T.C.

YILDIZ TEKNİK □NİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİT□S□

BAKTERİYEL SEL□LOZ TEMELLİ BİYOMALZEMELERİN □□BOYUTLU BASIMI

Nevra Pelin CESUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Temmuz, 2021

T.C.

YILDIZ TEKNİK □NİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİT□S□

BAKTERİYEL SEL□LOZ TEMELLİ BİYOMALZEMELERİN □□ BOYUTLU BASIMI

Nevra Pelin CESUR tarafından hazırlanan tez çalışması 08.07.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **Y□KSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Nelisa TÜRKOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

J□ri □yeleri

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK, Üye
Hacı Bayram Veli Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Esra YÜCA YILMAZ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Bakteriyel Selüloz Temelli Biyomalzemelerin Üç Boyutlu Basımı başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Nevra Pelin CESUR

İmza

Daha Güzel Yarınlara…

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca tüm katkılarıyla beni yönlendiren, ilgi ve anlayışını eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, beni her daim güler yüzüyle motive eden değerli hocam Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLI LAÇİN'e,

Beni Tam 20 yıldır hiç yalnız bırakmayan, her daim yanımda olan, düştüğümde kalkmamı sağlayan, her anımı paylaştığım canım güzel kalpli arkadaşım Büşra ÖZLÜ'ye,

Aşk ile şevk ile gittiğim laboratuvarımızda çalıştığım her an boyunca yanımda olan, değerli çalışma arkadaşlarım Volkan YALMAN ve Seda GENÇ'e,

2020 yılında bana en güzel duyguları katmasını sağlayan, beraberken çok eğlendiğim, güldüğüm, aynı zamanda tüm derdimi, göz yaşımı, sevincimi, hasretimi en içten şekilde paylaştığım, benim vız vız arkadaşlarım Leyla ŞAHVERDİ, Elif UZUN, Büşra Nur BAYGIN ve Ezgi DEMİRKILIÇ ve tüm kalbiyle bana destek olan Yakup ARTİK'e,

Küçüklüğümüzden beri her daim yanımda olan, kardeşten bir farkı olmayan, her zaman bir telefon uzağımda olan, çok ama çok sevdiğim benim güzel kuzenlerim Aydan CESUR ve Özge BİLGİÇ'e,

Evin tek çocuğu olduğum halde bana her zaman güvenen, destekleyen, ne olursa olsun koşulsuz şartsız bana destek olan, zor zamanlarımda bana güçlü ve sabırlı olmayı öğreten, canım annem Zerrin CESUR ve babam Aykut CESUR'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Nevra Pelin CESUR

İ□İNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ vii
KISALTMA LİSTESİ viii
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xi
□ZET xiii
ABSTRACT xv
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti....1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez....3
2 GENEL BİLGİLER 4
2.1 Doku Muhendisliği....4
2.2 Biyomalzemeler 8
2.2.1 Tanım ve Tarihçe……9
2.3 Biyomalzemelerin Özellikleri……...10
2.3.1 Toksik olmama……11
2.3.2 Biyomalzemelerin Biyouyumluluğu……...11
2.3.3 Vücut Tepkisine Karşı Yoksunluk……..12
2.3.4 Biyomalzemelerin Mekanik Özellikleri……...12
2.3.5 Biyomalzemelerin Tasarım Özellikleri……..13
2.4 Biyomalzeme Çeşitleri……..13
2.4.1 Metaller……14
2.4.2 Seramikler……15
2.4.3 Kompozit Malzemeler……...16
2.4.4 Polimerler……17
2.5 Bakteriyel Selüloz……..20
2.5.1 Bakteriyel Selülozun 3B'lu Sistemlerdeki Yeri……..27
2.6 3B'lu Yazıcı Sistemleri……29
2.6.1 Biyoprinterler (Biyo-yazıcılar)……..29
2.6.2 Katmanlı Üretim Sağlayan 3B'lu Yazıcılar……...32
2.7 Dokuların Görüntülenmesi ve Tasarlanması……33

2.8 Biyomürekkep Seçimi……34
3. MATERYEL METOD **38**
3.1 Materyal……..38
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemler……..…38
3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar……...38
3.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar……..…39
3.2 Metod ……45
3.2.1 BS Temelli Biyomürekkep Hazırlanması ……..……...46
3.2.2 Vasküler Greftin 3B'lu Basım Stratejisi……..……46
3.2.3 3B'lu Vasküler Greftin Karakterizasyonu..……...…….47
3.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları…….....……..51
4. SONUÇ VE ÖNERİLER **57**
4.1 BS Temelli Biyomürekkep Hazırlanması…….……57
4.2 Vasküler Greftin 3B'lu Basım Stratejisi……..…..58
4.3 3B'lu Basılan Vasküler Greftin Karakterizasyonu……..59
4.3.1 Yüzey Morfolojisi…….....59
4.3.2 Yüzey Alanı Analizi…….....61
4.3.3 Termogravimetrik Analiz……..……61
4.3.4 Dinamik Mekanik Analiz……..…..62
4.3.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi……..…64
4.3.6 Raman Spektroskopisi…….……..…65
4.3.7 Şişme Analizi……...……..…66
4.3.8 Biyodegredasyon Analizi…….……67
4.3.9 Protein Adsorpsiyon Kapasitesi…….……..…68
4.4 Hücre Kültürü Çalışmaları……...…69
4.4.1 3B'lu Basılan Vasküler Greftin Sitotoksisite Çalışmaları……..…69
4.4.2 3B'lu Basılan Vasküler Greftin Hücre Adezyon Çalışmaları……....71
4.4.3 3B'lu Basılan Vasküler Greftin Histokimyasal Analizi ve Floresan Mikroskobu ile Görüntülenmesi……..73
4.4.4 Antioksidan Kapasite Çalışmaları……..…….……...73
KAYNAK□A **75**
TEZDEN TÜRETİLMİŞ YAYINLAR **91**

SİMGE LİSTESİ

mA	Akım
α	Alfa
N_2	Azot
$ß$	Beta
ZnSO	Çinko Sülfat
Dk	Dakika
K_2HPO_4	Dipotasyum Fosfat
g	Gram
Hz	Hertz
HCl	Hidroklorik Asit
CO_2	Karbondioksit
1kV	Kilo Volt
kPa	Kilopascal
Cl_2	Klor
Co	Kobalt Alaşımı
Cr	Krom
G	Kütle Çekim Sabiti
MPa	Megapascal
μl	Mikro Litre
μm	Mikro Metre
ml	Mili Litre
Mm	Mili Molar
mg	Miligram
nm	Nano Metre
O_2	Oksijen
316L	Paslanmaz Çelik
KH_2PO_4	Potasyum Fosfat
pH	Power of Hydrogen “Hidrojenin Gücü”
sa	Saat
cm	Santimetre
°C	Sentigrad Derece
NaOH	Sodyum Hidrooksit
NaCl	Sodyum Klorür
Ti	Titanyum
Cp-Ti, Ti_6Al_4V	Titanyum ve Alaşımları

KISALTMA LİSTESİ

2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
3B Yazıcı	Üç Boyutlu Yazıcılar
A.Xylinum	*Acetobakter Xylinum*
BNS	Bakteriyel Nanoselüloz
BS	Bakteriyel Selüloz
BSA	Sığır Serum Albümini
CAD	Bilgisayar Destekli Tasarım
CHD	Doğuştan Kalp Hastalığı
CLIP	Sürekli Sıvı Ara Yüz Üretimi
CT	Bilgisayarlı Tomografi
DAPI	4',6-Diamin-2"-Fenilindol Dihidroklorür Boyası
DECM	Hücresizleştirilmiş Ekstrasellüler Matriks
DMA	Dinamik Mekanik Analiz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DTA	Differansiyel Termal Analiz
E.Coli	*Escherichia Coli*
ECM	Ekstrasellüler Matrik
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	U.S. Food And Drug Administration Yada Birleşik Devletler Gıda Ve İlaç Dairesi
FDM	Kaynaştırılmış Biriktirme Modelleme
FIR	Uzak Dalga Boylu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAG	Glikozaminoglikan
H&E	Hematoksilin&Eosin Boyası
HUVEC	İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri Hücre Hattı
INT	(2-(4-İyodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5- Feniltetrazolyum Klorit)
LAB	Lazer Destekli Biyoyazıcılar
LFS	Düşük Güçlü Stereolitografi
LPU	Işık İşleme Birimi
M.S.	Milattan Sonra
MIR	Orta Dalga Boylu
MITI	Uluslararası Ticaret Ve Sanayi Bakanlığı
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenlytetrazolium Bromide
NIR	Yakın Dalga Boylu
Nötral Red	(3-Amino-M-Dimetilamino-2-Metilfenazin Hidroklorür)
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCL	Polikaprolakton
PEG	Poli Etilen Glikol
PGA	Poli Glikolik Asit

PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli Laktik-Ko-Glikolik Asit
PLGA	Poli Laktik-Ko-Glikolik Asit
PMMA	Poli Metil Metakrilat
RPE	Retina Pigment Epiteli
Rpm	Dakikada Devir Sayısı
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Besi Yeri
S.Aureus	*Staphylococcus Aureus*
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SLA	Stereolitografi
SLS	Seçici Lazer Sinterleme
STL	Standard Triangle Language
TAS	Toplam Antioksidan Kapasite
TG	Termogravimetrik Analiz
UV	Ultraviyole
WRC	Su Tutma Kapasitesini
XTT	(2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5 Karboksanilide)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Doku mühendisliği bileşenleri..……..……..……..6

Şekil 2.2 Biyomalzeme Çeşitleri……..……..……..14

Şekil 2.3 Polimer Yapısı ……..……..18

Şekil 2.4 Bakteriyel selülozun yapısal formu……..……21

Şekil 2.5 Bakteriyel selülozun biyosentezi……..……22

Şekil 2.6 Bakteriyel selülozun sahip olduğu özellikler……..……23

Şekil 2.7 Bakteriyel selülozun uygulama alanları……..……26

Şekil 2.8 3B'lu baskı işlemleri……..……34

Şekil 2.9 Biyomürekkep formülasyonun özellikleri……...35

Şekil 3.1 Hassas Terazi……...…..39

Şekil 3.2 Sonikatör……..……40

Şekil 3.3 Manyetik Karıştırıcı……..……40

Şekil 3.4 Çalkalamalı İnkübatör……..……..40

Şekil 3.5 Santrifüj Cihazı……..41

Şekil 3.6 Mini Santrifüj……41

Şekil 3.7 Vortex……..……41

Şekil 3.8 Liyafilizatör……...……..……42

Şekil 3.9 FI-IR Cihazı……..……..42

Şekil 3.10 CO_2 İnkübatör……...……...……..42

Şekil 3.11 Otoklav……..……...……43

Şekil 3.12 İnvert Mikroskop……43

Şekil 3.13 Taramalı Elektron Mikroskobu……..……43

Şekil 3.14 Biyogüvenlik Kabini……..…..44

Şekil 3.15 Elisa Reader……....44

Şekil 3.16 Bet Cihazi……...……....44

Şekil 3.17 RAMAN Cihazı……...45

Şekil 3.18 TG/DTA Cihazı…….....45

Şekil 3.19 Form2 3B'lu Yazıcısı……..45

Şekil 4.1 Biyomürekkep formülasyonu için BS'nin çözünmesi……...58

Şekil 4.2 BS tabanlı biyomürekkebin 3B'lu tasarım stratejisi……..….59

Şekil 4.3 BS'nin 3B nano ağ yapısının SEM mikro fotoğrafları, 3B'lu baskılı aortun malzeme mikroskobu yapısı ve 3B'lu baskılı aortun 3B nano ağ yapısının SEM mikro fotoğrafları, 3B'lu baskılı aortun yanal kesiti ……..……..…..60

