 µm) görüntüleridir

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ekstrüzyon temelli biyoyazıcıdan basılan yüksek viskoziteli biyomürekkepler, referans olarak optimizasyonu literatürde yapılmış 5JK grubu ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Aynı literatürde jelatin oranının yükseltilmesi viskozitenin artmasına neden olarak basılabilirliği olumsuz etkilediği belirtilmektedir (Ng, Yeong, & Win Naing, 2016). Bu bilgiler doğrultusunda basılabilirliği uygun olmayan iyonik olarak bağlı yüksek viskoziteli 7,5JK grubu oluşturulmuştur ve hBN nanopartikülleri her iki grubun içerisine aynı oranda eklenerek viskozite değişimi, reolojik davranışı, basılabilirlik parametreleri, hidrofilik/hidrofobik yüzey özellikleri, yüzey morfolojisi, biyobozunurluk ve biyoyuymululuk özellikleri incelenerek karşılaştırılmıştır ve karakterize edilmiştir.

hBN'ün kimyasal olarak inert olması polimerler ile etkileşime girmesini önlemekte ve kayganlaştırıcı özelliğini koruyarak reolojik özellikler ile baskı parametreleri üzerinde olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir. Reometre ile yapılan çalışmalar sonucunda biyomürekkeplerin içerisinde hBN olması başlangıçta mekanik gerilme altında direnç göstermesini daha sonra sürtünmeyi azaltarak viskozite düşürücü etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan sıcaklık ile mekanik gerilmenin aynı anda etki ettiği ortamda hBN içeren biyomürekkeplerin viskozitesinin 5JK grubuna yaklaştığı gözlemlenmiştir. Bu sayede 7,5JKBN grubunun baskı için uygun olduğu, 5JKBN grubunun ise 5JK grubundan daha düşük viskozite sergilemesinden dolayı uygun olmadığı görülmüştür. 3B biyoyazıcıda 4 farklı grup basılmış olup baskı parametreleri optimizasyonu yapılmış 5JK referans alınarak geliştirilmiştir. 5JK ve 5JKBN grupları düşük basınçta nispeten yüksek hızda optimum sonuç verirken yüksek viskoziteli gruplar düşük hızda yüksek basınçta basılabilmektedir. Biyomürekkeplerin içerisinde hBN olması hem sıcaklığı homojen dağıtması hem de sürtünmeyi azaltması sayesinde uygulanan basınç değerlerini düşürmüştür. Stereo mikroskop görüntüleri analiz edildiğinde 5JK ve 7,5JKBN grubunun Pr değerinin 1'e yakın olması basılabilirliğinin uygun olduğu göstermektedir. 5JKBN grubu yüzeyde yayılma eğilimi gösterirken 7,5JK ise filament kalınlaşması ve birikmeler 3B basılabilirlik için uygun olmadığını kanıtlamaktadır.

İyonik olarak bağlı bu 4 grup baskı sonrası stabilitesini koruması için gluteraldehit ile çapraz bağlanmış biyobozunurluk testi sonucunda 5JKBN grubu hariç diğer gruplar 12 gün boyunca bozunmaya karşı direnç göstermiş ve en fazla %50 oranında bozunmuştur. 5JKBN grubu içerisindeki hBN ile düşük derişimli polimerlerin etkisiyle