Şekil 4.4 3B'lu baskılı vasküler greftin TG / DTA analizi……..……62

Şekil 4.5 FT-IR bağ yapısı……...…….…..……65

Şekil 4.6 RAMAN bağ yapısı…….……66

Şekil 4.7 3B'lu Basılan Vasküler Greftin Su Tutma Kapasitesi……..……67

Şekil 4.8 3B'lu Baskılı Vasküler Greftin Biyodegredasyon Analizi……...68

Şekil 4.9 3B'lu Vasküler Greftin Protein Adsorpsiyon Kapasitesi……....69

Şekil 4.10 3B'lu baskılı vasküler greftin HUVEC hücre hattı üzerinde in vitro sitotoksisiteleri……...……...…70

Şekil 4.11 3B'lu vasküler greftin hücre tutunma kapasiteleri……..……..71

Şekil 4.12 a-pozitif kontrol, b-negatif kontrol, c-24 saat sonunda hücre adezyonu, d-52 saat sonunda hücre adezyonu, e-72 saat sonunda hücre
adezyonu……...…….72

Şekil 4.13 a) 72 saat sonra hücre bağlanmasının inverted mikroskop ile görüntüsü…..……73

Şekil 4.14 3B'lu basımı gerçekleştirilen vasküler greftlerin HUVEC hücre hattı üzerinde Total Antioksidan Kapasitelerinin değerlendirilmesi…74

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Polimer Matrislerin Sınıflandırılması……..……...18
Tablo 4.1 3B'lu Vasküler Greft Örneğinin BET sonuçları…….……..61
Tablo 4.2 3Blu Baskılı Vasküler Greftin Mekanik Davranışı…….……..…63
Tablo 4.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrumu……...……..64

□ZET

Bakteriyel Sel□loz Temelli Biyomalzemelerin □□Boyutlu Basımı

Nevra Pelin CESUR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Son yıllarda; organ ve dokuların yetersizliği insanlık için en kritik sağlık sorunlarından biri olarak kabul görmektedir. Genel bir bakış olarak, iş akışı donörlerden alınan organ nakli ile başlar. Ancak, bu prosedür göründüğü kadar kolay değildir. Çünkü dokuların uyumluluğu sağlanmalı ve implante edilecek greftin akut reddi önlenmelidir. Ayrıca uzun ve bitmek bilmeyen donör listeleri de hastalar için sıkıntılı sürecin devamlılığına neden olur. Bu nedenle, bu sorunu çözmenin yollarından biri de doku mühendisliği yardımıyla yapay doku ve organların geliştirilmesidir. Yapay doku ve organların geliştirilmesi için biyomalzemeler tercih edilmektedir. Bu bağlamda metalik, seramik, kompozit ve polimerik bazlı biyomalzemeler geliştirilmektedir. Son yıllarda biyouyumluluk sağlayan bu biyomalzemelerden polimerik sınıfın bir üyesi olan mikroorganizlardan üretilen polimer bazlı biyomalzemeler popülerlik kazanmıştır. Bakteriyel selüloz bu sınıfın en popular üyesinden birisidir. Bir gram negatif bakteri türü olan *Acetobacter xylinum* (*A.xylinum)* bakteriyel selüloz elde edilmesinde kullanılmaktadır ve en verimli bakteriyel selüloz üreticidir. Bakteriyal selüloz biyouyumlu, iyi mekanik davranışa sahip hidrojel özellikte bir yapıya sahip olması ile de doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Doku mühendisliği çalışmalarında 3 Boyutlu yazıcı sistemlerinin kullanımıda

ayrıca son yıllarda değer kazanmıştır. Üretilmesi hedeflenen doku ya da organının katman katman basılabilmesi 3 Boyutlu yapının istenilen şekilde üretilmesini sağlamaktadır. Bu bağlamda tez kapsamında bakteriyel selülozun 3 Boyutlu basılması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: 3B'lu basım, kişiye özel vasküler greft, doku mühendisliği

ABSTRACT

Bacterial Cellulose Based Biomaterilas As Bioink For Three Dimensional Printing

Nevra Pelin CESUR

Department of Molecular Biology and Genetics
Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Nelisa TÜRKOĞLU

In recent years; insufficiency of organs and tissues is one of the most critical health problems for humanity. As an overview, the workflow begins with organ transplants from donors. However, this procedure is not as easy as it seems. Because the compatibility of tissues should be ensured and acute rejection of the implanted graft should be prevented. In addition, long and endless donor lists cause the continuity of the troublesome process for patients. Therefore, the development of artificial tissues and organs with the help of tissue engineering is an one of the way solution against this problem. Biomaterials are used for the development of artificial tissues and organs. In this context, metallic, ceramic, composite and polymeric based biomaterials are developed as biomaterials. Polymeric biomaterials produced from microorganisms, which are a member of the polymeric class, have gained popularity in recent years. Bacterial cellulose is the most efficient among other microbial polymers. A.xylinum, a Gram-negative bacteria species, is the most efficient source of bacterial cellulose. It has a biocompatible and well mechanical behaviour hydrogel feature and widely used for tissue engineering studies. Tissue engineering started to move away from traditionalism and 3D printing systems gained value in recent years. The ability of printing layer by layer of a tissue or an organ enables the 3D structure to be produced. In the study, we will examine the bacterial cellulose for 3D printing.

Keywords: 3D printing, patient-specific vascular graft, tissue engineering

1
GİRİŞ

1.1 Literat□r □zeti

Multi disipliner bir alan olan ‘doku mühendisliği’ özellikle de insanın kendi doğasını anlamaya, hastalık veya travma sonucu oluşan hasarlı organların ya da dokuların onarımı üzerine büyük çabalar sarfetmektedir. Tüm bu çabaların temelinde çözümün ana kaynağı olan olan biyomalzeme seçimi yatmaktadır. Günümüzde sıklıkla seramikler, metaller, polimerik malzemeler tercih edilirken kompozit biyomalzemelerin morfolojik, kimyasal, fiziksel, biyokimyasal ve mekanik özelliklerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Özellikle de insan vücudunun karmaşık doğasından kaynaklanan problemlerin önüne kompozit malzemeler ile geçirebileceği anlaşılmıştır. Ancak oluşturulacak kompozit malzemlerinde doku ve organların 3 boyutlu yapısını taklit ederek biyouyumlu bir forma dönüştürülmesi amaç edinilmiştir. Geleneksel doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları bu bağlamda eksik kalmaktadır. Bundan dolayı son yıllarda bilim yönünü 3 boyutlu (3B’lu) sistemlere çevirmiştir. 3 boyutlu sistemlerin temeli 3 boyutlu yazıcılardan (3B yazıcılar) oluşmaktadır. 3 boyutlu sistemlerde ana amaç doku ve organların üç boyutlu morfolojisini taklit etmenin yanında, uyumlu mekanik mukavemet, biyouyumlu ve hücre proliferasyonunu destekleyen yapıdadır. Bunun yanında ekstrasellüler matriksin (ECM) doğal formunun taklit edilmesi de odak konularındandır. 3B yazıcı sistemlerinde en önemli aşama biyomürekkep seçiminin doğru yapılmasıdır. Biyomürekkep oluşumunda mekanik mukavemeti yüksek olan sentetik polimerik malzemeler oldukça fazla tercih edilmesinin yanı sıra hücre adezyonunu destekleyen ve doğal ECM yapısını en iyi şekilde destekleyen doğal bazlı polimer malzemeler popülerlik kazanmıştır [1]. Özellikle de bakteri kaynaklı selüloz 3B yazıcı sistemlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Bakteriyel selüloz (BS) iyi bir hidrojel olma özelliğinin yanı sıra biyouyumlu olması, toksik olmaması, elastikiyet gücü fazla olan ve oksijen geçirgenliğine olanak sağlayan morfolojisi gibi özelliklerinden dolayı 3B’lu

sistemler için umut vaad etmektedir. BS'nin bu avantajalarının yanında su ve organik çözücülerde çözülmemesi en büyük dezavantajıdır [2]. Sunulan tez çalışmasında BS'nin çözücü sistemi optimize edilmiş ve uygun reçine sistemleri ile kompozit malzeme oluşturulmuştur. Optimizasyonu sağlanan BS'nin kompozit malzemesi bir biyomürekkep oluşmasına olanak sağlamıştır. Bir insan aort modeli baz alınarak basımı gerçekleştirilen vasküler greft örneğinin Standard Triangle Language (STL) formatına dönüştürülmesi sonunca Stereolitografi (SLA) teknolojisi ile basımı gerçekleştirilmiştir. Basımı gerçekleştirilen vasküler greftin in vitro hücre analizleri ile biyouyumlu yapısı gösterilmiş olup doku mühendisliği gibi biyomühendislik ve tıp alanlarında karşılaşılan ciddi kardiyo vasküler problemlere çözüm olma potansiyeli taşıyacaktır.

1.2 Tezin Amacı

Önerilen tez çalışmasında amacımız, BS'nin çözücü sisteminin optimizasyonu sonucunda uygun reçine sistemleri ile birleştirilmesi ile elde edilen kompozit malzemenin biyomürekkep olarak kullanılmasıdır. Elde edilen biyomürekkebin SLA teknolojisi ile 3 boyutlu bir vasküler greft örneğinin basılması amaç edinilmiştir. Aynı zamanda vasküler greftin morfolojik ve kimyasal karakterizasyonu ve 3B'lu basımı gerçekleştirilen vasküler greftin in vitro hücre çalışmaları sonucunda kardiyo vasküler tedavi süreçlerine alternatif sunması hedeflenmiştir. Sunulan tez çalışmanın amaçları aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

1.BS'nin çözücü sisteminin optimizasyonu

2. Hazırlanan bakteriyel selülozun biyomürekkep formülasyonun sağlanması

3.Bakteriyel selüloz bazlı biyomürekkebin 3B'lu basıma hazırlanması

4.STL formatında insan aort modelinin oluşturulması

5.3B'lu basımı gerçekleştirilen vasküler greftin şişme, degradasyon profilinin, protein yapışma kapasitesinin belirlenmesi ve morfolojik özelliklerinin incelenmesi

6.Hazırlanan vasküler greft örneğinin mekanik dayanım özelliklerinin belirlenmesi

7.Hazırlanan vasküler greftin HUVEC hücre hattı üzerine sitotoksisitelerinin belirlenmesi

8.Hazırlanan vasküler greftin hücre tutunma kapasitelerinin belirlenmesi
9.Hazırlanan vasküler greftin Antioksidan kapasitesi üzerine etkisinin incelenmesi

1.3 Hipotez

Sunulan tez çalışmasında, daha önceden literatürde örneği bulunmayan BS'nin çözücü sistemi optimize edilecek ve geleneksel doku mühendisliği çalışmalarının yanı sıra 3 boyutlu sistemlerde kullanılmak üzere biyomürekkep formülayonu oluşturulacaktır. Biyomürekkep STL formatında hazırlanan insan aort modeli baz alınarak 3 boyutlu basımı gerçekleştirilecek ve gerekli in vitro çalışmalar ile biyouyumlu yapısı gösterilecektir. Böylece, basımı gerçekleştirilen vasküler greftin ileride kardiyovasküler rahatsızlara umut olacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda formülasyonu optimize edilen BS temelli biyomürekkebin ileride farklı dokuların ve organlarında 3 boyutlu basımı için model olan bir çalışma özelliği taşıyacaktır.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Doku M□hendisliği

İnsanoğlu yaşamı boyunca kaza, hastalıklar veya travma sonucu oluşan hasarlı organların ya da dokuların onarımı üzerinde durmuştur. Bu organların/dokuların tedavisini de transplantasyon cerrahisi ile çözmeye çalışmıştır. Transplantasyon temel olarak 3 sınıfta incelenmektedir: ototransplantasyon, allotransplantasyon ve ksenotransplantasyondur.