hızlı bozunma davranışı sergilemiştir. 7,5JKBN grubu ise diğer grupların aksine aynı sürede %30 oranında bozunarak dayanıklılığını kanıtlamıştır. DSC analizi sonucunda 7,5JKBN-CR doku iskelesi grubunun hBN içermeyen gruba göre daha erken bozunduğu, iyonik olarak bağlı 7,5JKBN biyomürrekçelerinin ise bozunmaya ve ani sıcaklık değişimine direnç gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca doku iskelesinin fiziksel ve kimyasal çapraz bağlamanın su tutma kapasitesi doğrudan etkilediği gözlemlenmiştir. İyonik bağlanma biyobaskı için istenen jelleşmeyi sağladığı ve kovalent bağlı gruplara kıyasla suyu daha fazla tuttuğu tespit edilmiştir. Kovalent bağlanmanın doku iskelelerini şekilsel stabilitesini sağlarken su tutma kapasitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Kovalent çapraz bağlanma sonrası stereo görüntülerinde liyofilizasyon işleminin iyonik olarak bağlı grupların 3B morfolojisini bozduğu ve gerilmelere karşı dayanıksız olduğu belirlenmiştir. Kovalent çapraz bağlanma yapının daha stabil olmasını ve baskı sonrası şeklini korumasında yardımcı olduğu gözlemlenmiştir. SEM görüntülemesi sonucunda liyofilizasyon işlemi 5JK grubunun yüzenin gözenekli olmasını sağlarken 7,5JKBN grubunun ise yönlenmiş pürüzlü yapıda olmasını sağlamıştır.

hBN nanopartiküllerinin hidrofobik etkisi 7,5JKBN grubunu yüzeyle temasını azaltsa da 3B baskı sonrası yüzey morfolojisinde uygulattığı değişiklikler biyoyumluluğunun diğer gruplardan daha fazla olmasını sağlamaktadır. Bu özellik hidrofobik malzemelerin biyoyumluluğunu artırmaktadır (Meng, ve diğerleri, 2017).

Biyoyumluluk testi sonucunda hBN nanopartikülleri içeren yüksek viskoziteli grubun hBN içermeyen gruba göre hücrelerin doku iskelesi yüzeyinde daha fazla tutunduğu, çoğaldığı ve göç ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda hBN nanopartiküllerinin 3B biyobaskıdaki üretim zorluklarının üstesinden gelerek, yeni yapılacak biyomürrekkep çalışmalarında nanokompozit olarak kullanımını mümkün kılabilir. Ayrıca hBN nanopartikülleri, sağladığı önemli katkılardan dolayı doku iskelesi gibi çeşitli biyomalzemelerin geliştirilmesinde kullanılabileceği önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Abbasi, N., Hamlet, S., Love, R. M., & Nguyen, N. (2020). Porous Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 5 (1), 1-9.
- Aki, D., Ulag, S., Unal, S., Sengor, M., Ekren, N., Lin, C. C., . . . Gunduz, O. (2020). 3D printing of PVA/hexagonal boron nitride/bacterial cellulose composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials & Design*, 196 (1), 109094.
- Alaribe, F. N., Manoto, S. L., & Motaung, S. C. (2016). Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering. *Biologia*, 71 (4), 353-366.
- Aslan, E., Almeida, H., Al-Deyab, S., El-Newehy, M., Bartolo, H., & Bártolo, P. (2020). The Electrospinning Process. B. Bidanda, & P. Bártolo içinde, *Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications* (s. 153-184). Switzerland: Springer.
- Aydin, L., Kucuk, S., & Kenar, H. (2020). A universal self-eroding sacrificial bioink that enables bioprinting at room temperature. *Polymers for Advanced Technologies*, 31, 1-14.
- Bedell, M., Navara, A., Du, Y., Zhang, S., & Mikos, A. (2020). Polymeric Systems for Bioprinting. *Chem Rev*, 120 (19), 10744-10792.
- Bettini, R., Romani, A. A., Morganti, M. M., & Borghetti, A. F. (2008). Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68 (1), 74-81.
- Boraschi-Diaz, I., Wang, J. M., & Komarova, S. V. (2017). Collagen Type I as a Ligand for Receptor-Mediated Signaling. *Frontiers in Physics*, 5 (1), 12.
- Can, Y., Karaca, R., Özbek, F., Boz, G., Yılmaz Aktuna, A., & Yılğör Huri, P. (2020). Bioinks for Bioprinting Tissues and Organs. *Natural and Applied Sciences Journal*, 3 (2), 13-33.