Ototransplantasyon, aynı kişi içerisinde vücudun bir kısmının başka bir kısmına nakledilmesi anlamına gelir. Donör ve alıcı aynı kişi olduğundan, seçilen otogreftin kaynağı hastanın kendi vücudu dahi olsa ağrı, enfeksiyon, yara izi, kan kaybı gibi ciddi komplikasyon olasılığı yüksektir [3]. Ototransplantasyon bağışıklık sistemini tetiklemez ancak tipik örnekleri kemik ve deri gibi rejenere olabilen doku veya organların nakli ile sınırlıdır. Aynı zamanda ototransplantasyon, donör doku veya organları elde etmek için ikinci bir ameliyat da gerektirmektedir. Böylece hastada ekstra ağrıya sebebiyet vermekte ve cerrahi risk taşımaktadır. Allotransplantasyon ise aynı türün genetik olarak özdeş olmayan bireyleri arasındaki transplantasyon çeşididir. Günümüzde en sık hasar gören organlar böbrek, karaciğer, kalp ve akciğer başta olmak üzere hastalıklı/hasarlı organların nakli için geçerli olan transplantasyondur [4]. Ksenotransplantasyon ise iki farklı tür arasında yapılan transplantasyon sınıfıdır. Hayvan organlarının insan alıcılara nakli, verici kaynağının sınırlandırılmasının üstesinden gelmesinin yanı sıra bu strateji uzun süreli stabilite, nakil reddi, ksenojenik enfeksiyöz ajanların sokulması ve etik ikilemiyle ilgili sorunları da bünyesinde barındırmaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda genetik olarak değiştirilmiş hayvan donörlerinin geliştirilmesi ve ksenotransplantasyonun uygulamalarını genişletmek için yeni immünosüpresif yaklaşımlar üzerinde dikkate değer çabalar sarf edilmektedir [5].

Genelleyecek olursak transplantasyon; geleneksel olarak tamamen yapay eklemler, cansız işlenmiş doku (kalp kapakçıkları) veya başka bir bölgeden

hastaların kendilerinden ya da diğer hastalardan alınan nakiller (donörler) olarak gerçekleştirilmektedir. Ancak hastalardaki eksik dokuyu geri yüklemeyi amaç edinen bu prosedür, kusur veya yaralanma alanı için ek bir tedavi yapısı gerektirmektedir. Aynı zaman da nakledilen organın vücut tarafından kabul görmemesi, donör eksikliği ve her çeşit doku naklinin yapılamaması transplantasyon cerrahisinde karşımıza çıkan önemli sorunlar arasındadır. Bu sorunların önüne geçilmesi için son yıllarda yükselen doku mühendisliği çalışmaları ile hasarlı dokunun işlevlerinin geri kazanılması hedeflenmiştir [6].

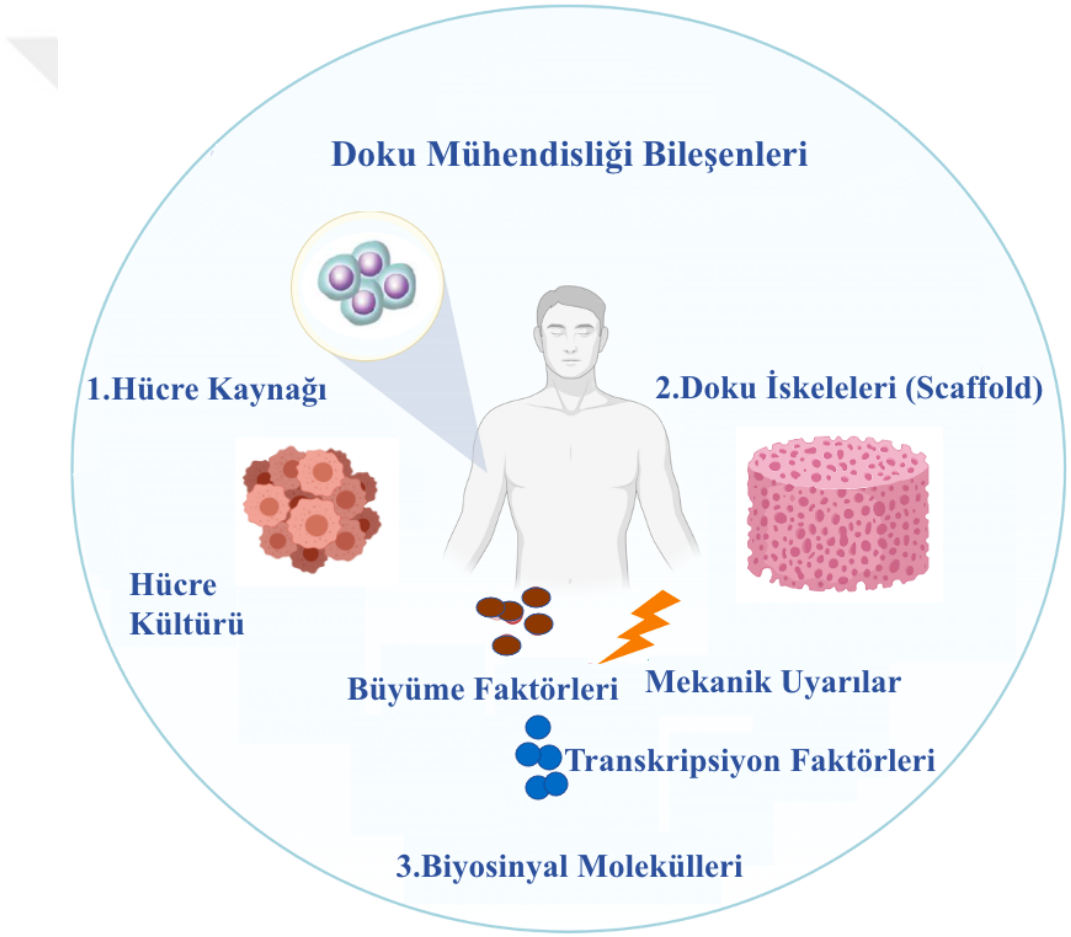
Doku mühendisliği, normal ve patolojik memeli dokularındaki yapı ilişkilerinin temel anlayışına dayanmaktadır. Ayrıca doku işlevini eski haline getiren, sürdüren veya geliştiren biyolojik unsurların geliştirilmesine yönelik mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerinin ve yöntemlerinin uygulanmasını içeren çok disiplinli bir alandır.

Doku mühendisliği çalışmaları 1975 yılına Chick ve arkadaşlarının diyabet hastalarında glikoz kontrolüne yardımcı olmak için yarı geçirgen zarlarda pankreatik adacık hücrelerinin kapsülleme çalışmalarıyla serüvenine başlamıştır. 1980'lerin başına gelindiğinde cildin kolajen jellerdeki hücrelerle veya rejenerasyona rehberlik etmek için kolajenin glikozaminoglikan (GAG) kompozitleriyle değiştirilmesi çalışılmıştır. Kullanılan bu teknikler hala günümüzde de klinik çalışmalarda kullanılmaktadır [7][8]. 1993 tarihinde ise Bisceglie'nin fare tümör hücrelerini bir polimer zara kapatıp onları domuz karın boşluğuna yerleştirdiği çalışmalar ile gelişimini devam ettirmiştir [9].

Doku mühendisliğinin temel amacı, organ nakli ve biyomateryal implantasyonuna dayanan geleneksel tedavilerin sınırlarını aşmaktır. Aynı zamanda hasta ile birlikte büyüyebilen immünolojik olarak toleranslı "yapay" organ ve doku unsurlarını üretme potansiyelini sergilemektir. Doku mühendisliği bu hasarlı organ veya dokuya ek tedavilere ihtiyaç duymadan kalıcı bir çözüm getirmektedir ve böylece uzun vadede uygun maliyetli bir tedavi yöntemi sunmaktadır [10].

Doku mühendisliği başlıca 3 temel bileşeni vardır. Bunlardan ilki; ilgili hücrelerin in vitro olarak gerekli üç boyutlu (3B) organ veya doku için büyütülmesini içerir. Ancak hücreler, tercih edilen 3B'lu yapılaşma yeteneğinden yoksundur ve böylece dokunun yalnızca anatomik şeklini tanımlarlar. Bunun yerine iki boyutlu (2B) bir

hücre katmanı oluşturmak için rastgele göç etme kabiliyetine sahiptirler. Uygun yapılaşma ise 3B'lu morfoloji sergileyebilen dokular için gereklidir. Bu 3B'lu morfoloji, hücrelerin bağlandığı ve kolonize olduğu iskeleler olarak bilinen, gözenekli matris tohumlanmasıyla elde edilen, doku mühendisliğinin ikinci çok önemli bileşeni olma özelliği gösteren yapı iskeleleri (scaffolds) ile sağlanır. Bu yapı iskelelerini de biyomalzeme sınıfında incelemek mümkündür. Son olarak da destek hücreleri ve büyümeyi uyaran sinyaller (büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler) tarafından sağlanan biyokimyasal ipuçlarından oluşmuştur [11]. Şekil 2.1 doku mühendisliği bileşenlerini kısaca özetlemektedir.



Şekil 2.1 Doku mühendisliği bileşenleri

İnsan vücudundaki hemen hemen her doku çeşidi doku mühendisliği açısından araştırılmış ve çoğu çalışma spesifik hücre türlerine odaklanmıştır. Klinik uygulamalar için hücreler genellikle hastalardan, yakın akrabalardan veya diğer bireylerden türetilmektedir. Örneğin diz tamiri için otolog kondrosit hücre nakli

klinik uygulamalarda kullanılırken, başka bir açıdan ise doku mühendisliği çalışmaları ile yapılandırılmış cilt dokusu yenidoğan dermal fibroblastları ile kültüre edilmiştir. Bununla birlikte farklı uygulamalar için hücrelerin temin edilmesinde ise bazı sıkıntılar karşımıza çıkmaktadır. Bu hücre kaynak sıkıntısını çözmek için olan yaklaşımlardan biri de insan kök hücrelerinin izolasyonu olabilir. Yani hücreler birden fazla nesil boyunca çoğaltılabilir ve uygun hücre tipine farklılaşmak için yapılandırılabilir [12]. Özellikle de son dönemde yapılan çalışmalar ile insan embriyonik blastosistlerinden türetilen kök hücrelerin bu özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [13]. Başta kıkırdak, kemik ve kas oluşumuna katılan kök hücreler üzerinde yapılan çalışmalar doku mühendisliği uygulamalarında cesaret verici sonuçlar göstermiştir. Tanımlanan progenitör hücrelerin, implantasyondan önce hücrelerin kültür koşullarını değiştirerek kıkırdak veya kemiğe dönüştüğü bildirilmiştir. Ek olarak karaciğerde olgun karaciğer hücrelerine veya kültürde safra kanallarına dönüşebilen küçük oval hücreler de yapılan çalışmalar ile elde edilmiştir[14].

Hücresel kaynak sorununa başka bir çözüm de "evrensel vericiler" olarak kullanılabilecek hücreler oluşturmak olabilir [15]. Bu yaklaşım ile normal olarak verici hücreleri "kendilik dışı" olarak tanımlayan hücre yüzeyindeki histo-uyumluluk proteinlerini maskeleyen moleküller kullanılır ve özellikle Parkinson hastalığı olan hastalara transplantasyon için domuz hücrelerini kabul edilebilir kılmak amacıyla araştırılmaktadır [16].

Diğer bir yandan; tipik bir doku mühendisliği grefti; bir iskele (scaffold), onun destek hücreleri ve büyümeyi uyaran sinyaller tarafından bağlantı sağlanan biyokimyasal ipuçlarından oluşur [11]. Doku mühendisliği iskelelerinin oluşturulması için gerekli özellikler Hutmacher ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir: (1) iskelenin, doku entegrasyonu ve vaskülarizasyonunu desteklemek için uygun ölçekte birbirini tamamlayabilecek gözenekli yapılaşmaya sahip olmalı (2) nihai de iskele dokusunun yerini alabilmesi için kontrollü biyobozunurluğa sahip malzemeden yapılması veya biyolojik olarak yeniden emilebilirlik (biyo-emilebilirlik) özellikleri göstermeli, (3) hücresel bağlanma, farklılaşma ve çoğalmayı destekleyecek uygun yüzey kimyasına sahip olmalı, (4) amaçlanan implantasyon çalışmaları için uygun mekanik özelliklere sahip olmalı,

(5) herhangi bir olumsuz yanıta neden olmamalı ve (6) kolayca çeşitli şekil ve boyutlarda üretilebilmelidir [17].

Greftin oluşmasını sağlayan iskele yapısı biyomateryal tabanlı olup doku mühendisliğinde temel bir rol oynar. Çünkü hücre bağlanması ve doku gelişimi için mekanik özellik ve yapısal desteklik sağlar. Aynı zamanda da hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşması için uygun ortam oluşturur ve sonunda da doku yenilenmesini teşvik eder [18][19].

2.2 Biyomalzemeler

Biyomalzemeler; mühendislik, tıp, temel biyoloji ve malzeme bilimini kapsayan, esas olarak II. Dünya Savaş'ından bu yana kadar uzanan çok yönlü bir alandır. Alanının bu denli genişliği nedeniyle de bir biyomalzemenin ne olduğu ve biyomalzemenin modern tıptaki rolü hakkında düşünceler geçmişten bugüne kadar bir kafa karışıklığı yaratmıştır. Bu karmaşıklığı sonuçlandırmak için bir biyomalzeme; vücudun herhangi bir dokusunu, organını veya fonksiyonunu değerlendirmek, tedavi etmek, fonksiyonunu arttırmak veya değiştirmek için biyolojik sistemlere müdahale edebilen materyaller olarak tanımlanmıştır [20].

Bu tanımlama doğrultusunda, biomalzeme bilimi de biyomalzemeler ve onların biyolojik çevre ile ilişkilerini inceleyen bilim dalı olarak bildirilmiştir [21]. Biyomalzeme bilimi; malzemelerin mekanik davranışları veya implantların yüzey modifikasyonu gibi materyal bilimi ile ilgili konuların yanı sıra immünoloji, toksikoloji ve yara iyileşme süreci gibi biyolojik konuları da kapsamaktadır. Bundan dolayı biyomalzeme biliminin hangi yönüne bakılırsa bakılsın biyomalzemenin 'biyo' kısmı göz ardı edilemeyecek derecede önem arz etmektedir. Bu doğrultuda biyomalzeme biliminin genel amacı insanlara implante edilecek materyallerin geliştirilmesi olduğundan en önemli kavramlardan biri olarak biyouyumluluk kavramı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu doğrultuda bir biyomalzemenin biyouyumluluk yeteneği; malzemenin belirli bir uygulamada uygun bir konak yanıtı ile performans gösterme yeteneği olarak tanımlanmıştır [20].

2.2.1 Tanım ve Tarihçe

Clemson Üniversitesi Biyomalzeme Danışma Kurulu tarafından; bir biyomateryal "canlı sistemlerin içine implantasyon ile veya bu sistemlere dahil edilmek üzere tasarlanmış sistemik ve farmakolojik olarak eylemsiz olan madde" olarak tanımlamıştır [22]. Başka bir açıdan ise bir biyomateryal "biyolojik sistemlerle etkileşime girmesi amaçlanan bir tıbbi cihazda kullanılan cansız bir malzeme" olarak belirtilmiştir [23]. Bunlara ek olarak; biyomalzeme "canlı organizmayı ve bileşenlerini olumsuz etkilemeden protez, tanı ve tedavi uygulamaları için kullanılması amaçlanan sentetik ve aynı zamanda doku, kan ve biyolojik sıvılarla temas edebilen doğal kaynaklı malzemeler" olarak belirtilmiştir [24]. Kısacası "biyomalzeme" teriminin tanımlanması farklılık göstermektedir ve geniş çapta kabul gören çalışma tanımları; "yaşayan bir yapının tamamını veya bir parçasını içeren, işlevini arttıran veya değiştiren doğal ya da insan yapımı herhangi bir malzeme" olarak belirtilebilir [25].

"Biyomalzeme" terimi özellikle de "biyolojik materyal" kelimesi ile karıştırılmamalıdır. Genel olarak biyolojik bir materyal, biyolojik bir sistem tarafından üretilen cilt veya arter gibi materyallere denmektedir.

Biyomalzemeler günümüzde neredeyse yeni bir alan olarak değerlendirilmesine karşın kökeni binlerce yıl öncesine kadar uzanmaktadır. En eski biyomalzeme uygulamalarından sayılan ve milattan sonra (M.S.) 200'lü yıllarda arkeologların yaptığı kazı çalışmaları ile metal diş implantları içeren insan kalıntıları ortaya çıkarılmıştır ve kıyafet/çamaşır ham maddesi olarak kullanılan ketenlerin Mısırlılar tarafından dikiş malzemesi olarak kullanıldığı anlaşılmıştır [26]. Daha sonraki yıllarda yapay dişleri komşu dişlere bağlamak için altın tellerin birbirine bağlandığı çalışmalar eski Fenike'de bulunmuştur. Benzer şekilde, M.S. 200'lü yıllarda Avrupa'da bulunan bir demir diş implantına sahip olan ceset, kemikle entegre edilmiş olarak bulunmuştur. Maya halkı ise yaklaşık M.S 600'lü yıllarda deniz kabuklarından sedef dişler üretmeyi başarmışlardı ve görünüşe göre şimdilerdeki kemik entegrasyonu olarak adlandırdığımız yapıyı oluşturmaya odaklanmışlardı. İlk örneklerini gördüğümüz bu çalışmaların arkasında malzeme bilimi, biyolojik anlayış ya da ilaç prosedürleri olmasa da uygulamalar iki noktayı

vurgulamaktadır: Tarih öncesi zamanlarda bile insandaki iyileştirme iç güdüsü ve implant ile fizyolojik/anatomik fonksiyon kaybını gidermektir [27].

1900'lerin başına gelindiği zaman ise kemik plakalarının uzun kemik kırılmalarına yardımcı olmak için kullanıldığı gözlemlenmiştir. Bu kemik plakaların birçoğu çok ince ve sofistike olmayan mekanik tasarımının sonucu olarak kırılma göstermiştir. Bu sorunun üstesinden gelinmesi için vanadyum çeliği gibi malzemeler, iyi mekanik özellikleri nedeniyle biyomateryal olarak seçilse de vücutta hızlı bir şekilde aşınma göstermiş ve vücudun iyileşme sürecinde olumsuz etkilere neden olmuştur. Daha sonraki yıllarda olumsuz etkilerin giderilmesi için daha iyi tasarımlar ve malzemeler kullanılmaya başlanmıştır. 1930'lu yıllarda paslanmaz çelikler ve kobalt krom alaşımlarının kullanılması ile kırık fiksasyonunda daha ileri gelişimler gösterilmiştir ve ilk eklem replasman ameliyatları gerçekleştirilmiştir [28].

Bunun yanında asıl biyomalzeme alanının bilimsel anlamda gelişimi II. Dünya Savaşı'ndan sonra kendini göstermiştir. Başlangıçta savaşta kullanılmak üzere tasarlanmış sentetik malzemelerin yaygın olarak kullanılması ile varlığını sergilemiştir [21]. Örneğin; 1940 yılında ilk plastik malzemenin (sentetik polimerler) insana implantasyonu gerçekleşmiştir. Bu ilk çalışmalar daha önce uçaklar için malzeme olarak kullanılan poli (metil metakrilat) ve bir paraşüt malzemesi olan naylon ile gerçekleştirilmiştir. Polimer sınıfının sonraki çalışmalarında ise materyallerin ve cerrahi teknikteki ilerlemelerle 1950'lerde kan damarı, 1960'larda kalp kapağı ve semente eklem replasmanları kullanılması başlanmıştır [29][30]. Ancak biyomalzeme alanı bu malzemeler ile sınırlı kalmamış çok çeşitli malzeme türlerini kapsayacak şekilde hızla ilerlemiştir. Özellikle de II. Dünya Savaşı'ndan yirmi yıl sonra, metalik biyomalzemeler kullanılarak ilk başarılı yapay kalça, doğal bir polimer türevi olan selüloz kullanarak böbrek diyaliz makineleri ve başka bir diğer doğal türetilmiş polimer olan ipek ile vasküler greftlerin gelişimi görülmüştür [26]

2.3 Biyomalzemelerin □zellikleri

Doku mühendisliği, disiplinler arası ve çok disiplinli bir alandır. Nakil ve rekonstrüktif cerrahisinde alternatif doku ve organlar sunması yönüyle büyük umut vadetmektedir. Bu bağlamda üç boyutlu doku oluşumunu destekleyen geçici

yapay hücre dışı matris iskelelerin (scaffolds) tasarımı da doku mühendisliği için kritik öneme sahiptir. Bu iskele yapıları da vücutta herhangi bir toksisiteye sebebiyet vermemeli, hücre adezyonunu, proliferasyonunu ve farklanmasını destekleyebilmeli yani biyouyumlu bir yapı sergilemeli ve uygun mekanik mukavemete sahip olmadır.

2.3.1 Toksik Olmama

Tasarlanmış bir biyomalzeme; diğer bedensel organları etkilemeden, canlı vücut ortamında amacına uygun hizmet etmelidir. Bunun için bir biyomalzeme toksik olmamalıdır. Biyomateryaller için toksisite terimi biyomalzemelerden göç eden maddelerle ilgilidir. Genel olarak, toksik olmama; kanserojen olmayan, pirojenik olmayan, alerjik olmayan, vücut içi sıvısı ile uyumlu ve biyolojik materyalin enflamatuar etkisinin olmadığını belirtir. Bazı durumlarda biyomalzeme toksik kabul edilen gerekli miktarda kütleyi serbest bırakmak için tasarlanmıştır. Tasarlanan biyomalzemelerin bu toksisitesi bir avantaj sağlar. Örneğin, kanser hücrelerini hedef alan ve onları yok eden bir “akıllı bomba” ilaç dağıtım sistemi verilebilir [31].