- Chang, H.-I., & Wang, Y. (2011). Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. D. Eberli içinde, *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials* (s. 569-589). Shanghai: IntechOpen.
- Chansoria, P., Schuchard, K., & Shirwaiker, R. A. (2020). Process hybridization schemes for multiscale engineered tissue biofabrication. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 13 (1), 1-26.
- Chen, D. X. (2019). Biomaterials for Bioprinting. D. X. Chen içinde, *Extrusion Bioprinting of Scaffolds for Tissue Engineering Applications* (s. 33-47). Cham (Switzerland): Springer Nature.
- Cui, X., Li, J., Hartanto, Y., Durham, M., Tang, J., Zhang, H., & ... Woodfield, T. (2020). Advances in Extrusion 3D Bioprinting: A Focus on Multicomponent Hydrogel-Based Bioinks. *Advanced Healthcare Materials*, 9, 1-26.
- Dahlin, R. L., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2011). Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17 (5), 349–364.
- Davidenko, N., Schuster, C., Bax, D., Farndale, R. W., Hamaia, S., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2016). Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *J Mater Sci: Mater Med*, 27, 148.
- Di Marzio, N., Eglin, D., Serra, T., & Moroni, L. (2020). Bio-Fabrication: Convergence of 3D Bioprinting and Nano-Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 326.
- Duru, İ., Oğuz, Ö., Öztatlı, H., Arikfidan, D., Kaya, H., Dönmez, E., & Ege, D. (2017). Principle Renewable Biopolymers and Their Biomedical Applications. V. Thakur, T. M.K., & K. M.R. içinde, *In Handbook of Composites from Renewable Materials* (s. 107–139). ABD: Wiley Scriveners.
- Egorikhina, M. N., Rubtsova, Y. P., Charykova, I. N., Bugrova, M. L., Bronnikova, I. I., Mukhina, P. A., & ... Aleynik, D. Y. (2020). Biopolymer Hydrogel Scaffold as an Artificial Cell Niche for Mesenchymal Stem Cells. *Polymers*, 12 (11), 1-16.

- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, 1–13.
- Fereshteh, Z. (2018). Freeze-drying technologies for 3D scaffold engineering. D. Y., & K. J. içinde, *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds* (s. 151–174). Woodhead Publishing.
- Fiume, M. M., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., . . . Andersen, F. A. (2015). Safety Assessment of Boron Nitride as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 34 (3), 53-60.
- Foyt, D., Norman, M., Yu, T., & Gentleman, E. (2018). Exploiting Advanced Hydrogel Technologies to Address Key Challenges in Regenerative Medicine. *Advanced healthcare materials*, 7 (8), 1-22.
- Galli, C., Parisi, L., Elviri, L., Bianchera, A., Smerieri, A., Lagonegro, P., . . . Macaluso, G. M. (2016). Chitosan scaffold modified with D-(+) raffinose and enriched with thiol-modified gelatin for improved osteoblast adhesion. *Biomedical Materials*, 11(1), 1-8.
- Gandhi, N. S., & Mancera, R. L. (2008). The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design*, 72 (6), 455–482.
- Gao, W., Zhao, Y., & Yin, H. (2018). Lateral size selection of liquid exfoliated hexagonal boron nitride nanosheets. *RSC Advances*, 8 (11), 5976–5983.
- GhavamiNejad, A., Ashammakhi, N., Wu, X. Y., & Khademhosseini, A. (2020). Crosslinking Strategies for 3D Bioprinting of Polymeric Hydrogels. *Small*, 16, 1-30.
- Golberg, D., Bando, Y., Huang, Y., Terano, T., Mitome, M., Tang, C., & Zhi, C. (2010). Boron nitride nanotubes and nanosheets. *ACS Nano*, 4 (6), 2979-2993.
- Hacıoglu, A., Yilmazer, H., & Ustundag, C. B. (2018). 3D printing for tissue engineering applications. *Politeknik Dergisi*, 21 (1), 221-227.
- Hakobyan, D., Kerouredan, O., Remy, M., Dusserre, N., Medina, C., Devillard, R., . . . Oliveira, H. (2020). Laser-Assisted Bioprinting for Bone Repair. J. M. Crook