2.3.2 Biyomalzemelerin Biyouyumluluğu

Bir biyomateryali diğer materyallerden ayıran en önemli faktör insan vücudunun dokularıyla temas halinde var olma yeteneğidir. Biyomalzeme çalışmalarının başlıca ilgi odaklarından biri olan bu vücuda karşı gösterdiği biyolojik cevap ayrıca biyouyumluluk olarak adlandırılmaktadır. Biyouyumluluk bir biyomalzemenin, protezin veya tıbbi cihazın belirli bir uygulama sırasında uygun bir konakçı yanıtı oluşturma kabiliyeti olarak tanımlanır. Ayrıca biyouyumluluk terimi; biyomalzemenin vücudun mekanik davranışına, dokularındaki fiziksel, kimyasal ve biyolojik uyumuna karşı sağladığı optimum uyum olarak da tanımlanabilir [32]. Özellikle de implantasyon sonrası vücutta bir enflamatuvar tepki görülmektedir. Klinik olarak enflasmasyon; implant yapılmış olan bölge etrafında oluşan kızarıklıklar, şişmeler, yanmalar ve acı ile karakterize edilir. Ancak vücutta oluşan bu tepkiler genellikle geçicidir ve bir dizi yolla çözülebilmektedir. Örneğin; malzemenin çevre dokuya tam entegrasyonun sağlanması veya implantın lifli kapsülleme ile izolasyonun gerçekleştirmesi verilebilir. Aynı zaman da implant

yapılan bölgeye ve malzemenin doğasına bağlı olarak, canlı dokuya implante edildiğinde doku tepkilerine maruz kalır. Bunlar bağışıklık sisteminin aktivasyonu, lokalize pıhtılaşma oluşumu, enfeksiyon, tümör oluşumu veya implantın kireçlenmesi gibi cevapları da bünyesinde barındırır. Bundan dolayı spesifik uygulamalar için implantın şekli, malzemenin degredasyon ve mekanik özellikleri bir malzemenin biyouyumluluğunun sürdürebilirliği için etraflıca incelenmektedir. En temel seviyede biyouyumluluk; bir malzemenin protein ve hücresel cevaplarına bağlı olarak belirlenir ve malzemenin biyouyumluluk testleri protein ve hücresel düzeyde hem in vitro hem de in vivo olarak gerçekleştirebilir [20]. Bu nedenle biyomalzemeler vücut implatasyonu sonrasında toksik olmaması, immünojenik olmaması, trombojenik etkiye neden olmaması, kanserojen olmaması ve tahriş edici olmaması gibi özellikleri sergilediğinde biyouyumlu olarak kabul edilmektedir [33].

2.3.3 V□cut Tepkisine Karşı Yoksunluk

Canlı bir biyolojik sistemde yabancı bir cismin varlığından dolayı oluşan reaksiyon dizisine “yabancı cisim reaksiyonu” denir. Bu reaksiyon dahil olan anatomik bölgeye bağlı olarak yoğunluk ve süre bakımından farklılık göstermektedir. Pratik olarak bir tıbbi cihaz amaçlandığı gibi çalışmalı ve hastaya veya kullanıcıya önemli bir zarar vermemelidir. Bununla birlikte, kendiliğinden gelişen vücut materyali (biyolojik materyal) dışında herhangi bir materyal yabancı bir materyal olduğu için yabancı cisim reaksiyonu geliştirme şansı olacaktır. Bu nedenle, biyomateryal sıfır yabancı cisim reaksiyonu göstermelidir [34].

2.3.4 Biyomalzemelerin Mekanik □zellikleri

Biyomalzemenin en önemli gereksinimi, fiziksel özelliklerinin implante edileceği yaşam sisteminde istenen organ/doku ile eşleştirilmesidir. Biyomalzemeler ve cihazlar mutlaka değiştirilen organ/dokununkine eşdeğer uygun mekanik performans gereksinimlerine sahip olmalıdır. Bu nedenle malzemeler kullanılacakları doku özelliklerine göre tasarlanır [31]. Örneğin: kemikteki gibi sert morfolojide kullanılmak üzere tasarlanmış biyomalzemeler daha kararlı ve sert yapılaşma sergilemesi gerekirken esnek dokularda kullanılmak üzere tasarlanan biyomalzemeler yumuşak formda tasarlanmadır [35]. Bir

biyomalzemenin mekanik özellikleri ayrıca iskele yapısının nano morfolojisi ve gözenek boyutu gibi yapısal özelliklerine de bağlıdır. Hücre yapışması, büyümesi ve farklılaşması gibi hücresel yapıların biyolojik performansı da gözenek boyutuna bağlıdır. Bu nedenle, implantların ve doku mühendisliği iskelelerinin optimum tasarımı için kullanılabilecek farklı biyomalzemelerin mekanik davranışını anlamak bizlere malzemenin biyolojik performansı hakkında bilgi verir [36].

2.3.5 Biyomalzemelerin Tasarım □zellikleri

Biyomalzemeler bir hastalığı veya yaralanmayı tedavi etmek için çeşitli cihazlar ve implantlar tasarlasa da tüm biyomateryallerin tasarımında yer alan temel hususlar aşağıda belirtilen maddeler ile özetlenebilmektedir;

•Bir biyomalzemenin tasarım için seçildiği uygun bir spesifikasyon,

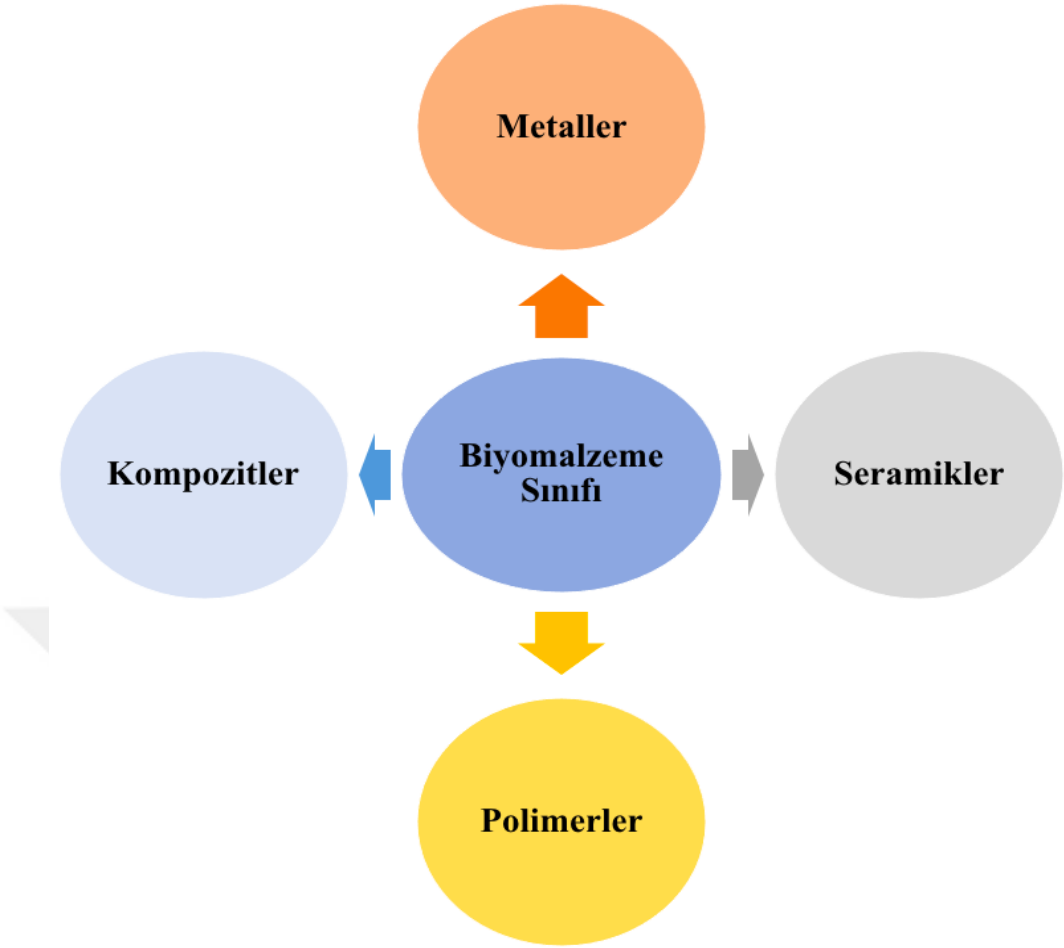
•Biyomalzemenin çalışmasını istediği ortamın doğru karakterizasyonu ve çevrenin biyomateryalin özellikleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi,

•Malzemenin çalışması için gereken sürenin tanımlanması ve tasarlanması,

•Biyomalzemenin kullanım öncesi güvenlik endişeleri konusunda net bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir [31].

2.4 Biyomalzeme □eşitleri

Biyomalzemelerin spesifik uygulamaları için en temel basamak doğru malzeme çeşidinin seçilmesidir. Genel olarak malzemeler ikiye ayrılır; bünyesinde karbon barındırıyorsa organik eğer barındırmıyor ise inorganik olarak adlandırılırlar. Biyomalzemeler ise Şekil 2.2'de gösterildiği gibi dört ana başlık altında kategorize edilmektedir; metaller, seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler.



Şekil 2.2 Biyomalzeme çeşitleri

2.4.1 Metaller

Metaller özellikle implant materyalleri olarak uzun süredir tıp alanında büyük bir klinik önem arz etmektedir. Tıbbi gereksinimler için kullanılan metal ve metal alaşımlarının çoğu, paslanmaz çelik (316L), titanyum ve alaşımları (Cp-Ti, Ti6Al4V), kobalt krom alaşımları (Co, Cr), alüminyum alaşımları, zirkonyum niyobyumu ve ağır tungsten alaşımları olarak karşımıza çıkar. Biyomalzeme alanındaki hızlı büyüme ve gelişme, diş implantları, kraniyofasiyal plakalar ve vidalar gibi metalden yapılmış birçok tıbbi ürünün geliştirilmesi için bir alan yaratmıştır. Bunlara ek olarak yapay kalpler, kalp pilleri, klipsler, valfler, tıbbi cihazlar ve ekipmanlar ve kemik fiksasyon cihazları, dental materyaller, tıbbi radyasyon koruyucu ürünler, biyomedikal uygulamalar için protez ve ortodontik cihazlar metal ve metal alaşımların genel kullanım alanı olarak hayatımızda yer almaktadır [37]. Metal malzemeler genellikle gerekli biyomateryali tasarlamak

için mühendisler tarafından tercih edilmektedir. Biyomedikal uygulamalar için metal bazlı malzemelerin seçilmesinin ana kriterleri ise metallerin uygun mekanik davranış sergileyebilmeleri, korozyon direnci göstermeleri ve üretiminin düşük maliyetli oluşudur [38].

Biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere seçilmiş metal cinsi, implantın ve biyolojik ortamın işlevine bağlıdır. Örneğin 316L tipi paslanmaz çelik (316L SS), başta kardiyovasküler çalışmalardan otorinolojiye kadar tüm implant çeşitlerinde kullanılan alaşımdır. Ayrıca paslanmaz çelikler, kolbat (Co) alaşımları ve titanyum (Ti) ve alaşımları esas olarak metalik biyomalzemelerin imalatında kullanılmaktadır. Ti alaşımları en iyi biyo-uyumluluğa sahip metal bileşen olduğundan, Ti sistemli biyomalzemelerinin araştırılması ve geliştirilmesi için metalik biyomalzemeler alanında iyi bir şekilde takip edilmektedir [39]. Metallerin yüksek gerilme mukavemeti ve yorulma sınırı özellikleri, seramiklere ve polimerik malzemelere kıyasla iyi mekanik yükler taşıyabilen implantların tasarlanmasına izin verir. Bununla birlikte, seramiklere kıyasla, metaller daha düşük mukavemete ve başarısızlığa karşı daha yüksek gerilmelere sahip elastik modülüne sahiptir. Biyolojik ortam da ise metal bazlı biyomateryal implante edildiğinde; malzemenin yüzey alanı değişebilir ve bazı yan ürünleri serbest bırakmak için bozunma gösterebilir. Bu durumda metalik implant yüzeyi ile hücre veya dokular arasında etkileşimler meydana gelir. Bu durum günümüz araştırmacılarını biyolojik olarak daha uyumlu malzemeler geliştirmek için metalik ürünlerin yüzey özelliklerini anlamlandırmaya teşvik etmiştir [37].

2.4.2 Seramikler

Seramikler biyomalzemelerin tasarımında kullanılan başka bir malzeme sınıfıdır. Seramiklerin kullanımı, vücuttaki etkisizlikleri, çeşitli şekil ve gözeneklere tahlil şekillendirelebilirlikleri, yüksek basınç mukavemeti ve mükemmel aşınmama özellikleri ile biyomalzeme çalışmalarında bilim insanlarını teşvik edici niteliktedir. Seramikler ayrıca metalik implantların biyouyumluluğunu artırmak için kas-iskelet sisteminde, kalça protezlerinde, kemik greftlerinde, diş ve ortopedik implantlarında, orbital ve orta kulak implantlarında, kalp kapakçıkları ve kaplamaların bir parçası olarak kullanılmaktadır. Seramik bazlı biyomalzemelerin uygulamaları kırılganlık ve zayıf gerilme mukavemeti sahip

olması nedeniyle metallerden veya polimerlerden daha az tercih edilmiştir. Bununla birlikte, fosfatların biyoseramikleri ise yüksek biyouyumluluk ve kemik entegrasyonuna sahip olması nedeniyle ideal biyomalzemelerin üretiminde ve kemiklerin mineral bileşenine en çok benzeyen malzemeler olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [40]. Kalsiyum fosfat bazlı biyomateryaller, iskeletin tüm alanlarını kaplayan, vücut boyunca bir dizi farklı uygulamada kullanılmaktadır. Uygulamalarının başında diş implantları, transdermik cihazlar, kemik defektlerinin tedavisi, kırık tedavisi, total eklem replasmanı, ortopedi, kraniomaksillofasiyal rekonstrüksiyon, kulak/burun/boğaz ve omurga cerrahisini kapsamaktadır. Bu kullanım alanlarına ek olarak hidroksiapitit kemik defektleri için dolgu maddesi ve burun septal kemiği, orta kulak gibi yüksüz anatomik bölgelerde implant olarak uygulama alanlarını da içermektedir [41]. Ayrıca biyo-göz hidroksiapatit orbital implantlarını ve hidroksiapatit blok seramiklerini geliştirmek için kullanılır [42]. Hidroksiapatit, paslanmaz çelikler, titanyum ve onun alaşımlarından oluşan implantlar, metalik ortopedik ve dental implantlar için kemikte fiksasyonu arttırmak için bir kaplama malzemesi olarak kullanılmıştır. Bu durumda, çevre kemiğe giden temel metal yüzeyler hidroksiapatite güçlü bir şekilde bağlanabilmektedir. Ancak, de-aminasyondan kaçınmak için özen gösterilmelidir. Çünkü seramik tabakanın metal yüzeyden ayrılması ciddi sorunlara neden olabilir ve implant başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir [43].

2.4.3 Kompozit Malzemeler

Kompozit malzemeler; farklı fiziksel özelliklere sahip iki veya daha fazla fiziksel ve/veya kimyasal olarak farklı, düzgün bir şekilde düzenlenmiş veya dağıtılmış biçimde bileşebilen malzemeleri içeren bir mühendislik malzemesi sınıfıdır. Kompozitler, matris adı verilen sürekli bir yığın faza ve genellikle matristen daha üstün özelliklere sahip olan takviye adı verilen bir veya daha fazla süreksiz dağılmış faza sahiptir. Bu fazlardan ayrı olarak, ara faz olarak adlandırılan üçüncü bir aşamayı da bünyesinde barındırabilir. Tek formda oluşmuş malzemelerden daha güçlü bir yapı sergileyen kompozitler dokularda oluşan zor problemlerin onarılmasında büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda son yıllardaki bilimsel araştırmalar ile özellikle de yük taşıyan doku bileşenleri için yeni alternatif

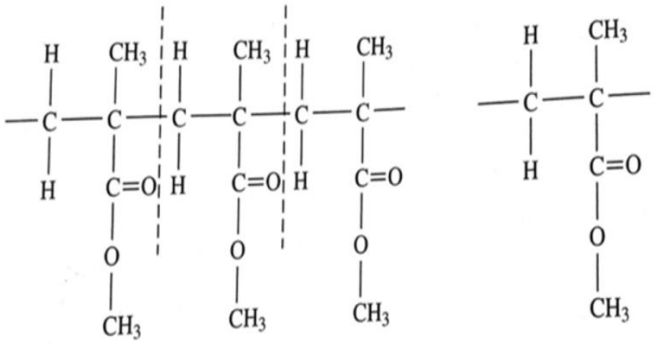
çözümler olduğu düşünülen çeşitli biyomedikal kompozit malzemeler geliştirilmesine odaklanılmıştır [44].

Kompozit yapı iskeleleri potansiyel olarak biyoglas parçacıklarının ve süngerimsi kemiğe yakın mekanik özelliklere sahip biyolojik olarak bozunabilir polimerlerin kombinasyonlarından oluşturulmuş gözenekli yapılar sergilerler. Ayrıca, lif takviyeli kompozit malzemelerin kullanılması ile kemik kırığı onarımı, diz, kafatası rekonstrüksiyonu, diş, kalça ve diğer eklem replasman uygulamaları gibi sert doku uygulamaları da literatürde oldukça yaygındır [45].

Metallerin veya seramik malzemelerin düşük biyolojik uyumluluk kabiliyetleri, metaller biyomalzemelerin korozyona sebebiyet vermeleri ve seramik malzemelerin düşük kırılma mukavemeti gibi dezavantajlara sahip olmaları kompozit biyomalzemelerin ana tercih edilme sebebini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda kompozitler homojen malzemelerin (metaller veya seramikler) istenmeyen birçok özelliğini geliştirmek için alternatif bir yol sağlar.

2.4.4 Polimerler

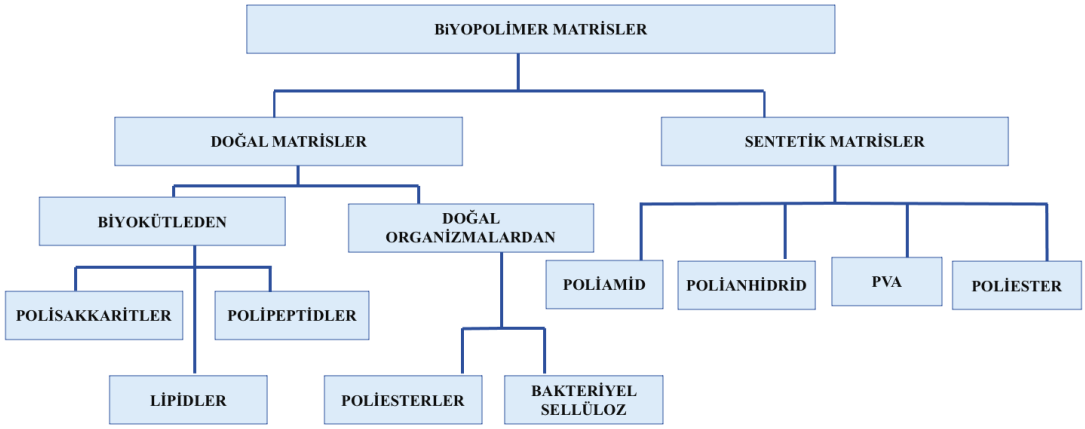
Diğer malzemelerin aksine polimerler organik yapılı malzemelerdir ve monomer adı verilen birim moleküllerin kovalent bağlarla bir araya gelmesiyle çok sayıda küçük birimden oluşan büyük moleküllere polimer denir (Şekil 2.3). Biyomedikal uygulamalar için uygun bir malzeme olan polimerler çeşitli yumuşak dokuların değiştirilmesi ve geliştirilmesi için kardiyovasküler elemanlar olarak kullanılır. İmplant olarak tercih edilen çok sayıda polimerik malzemeler de vardır. Güncel uygulamaları incelendiğinde başta kalp kapakçıkları, yapay kalpler, vasküler greftlerin yanı sıra göğüs protezleri, diş materyalleri, kontakt ve göz içi lensleri, ekstrakorporeal oksijenatörlerin fikstürleri, diyaliz ve plazmaferez sistemleri, tıbbi ürünler için kaplama malzemeleri, cerrahi malzemeler, doku yapıştırıcıları, vb. örnekleri de mevcuttur [46][47][48].



Şekil 2.3 Polimer yapısı

Polimerik biyomalzemelerin kullanımı diğer malzeme çeşitlerine göre; imalat kolaylığı sağlaması, işlenebilirlik kolaylığı, uygun mekanik ve fiziksel davranış sergileyebilme ve ucuz maliyetli oluşu ile daha avantajlıdır. Genellikle polimer sınıfı biyomalzemeler Tablo 2.4'te özetlendiği gibi iki sınıfta incelenir: doğal ve sentetik polimerik biyomalzemeler.

Tablo 2.1 Polimer Matrislerin Sınıflandırılması



Sentetik polimerik sistemlere; akrilikler, poliamidler, poliesterler, polietilen, polisiloksanlar ve poliüretan ve benzeri örnekleri verilebilir. Kolay işlenebilir olan bu sentetik polimer sınıfı üyeleri insan vücuduna enflamatuar etkileri sorunuyla karşımıza çıkmaktır. Bu sorunun da doğal polimerlerin kullanılmasıyla aşılabileceği anlaşılmıştır. Örneğin kitosan, karagenan ve aljinat gibi doğal polimerler sınıfı üyeleri doku rejenerasyonu ve ilaç salınım sistemleri gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır [49].

Doğal polimer sınıfı için de kollajen, elastin, fibrin, GAG, hyaluronik asit insan vücudunun içinde üretilebilen polimer sınıfında yer alırken aljinat ve kitosan da insan vücudunun dışında bulunan polimer çeşitleridir. Toplam protein kütlesinin %25-35'ini oluşturan kollajen insan vücudunda en çok bulunan polimer sınıfıdır [50]. Kolajen süper familyasında 28 kolajen izoformu tanımlanmıştır ve ortak bir üçlü sarmal bölge tüm üyeleri için ortaktır [51]. Her bir kolajen izoformu moleküler ve süper moleküler organizasyonu dikkate alındığında kolajen olmayan makromoleküllerle bir araya gelerek karmaşık bir fonksiyonel üst yapıyı oluşturmaktadır. Bu şekilde, kolajenler, hücre dışı matrisin moleküler mimarisini ve mekanik özelliklerini oluşturur ve vücuttaki mukavemet, esneklik ve hemostatisin korunmasını sağlamaktadır [52].

Elastin ise hücre dışı matrisin elastik özelliklerinden sorumlu bir makromoleküldür. Fibroblastlar, endotelyal, kondrositler, keratinositler ve düz kas hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücreler tarafından 60-70 kDa'lık bir öncü protein monomeri olarak üretilir ve salgılanır. Ayrıca tropoelastin olarak da adlandırılmaktadır [53]. Elastin'e ek olarak, fibrillin de elastik liflerin bir başka önemli bileşenidir. Fibrillin ailesinde dört izoformu bulunmaktadır [54]. Bunlar; fibrillin-1, fibrillin-2, fibrillin-3 ve fibrillin-4'dir ve sekiz sisteyin bölgesi arasında tekrarlanan kalsiyum bağlayıcı epidermal büyüme faktörü benzeri alanlar içermektedir [55]. Bu dört izoform arasında, molekül ağırlığı ~350 kDa olan fibroblast hücreleri tarafından salgılanan ve bir glikoprotein olan fibrillin-1 insan vücudunda en fazla miktarda bulunanıdır. Fibrillin-1 ayrıca elastik liflerin oluşumunda önemli roller oynamaktadır [55].