- içinde, *3D Bioprinting: Principles and Protocols* (s. 135-144). New York: Humana Press.
- Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D., & Ozbolat, I. T. (2017). The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*, 35 (2), 217–239.
- Hölzl, K., Lin, S., Tytgat, L., Van Vlierberghe, S., Gu, L., & Ovsianikov, A. (2016). Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*, 8 (3), 1-19.
- http-1. (2017, Nisan 13). *Bioprinting Markets: Materials, Equipment And Applications – 2017 To 2027: An Opportunity Analysis And Ten-year Forecast*. Smart Tech Analysis : <https://www.smartechanalysis.com/reports/bioprinting-markets/> adresinden alındı
- Huh, J. T., Yoo, J. J., Atala, A., & Lee, S. J. (2020). Three-dimensional bioprinting for tissue engineering. *Principles of Tissue Engineering*, 38, 1391–1415.
- Jedrzejczak-Silicka, M., Trukawka, M., Piotrowska, K., & Mijowska, E. (2020). Few-Layered Hexagonal Boron Nitride: Functionalization, Nanocomposites, and Physicochemical and Biological Properties. M. Ince, O. Kaplan Ince, & G. Ondrasek içinde, *Biochemical Toxicology - Heavy Metals and Nanomaterials* (s. 1-18). IntechOpen.
- Kačarević, Ž., Rider, P., Alkildani, S., Retnasingh, S., Smeets, R., Jung, O., . . . Barbeck, M. (2018). An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. *Materials*, 11 (11), 2199.
- Kar, F., Hacıoğlu, C., Göncü, Y., Söğüt, İ., Şentürk, H., D., B. D., . . . N., A. (2021). In Vivo Assessment of the Effect of Hexagonal Boron Nitride Nanoparticles on Biochemical, Histopathological, Oxidant and Antioxidant Status. *Journal of Cluster Science*, 32, 517–529.
- Kariduraganavar, M. Y., Kittur, A. A., & Kamble, R. R. (2014). Polymer Synthesis and Processing. S. G. Kumbar, & D. M. içinde, *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (s. 1-31). Elsevier Science.

- Khoeini, R., Nosrati, H., Akbarzadeh, A., Eftekhari, A., Kavetsky, T., Khalilov, R., . . . Ozbolat, I. (2021). Natural and Synthetic Bioinks for 3D Bioprinting. *Adv. NanoBiomed Res.*, 2021, 1-19.
- Kıvanç, M., Barutca, B., Koparal, A. T., Göncü, Y., Bostancı, S. H., & Ay, N. (2018). Effects of hexagonal boron nitride nanoparticles on antimicrobial and antibiofilm activities, cell viability. *Materials Science and Engineering: C*, 91, 115–124.
- Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, 5, 1-17.
- Kusindarta, D., & Wihadmadyatami, H. (2018). The Role of Extracellular Matrix in Tissue Regeneration. H. A. Kaoud içinde, *Tissue Regeneration* (s. 65-73). London: IntechOpen .
- Langer, R., & Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, 14;260(5110), 920-6.
- Li, L., Yu, F., Zheng, L., Wang, R., Yan, W., Wang, Z., & ... Jiang, Q. (2018). Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application. *Journal of Orthopaedic Translation*, 14 (17), 26-41.
- Mao, H., Yang, L., Zhu, H., Wu, L., Ji, P., Yang, J., & Zhongwei Gu. (2020). Recent advances and challenges in materials for 3D bioprinting. *Progress in Natural Science: Materials International*, 30 (5), 618-634.
- Mao, J., Cui, Y., Wang, X., Sun, Y., Yin, Y., Zhao, H., & De Yao, K. (2004). A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials*, 25 (18), 3973-3981.
- Marieb, E., & Keller, S. (2017). Essentials of human anatomy & physiology. N. E. Marieb, & S. Keller içinde, *Essentials of human anatomy & physiology* (s. 62-108). New York: Pearson.
- Matović, B., Luković, J., Nikolić, M., Babić, B., Stanković, N., Jokić, B., & Jelenković, B. (2016). Synthesis and characterization of nanocrystalline hexagonal boron