GAG'ler ise vücutta diğer en bol bulunan biyopolimer sınıfıdır. GAG'ler heteropoliakaritdir ve hücre dışı matristeki önemli bir biyomolekül sınıfının elamanıdır. GAG'ler, oldukça negatif yüklü lineer polisakkaritlerdir ve bir amino şekerin (N-asetil-D-glukosamin veya N-asetil-D-galaktosamin) ve bir uronik asitten (D-glukuronik veya L-iduronik asit) oluşan disakkarit birimleridir. Çekirdek disakkarit yapılarına göre, glikozaminoglikanlar heparin, heparin sülfat, kondroitin sülfat, dermatan sülfat, keratin sülfat, hiyalüronik asit ve dermatan sülfatlar olarak sınıflandırılabilir [56].

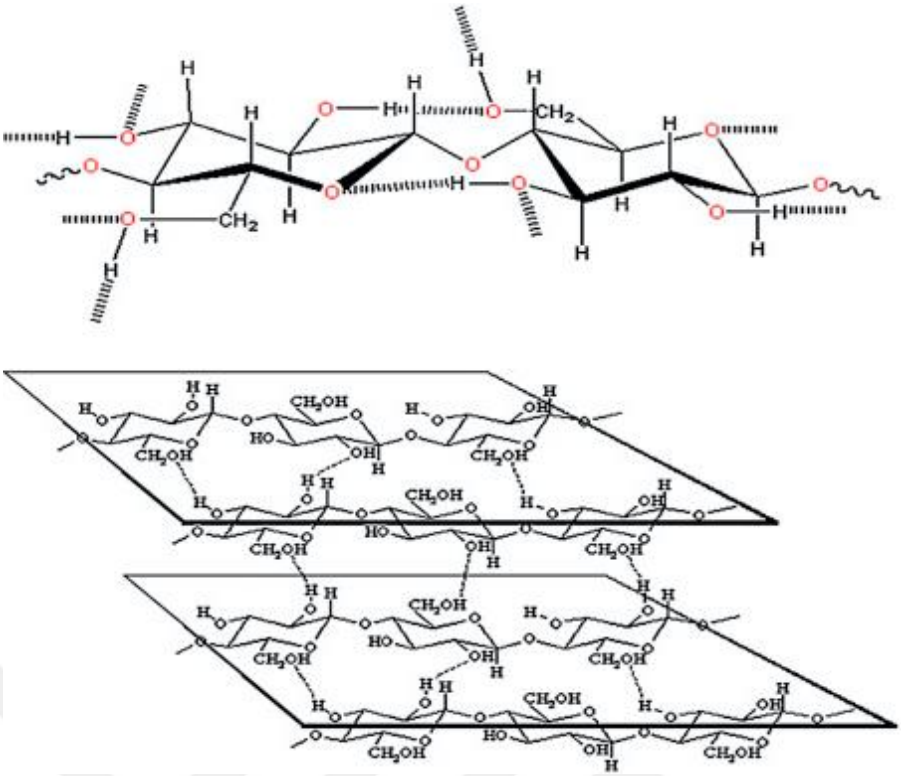
Son yıllarda yapılan çalışmalar ile kitosanın; emilim arttırıcı, kontrollü salınım ve biyo-yapışkan özellikleri üzerine odaklanılmıştır. Biyopolimer sınıfının doğal kaynaktan sentezlenen bu polimerin hem biyolojik olarak uyumlu hem de biyolojik olarak parçalanabilir olduğu gösterilmiştir. Kitosan, (1-4) bağlı 2-asetamido-2-deoksi-p-D-glukopiranoz ve 2-amino-2-deoksi-p-D-glikopiranozun doğrusal bir kopolimeridir [57]. Kitosan doğada yaygın olarak bulunan bir polisakkarit olan kitinin deasetilasyonuyla kolayca elde edilebilmektedir (örn. kabuklular, böcekler ve bazı mantarlardan). Kitinin sulu çözeltiler içindeki sınırlı çözünürlüğü nedeniyle, kitosan endüstriyel uygulamalar için uygun bir malzeme olarak görülmektedir [58].

Doğal biyomalzemelerin varlığı yalnızca vücut içinde doğrudan üretim ile ya da doğadaki kaynaklar ile sınırlı değildir. Aynı zamanlarda mikroorganizma kaynaklı biyomalzemeler de vardır. Bunların en önemli örneklerinden biri selüloz üreten bakterilerdir.

2.5 Bakteriyel Sel□loz

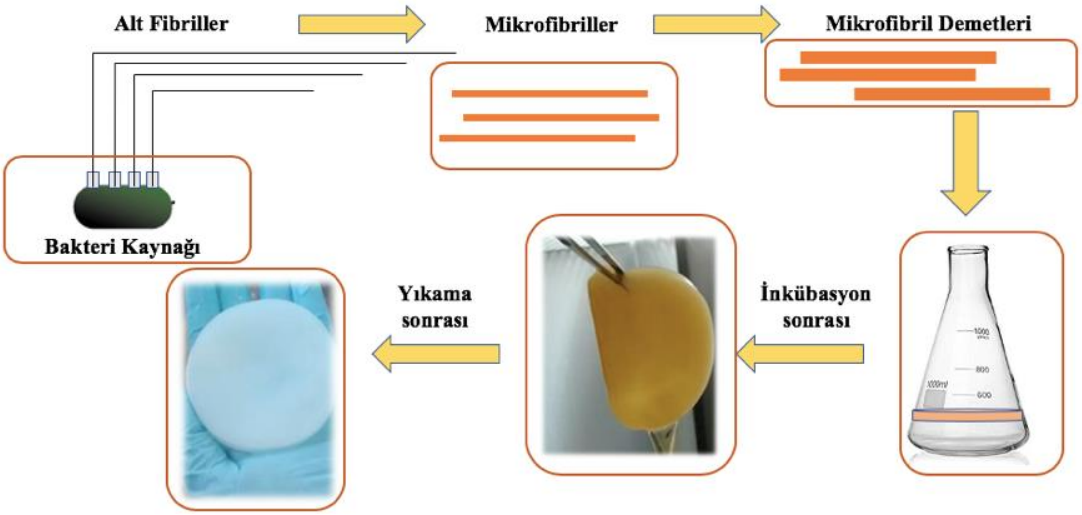
Biyomalzemeler ve bunların tıbbi uygulamalarındaki son gelişmeler, birçok tıbbi malzeme sınıflarının geliştirilmesinde doğal kaynaklı biyomalzemelerin öneminin ve potansiyelinin arttığını göstermektedir. Yaygın olarak; hiyalüronik asit, dekstran, aljinat ve skleroglukan araştırılmıştır. Ancak son dönemlerde, BS; biyoteknolojinin yüksek değerli bir ürünü olma potansiyeli kazanmıştır [59]. BS; *Gluconacetobacter, Acetobacter, Agrobacterium, Achromobacter, Aerobacter, Sarcina, Azobacter, Rhizobium, Pseudomonas,* Salmonella ve *Alcaligenes*'in bakteriyel kültürleri tarafından üretilmesine karşın bunlar arasında en verimli BS üreticisi *Gluconacetobacter* cinsine aittir [60].

Acetobacter xylinum (A.xylinum), mikrofibriler demetlerinin büküm şeritleri olarak düzenlenmiş büyük miktarda yüksek kaliteli selüloz sentezleme yeteneğine sahip basit bir Gram-negatif bakteridir. Biyosentez işlemi sırasında, beslenme ortamının çeşitli karbon bileşikleri bakteriler tarafından kullanılır. Daha sonra tekli, lineer *ß*-1,4-glukan zincirleri halinde polimerize edilir [61]. Son olarak, dışlarında bulunan doğrusal bir gözenek yoluyla hücrelerin dışında salgılanması gerçekleşir. Şekil 2.5'te BS'nin yapısal formu gösterilmiştir.



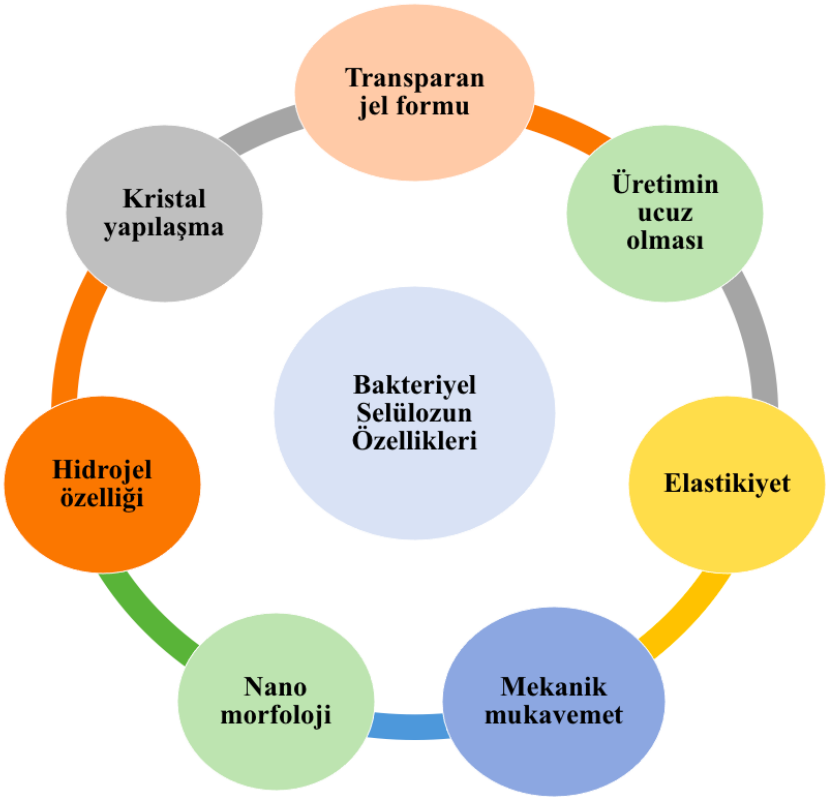
Şekil 2.4 Bakteriyel selülozun yapısal formu

Başlangıçta, alt fibriler yapı yeni doğan β-1,4-glukan zincirinden oluşur, daha sonra mikrofibriller ve son olarak yaklaşık 1000 ayrı glukan zincirinden oluşan gevşekçe sarılmış bir şeritten oluşan mikrofibril demetleri oluştururlar. Tüm bu biyosentez işlemleri bir statik kültür koşullarında gerçekleşir ve sonucunda da kalın, jelatinimsi bir membran elde edilir. Tek eksenli olarak yönlendirilmiş bu ultra ince selüloz membranı 3B'lu bir yapı sergilemekte ve boyutlatı 3-8 nm arasında değişen bir nano boyutlu morfoloji göstermektedir [62]. Şekil 2.6 ile BS'un biyosentezi şematize edilmiştir.