- nitride powders: XRD and luminescence properties. *Ceramics International*, 42 (15), 16655–16658.
- McKee, T., Perlman, G., Morris, M., & Komarova, S. (2019). Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 9 (1), 1-15.
- Meng, J., Yang, G., Liu, L., Song, Y., Jiang, L., & Wang, S. (2017). Cell adhesive spectra along surface wettability gradient from superhydrophilicity to superhydrophobicity. *Science China Chemistry*, 60 (5), 614–620.
- Merceron, T. K., & Murphy, S. V. (2015). Hydrogels for 3D Bioprinting Applications. A. Atala, & J. Yoo içinde, *Essentials of 3D Biofabrication and Translation* (s. 249–270). Academic Press.
- Mndlovu, H., du Toit, L., Kumar, P., Choonara, Y., Marimuthu, T., Kondiah, P., & Pillay, V. (2020). Bioplatfrom Fabrication Approaches Affecting Chitosan-Based Interpolymer Complex Properties and Performance as Wound Dressings. *Molecules*, 25 (1), 222.
- Mora-Boza, A., Włodarczyk-Biegun, M. K., Del Campo, A., Vázquez-Lasa, B., & Román, J. S. (2020). Glycerylphytate as ionic crosslinker for 3D printing of multi-layered scaffolds with improved shape fidelity and biological features. *Biomaterial Science*, 8, 506-516.
- Mukheem, A., Shahabuddin, S., Akbar, N., Miskon, A., Muhamad Sarih, N., Sudesh, K., . . . Sridewi, N. (2019). Boron Nitride Doped Polyhydroxyalkanoate/Chitosan Nanocomposite for Antibacterial and Biological Applications. *Nanomaterials*, 9 (4), 645.
- Murphy, S., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32, 773-785.
- Ng, W. L., Yeong, W. Y., & Win Naing, M. (2016). Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. *International Journal of Bioprinting*, 2 (1), 53-62.

- Nieto-Suárez, M., López-Quintela, M. A., & Lazzari, M. (2016). Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly. *Carbohydrate Polymers*, 141, 175–183.
- Noh, S., Myung, N., Park, M., Kim, S., Zhang, S.-U., & Kang, H.-W. (2017). 3D Bioprinting for Tissue Engineering. B. Kim içinde, *Clinical Regenerative Medicine in Urology* (s. 105–123). Singapore: Springer.
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14 (3), 88–95.
- Ochando, J., Fayad, Z., Madsen, J., Netea, M., & Mulder, W. (2020). Trained immunity in organ transplantation. *Am J Transplant*, 20 (1), 10–18.
- O'Connell, C., Ren, J., Pope, L., Li, Y., Mohandas, A., Blanchard, R., . . . Onofrillo, C. (2020). Characterizing Bioinks for Extrusion Bioprinting: Printability and Rheology. J. Crook içinde, *3D Bioprinting Principles and Protocols* (s. 2140, 111–133). Humana Press.
- Ouyang, L. (2019). 3D Bioprinting and Bioink: Background. L. Ouyang içinde, *Study on Microextrusion-based 3D Bioprinting and Bioink Crosslinking Mechanisms* (s. 7–23). Springer.
- Özbolat, I. T. (2016). *3D Bioprinting Fundamentals, Principles and Applications*. Academic Press.
- Parvez, S., Rahman, M. M., Khan, M. A., Khan, M. A., Islam, J. M., Ahmed, M., . . . Ahmed, B. (2012). Preparation and characterization of artificial skin using chitosan and gelatin composites for potential biomedical application. *Polymer Bulletin*, 69, 715–731.
- Pati, F., Jang, J., Lee, J. W., & Cho, D.-W. (2015). Extrusion Bioprinting. A. Atala, & J. Yoo içinde, *Essentials of 3D Biofabrication and Translation* (s. 123–152). Academic Press.
- Perelshtein, I., Ruderman, E., Perkash, N., Tzanov, T., Beddow, J., Joyce, E., . . . Gedanken, A. (2013). Chitosan and chitosan–ZnO-based complex nanoparticles:

- formation, characterization, and antibacterial activity. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(14), 1968-1976.
- Polini, A., & Yang, F. (2017). Physicochemical characterization of nanofiber composites. R. Murugan, & R. Seeram içinde, *Nanofiber Composites for Biomedical Applications* (s. 97-115). Woodhead Publishing.
- Prasopthum, A., Shakesheff, K. M., & Yang, J. (2018). Direct three-dimensional printing of polymeric scaffolds with nanofibrous topography. *Biofabrication*, 10 (2), 1-13.
- Raman, R., & Bashir, R. (2015). Stereolithographic 3D Bioprinting for Biomedical Applications. A. Atala, & J. Yoo içinde, *Essentials of 3D Biofabrication and Translation* (s. 89–121). Academic Press.
- Ramirez Leyva, J. H., Vitale, G., Hethnawi, A., Hassan, A., Perez-Zurita, M. J., Ruiz-Esparza, G. U., & Nassar, N. N. (2018). Mechanism of Hierarchical Porosity Development in Hexagonal Boron Nitride Nanocrystalline Microstructures for Biomedical and Industrial Applications. *ACS Applied Nano Materials*, 1 (9), 4491-4501.
- Risbud, M. V., Karamuk, E., Moser, R., & Mayer, J. (2002). Hydrogel-Coated Textile Scaffolds as Three-Dimensional Growth Support for Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs): Possibilities as Coculture System in Liver Tissue Engineering. *Cell Transplantation*, 11 (4), 369-377.
- Roehm, K. D., & Madihally, S. V. (2017). Bioprinted chitosan-gelatin thermosensitive hydrogels using an inexpensive 3D printer. *Biofabrication*, 10 (1), 015002.
- Samie, M., Yameen, M. A., Ikram, H. F., Iqbal, H., Chaudhry, A. A., Ur Rehman, I., & Khan, A. F. (2020). Fabrication of dual drug loaded bilayered chitosan based composite scaffolds as osteochondral substitutes and evaluation of in vitro cell response using the MC3T3 pre-osteoblast cell line. *Cellulose*, 27, 2253–2266.
- Saravanan, S., Leena, R. S., & Selvamurugan, N. (2016). Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1354–1365.

- Schwab, A., Levato, R., D'Este, M., Piluso, S., Eglin, D., & Malda, J. (2020). Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chemical Reviews*, 120 (19), 11028-11055.
- Serna, J., Florez, S., Talero, V., Briceño, J., Muñoz-Camargo, C., & Cruz, J. (2019). Formulation and Characterization of a SIS-Based Photocrosslinkable Bioink. *Polymers*, 11 (3), 569.
- Shtansky, D., Firestein, K., & Golberg, D. (2018). Fabrication and application of BN nanoparticles, nanosheets and their nanohybrids. *Nanoscale*, 10, 17477-17493.
- Sykes, M., & Sachs, D. H. (2019). Transplanting organs from pigs to humans. *Science Immunology*, 4 (41), 1-27.
- Şen, Ö., Emanet, M., & Çulha, M. (2019). Stimulatory Effect of Hexagonal Boron Nitrides in Wound Healing. *ACS Applied Bio Materials*, 2 (12), 5582–5596.
- Taskin, I. C., Sen, O., Emanet, M., Culha, M., & Yilmaz, B. (2020). Hexagonal boron nitrides reduce the oxidative stress on cells. *Nanotechnology*, 31 (21), 215101.
- Tay, M. (2016). Türkiye’de doku ve organ naklinin önemi. *Sağlık Akademisyenleri Dergisi*, 3 (3), 106-110.
- Thakur, G., Rodrigues, F. C., & Singh, K. (2018). Crosslinking Biopolymers for Advanced Drug Delivery and Tissue Engineering Applications. H. Chun, C. Park, I. Kwon, & G. Khang içinde, *Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine* (s. 213–231). Singapore: Springer.
- Üçgül, İ., Aras, S., & Elibüyük, U. (2018). EKSTRASELÜLER MATRİS YAPISI VE GÖREVLERİ. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 23, 295-310.
- Vijayavenkataraman, S., Yan, W.-C., Lu, W. F., Wang, C.-H., & Fuh, J. Y. (2018). 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 296-332.
- Wang, X., Ao, Q., Tian, X., Fan, J., Tong, H., Hou, W., & Bai, S. (2017). Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. *Polymers*, 9(12), 401.

- Webb, B., & Doyle, B. J. (2017). Parameter optimization for 3D bioprinting of hydrogels. *Bioprinting*, 8, 8–12.
- Willson, K., Ke, D., Kengla, C., Atala, A., & Murphy, S. (2020). Extrusion-Based Bioprinting: Current Standards and Relevancy for Human-Sized Tissue Fabrication. J. Crook içinde, *3D Bioprinting. Methods in Molecular Biology*, (s. 2140, 65-92). New York: Humana.
- Xue, M., & Jackson, C. J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, 4 (3), 119–136.
- Yanagishita, M. (1993). Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Pathology International*, 43 (6), 283–293.
- Yang, Z., Chaieb, S., & Hemar, Y. (2021). Gelatin-Based Nanocomposites: A Review. *Polymer Reviews*, 2021, 1-49.
- Yıldırım, Z., Öncül, N., & Yıldırım, M. (2016). KİTOSAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi.*, 5, 19-36.
- Yousefi, A., Akbarzadeh, R., & Yousefi, A.-M. (2014). Effects of Processing Parameters in Thermally Induced Phase Separation Technique on Porous Architecture of Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*, 102 (6), 1304-1315.
- Zhang, Y. S., Yue, K., Aleman, J., Mollazadeh-Moghaddam, K., Bakht, M. S., Yang, J., & Khademhosseini, A. (2016). 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Annals of Biomedical Engineering*, 45 (1), 148–163.
- Zhu, N., & Che, X. (2013). Biofabrication of Tissue Scaffolds. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*, 12, 315-328.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aykut ERDOĞAN

ÖĞRENİM DURUMU

- Yüksek Lisans: Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler A.B.D., Tezli Biyoteknoloji Y.L. (2018-2021)
- Lisans: Kastamonu Üniversitesi, Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kastamonu, (2013-2018)
- Lise: Fatih Anadolu Lisesi, Kahramanmaraş (2009-2013)

MESLEKİ DENEYİM

- Bugamed Biyoteknoloji Ar-GE Yazılım San. Tic. Ltd. Şti., Ar-Ge Mühendisi, Eskişehir, 2018 (Halen Devam Ediyor)
- Kısmi Zamanlı Personel, Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Lab., Doku Mühendisliği, Biyomalzeme, Kök Hücre Laboratuvarı, Kastamonu, 2016
- Akdeniz Üniversitesi, Teknopark, Nano-En Arge Şirketi (Biyomalzeme), Staj, Antalya, 2016
- Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Staj, Antalya, 2015

KATILINAN KURSLAR VE ALINAN SERTİFİKALAR

- ISO 14971:2019 Tıbbi Cihaz Risk Yönetimi Eğitimi, Q MEN Bilişim Yazılım Danışmanlık Eğitim San. ve Tic. Ltd. Şti., 29 Mart 2021
- ISO 13485:2016 İç Tetkik Eğitimi, Q MEN Bilişim Yazılım Danışmanlık Eğitim San. ve Tic. Ltd. Şti., 25-26 Mart 2021
- ISO 13485:2016 KYS'DE Dokümantasyon Gereklilikleri Eğitimi, Q MEN Bilişim Yazılım Danışmanlık Eğitim San. ve Tic. Ltd. Şti., 23-24 Mart 2021
- Hacettepe Üniversitesi, III. Teorik ve Uygulamalı Doku Mühendisliği Kursu, Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu/Ankara 24-28 Eylül 2018
- Acıbadem Üniversitesi, Bioprinting Workshop Axolotlbio Şirketi/İstanbul 12 Temmuz 2018
- Yalova Üniversitesi, 'Molecularly Engineered Biomaterials for the Treatments of Diabetic Wounds' Semineri ve Workshop'u, Polimer Mühendisliği Bölümü Yalova, 11 Nisan 2018
- İş Sağlığı ve Güvenliği Sertifikası, C1 Seviyesi, 2016
- GMP : İyi Üretim Uygulamaları Başarı Sertifikası, 2014
- GLP : İyi Laboratuvar Uygulamaları Başarı Sertifikası, 2014
- GHP : İyi Hijyen Uygulamaları Başarı Sertifikası, 2014

GÖREV ALINAN PROJELER

- Proje Yürütücüsü, Gümüşhane ve Çevresinde Bulunan Bazı Endemik Bitki Türlerinin Fenolik İçeriklerinin Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması, Tübitak 2209/a Üniversite Öğrencileri Yurtiçi Araştırma Projeleri Destek Programı, 2014
- Araştırmacı, Doğal Doku Kaynaklı Biyomalzemelerden Yara Örtüsü Geliştirilmesi, Tübitak 1512 Teknogirişim Sermayesi Destekleme Programı, 2018
- Araştırmacı, Temiz Üretim Teknolojileri ile Yerli Kolajen Üretimi, KOSGEB Ar-Ge, İnovasyon ve Endüstriyel Uygulama Destek Programı, 2018-2019
- Araştırmacı, Yerli Üretim Stratejileri ile Sürdürülebilir Yüksek Moleküler Ağırlıklı Hyaluronik Asit (HA) Üretimi, KOSGEB Ar-Ge, İnovasyon ve Endüstriyel Uygulama Destek Programı, 2020-2021
- Araştırmacı ve Fikir Sahibi, Akut Yaraların İyileşmesini Hızlandırıcı Deselülarize Biyomalzemelerden Deri Rejenerasyonunu Sağlayan Bir Veterinerlik Sağlık Ürününün Geliştirilmesi: BUGA-VET WOUND DRESSING, Tübitak 1501-Sanayi Ar-Ge Destek Programı, 2021-Devam ediyor.
- Araştırmacı, Osteojenik Biyoseramik Takviyeli Üç Katmanlı Elektroğrılmış Fiberlerin Geliştirilmesi- Kemik Rejenerasyonu, 2553-Ar-Ge ve Yenilik Projeleri-Pakistan Bilim Vakfı (PSF) ile İkili İşbirliği Programı Proje no: 121N205, 2021-Devam ediyor.

YAYINLAR VE PATENTLER

- Erdoğan A., Turan İ., Arslan S., Şahin G., Kaçıran A., Artuk Y., Gümüşhane ve Çevresinde Bulunan Bazı Endemik Bitki Türlerinin Çiçek Kısımlarının Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması, IV. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, Poster Bildirisi, s. 15-16, (2016), Elazığ.
- Kara Mağden G., Erdoğan A., Avcı H., Nurbaş M., Ekolojik Yaklaşımla Selüloz/plga/ngf Nanoliflerin Sinir Hasarlarının Tedavisinde Kullanımı, X. UTİB Türkiye Tekstil ve Konfeksiyon. Sektöründe Ar-Ge Proje Pazarı Zirvesi, Poster Sunumu, Mart 2018, Bursa.
- Erdoğan A., Sümbelli Y., Ay N. 3 Boyutlu Biyoyazıcı ile Yüksek Viskoziteli Jelatin-Kitosan Biyomürekkeplerinin hBN Nanopartiküllerinin Etkisiyle Basılabilirliğinin İyileştirilmesi. İstinye Üniversitesi Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Sempozyumu, Sözlü Bildiri, Şubat 2021, İstanbul.
- Buluşçu, Türk Patent ve Marka Kurumu, Patent adı ve no; Kolajen Üretim Yöntemi, 2019/15913.
- Buluşçu, Dünya Patent Ofisi, Patent adı ve no; "A Collagen Production Process, WO2021076079".