Şekil 2.5 Bakteriyel selülozun biyosentezi

BS'un yapısı bitki selülozundan farklı olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. BS fibrillerinin boyutunun, bitki selülozundan yaklaşık 100 kat daha küçük olması bu farkı ortaya koymaktadır. Bu eşsiz nano-morfoloji, büyük miktarda su tutabilme (kuru kütlesinin 200 katına kadar) kabiliyeti sağlamasının yanı sıra geniş bir yüzey alanı da sağlamaktadır. Aynı zamanda büyük elastikiyet, yüksek su tutma mukavemeti ve uygunluk gösterir [59]. BS'nin genel özellikleri Şekil 2.7'te özetlenmiştir.



Şekil 2.6 Bakteriyel selülozun sahip olduğu özellikler

Nano BS fibril boyutu, bir yara iyileşme sistemi olarak dikkat çekici bir performans da sağlamaktadır. Modern yara bakım pansuman malzemesinin özellikleri; toksik olmayan, pirojenik olmayan, biyouyumlu, enfeksiyona karşı bariyer sağlayabilen, sıvı kaybını kontrol edebilen, tedavi sırasında ağrıyı azaltabilen, yarada nemli bir ortam oluşturabilen, ilaçların yaraya sokulmasını veya yaraya verilmesini sağlayan, inflamatuar faz sırasında eksüdaları emebilen, yüksek mekanik mukavemet, elastikiyet ve uygunluk gösterebilen, isteğe bağlı bir şekil ve yüzey alanı sağlayabilen malzeme olarak belirtilmiştir [63][64]. Yara iyileştirme sistemleri genellikle yara örtüsü için kullanılan malzemelerin, yara enfeksiyonuna ve sıvı kaybına karşı bir bariyer oluşturarak epidermal rejenerasyon için en uygun ortamı yaratmasını gerektirir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar ile BS yapılı yara örtülerinin yara iyileşmelerinde gerekli olan bu özellikleri bünyesinde barındırdığı gösterilmiştir. Ayrıca yara iyileşme sürecinde klinik gözlemin önemi bildirilmiştir. BS'nin şeffaf morfolojik özelliği bu sürecin gözlemlenmesinde iyi bir özellik sunmaktadır. Genel olarak, çalışmalar BS membranlarının nekrotik enkaz giderme (otolitik debridman) sürecini önemli ölçüde kolaylaştırdığını, granülasyon doku

gelişimini geliştirdiğini ve tüm kontrol grubu ile karşılaştırıldığında geri epitelizasyon sürecini hızlandırdığını göstermiştir [65]. Ayrıca BS bazlı membranlar antibiyotiklerin veya diğer ilaçların yaraya potansiyel transferine izin verir, aynı zamanda herhangi bir dış enfeksiyona karşı etkili bir fiziksel bariyer görevi sağlar. Bir jelatinimsi membran formunda üretilen selüloz, fermantasyon tekniğine ve kullanılan koşullara bağlı olarak sentezi sırasında herhangi bir şekle ve boyuta kalıplanabilir. Bitki kaynaklı selülozların aksine, BS tamamen lignin ve hemiselülozdan yoksundur. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı olan selüloz membranlar güçlü bazlarla etkileşime girebilir ve bu sayede pirojenik olmayan, toksik olmayan ve tamamen biyo-uyumlu bir biyomateryal elde etmeyi mümkün kılmaktadır [64].

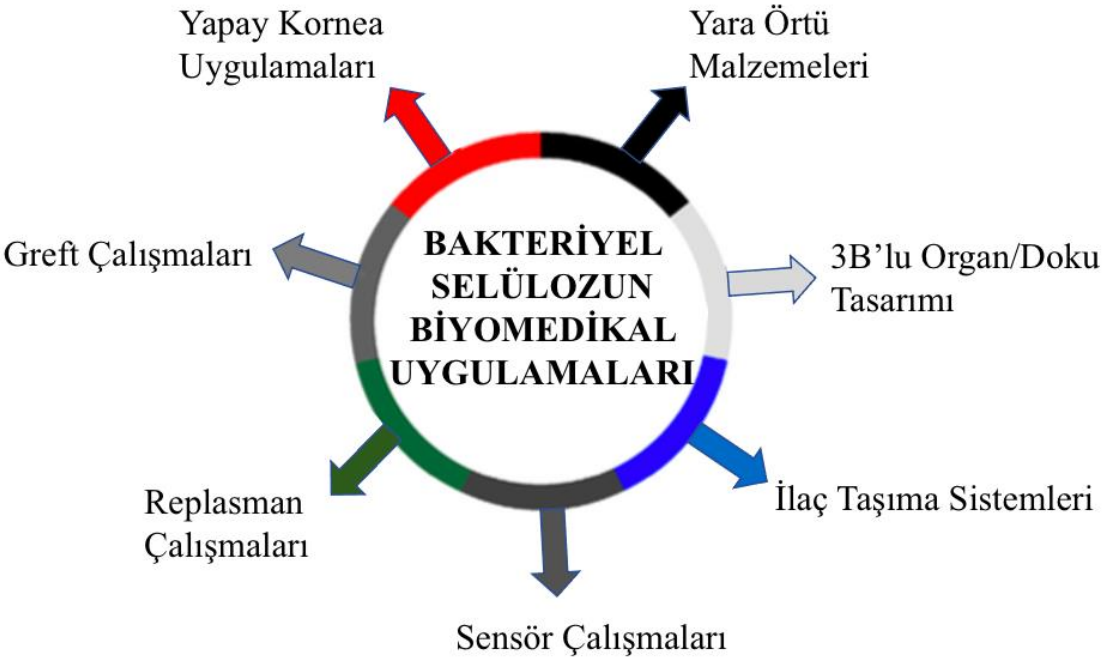
BS'nin bu eşsiz biyouyumlu yapısı üretim teknolojisinde kritik bir rol almasını sağlamıştır. Brezilyalı bir şirket olan 'BioFill Produtos Bioetecnologicos' (Curitiba, PR Brezilya), selüloz biyopolimerinin benzersiz özelliklerini bağımsız olarak araştırmıştır ve *Acetobacter* tarafından üretilen BS'ye dayanan yeni bir yara iyileşme sistemi oluşturmayı başarmışlardır [66][67]. Ürün yelpazesi şunları içermektedir: Biyofiller, Biyoprosesler (yanıkların tedavisinde, geçici suni deri olarak ve ülser tedavileri) ve Gengiflexs (periodontal hastalıkların tedavisinde uygulanır) [68]. Üreticilere göre, üretim teknolojisindeki farklılıklar şu şekilde sıralanmaktadır: değişken başlangıç karbon kaynakları konsantrasyonları, yüzey/hacim oranları ve uzun fermantasyon süreleridir. Örneğin; biyo dolgular iki gün içinde üretilirken, çok daha kalın Gengiflexs sekiz gün fermantasyon gerektirmektedir [68].

Biofills adı verilen ürün, bazal hücreli karsinom, deri grefti, şiddetli vücut yanıkları, dikişler, dermabrazyonlar, cilt lezyonları, kronik ülserler ve cilt greftlerindeki hem donör hem de reseptör bölgeleri gibi çeşitli cilt yaralanması tedavileri için kullanılmıştır [66]. BS yara sargısı olan Bioprocesss ise ozmotik yayılma özellikleri ile Slezak ve arkadaşları tarafından ilgi odağı oluşturmuştur. Bu doğrultuda ürünün hidrolik geçirgenlik, yansıma ve yayılabilir, kalıcılık ve su ya da diğer çözeltiler (glikoz, sükroz, etanol, NaCl'nin sulu çözeltisi) için kolay geçirgen olduğunu göstermişlerdir [69].

BS’nin ticari üretimi, 1990'lı yıllarda etkin seri üretim tekniklerini geliştirmeyi amaçlayan disiplinler arası araştırma programları kuran birçok büyük Japon şirketi ve ulusal hükümet kuruluşu tarafından yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Girişime Biopolymer ResearchCo., Uluslararası Ticaret ve Sanayi Bakanlığı (MITI) ve Posta/Telekomünikasyon Bakanlığı altında ortak bir kuruluş olan Japonya, Mitsubishi Paper, Nikkiso ve Naka'nın ortak kuruluşu olan JaponKey Teknoloji Merkezi tarafından desteklenmektedir [70]. Ayrıca 1990'larda, Polonya'daki Lodz Teknik Üniversitesi'nde selüloz biyosentezi üzerine yoğun temel ve uygulamalı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 1996 yılında ise ABD merkezli bir şirket olan Xylos, patentlerini selüloz bazlı yara bakım ürünlerinde kullanmak için Johnson&Johnson ile özel lisans anlaşmaları müzakere etmiştir. O zamandan beri, şirket kendi gelişmiş imalat teknolojisini geliştirmiş ve ürünleri hakkında U.S. Food and Drug Administration (FDA) ya da Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi onayını almayı başarmıştır. Şirket tarafından sunulan XCells yara bakım ürünleri ailesi, 2003'ten beri ABD'de pazarlanan XCells selüloz yara pansumanı ve XCells antimikrobiyal yara pansumanını içermektedir. Stratejisinde, Xylos ilk olarak hızla büyüyen kronik yara bakımı alanına odaklanmaktadır. Üreticiye göre, XCells iyi bir iyileşme süreci için gerekli ideal nem dengesini korumak için hidrasyon ve emilimin çift işlevselliği ile özel olarak tasarlanmış ve karakterize edilmiştir [71]. BS'yi kesinlikle tıbbi amaçlarla ticarileştirme çabalarının yanı sıra, ABD merkezli iki şirket: Cetus. (Emeryville, California) ve Weyerhaeuser (Tacoma, Washington), çalkalamalı kültürde selüloz sentezleyebilen patentli, genetik olarak geliştirilmiş bir *Acetobacter* suşu kullanmışlardır.

Günümüzde BS membranlarının ana ticari kullanımı, epitelizasyonu arttırmak için hücre dışı matrisi taklit eden Bionext, Membracell ve Xcell gibi çeşitli ticari markalar altında ticarileştirilmiş yara sargı cihazları bulunmaktadır [72]. Aslında, BS membranları ile yara tedavisi geleneksel gazlı bezle veya Tegaderm, Cuprophan ve XeroformTM gibi sentetik materyallerle karşılaştırıldığında daha yüksek bir etkinlik göstermiştir [73]. BS membranları diyabetik ayak yaraları, kronik yaralar ve yanıklar dahil olmak üzere birçok yara iyileşme tedavisinde hızlı epitelizasyon ve doku rejenerasyon oranları göstermektedir. Bu doğrultuda BS’nin kullanım alanları sadece yara örtü malzemeleri olarak değil aynı zaman da ilaç

taşıma sistemlerinde, greft çalışmalarında bunlara ek olarak 3B'lu sistemler dahi kullanılmaktadır. Bakteriyel selülozun bu uygulama alanları Şekil 2.8'de özetlenmiştir.



Şekil 2.7 Bakteriyel selülozun uygulama alanları

BS kompozitlerinin ilginç ve yenilikçi bir kullanımı da retina pigment epitelinin (RPE) ve keratinositlerin proliferasyonunu artırdığı çalışmalardır. BS greftleri potansiyel olarak nakledilen korneaların reddedilme oranlarını azaltmıştır. Ayrıca lokal neo-vaskülarizasyonu artırarak yan etkileri en aza indirmiş ve cerrahi iyileşme aralıklarını artırarak göz hastalıklarının tedavisini (örneğin yaşa bağlı maküler dejenerasyon) iyileştirebildiğini ortaya koymuştur [74]. Ayrıca BS kompozitleri, korneal stromal hücrelerin büyümesini desteklemiştir [75]. Böylelikle göz iskeleleri olarak kullanılmak için büyük bir potansiyel kaynak sunmuş olmuştur. Bu BS bazlı kompozit malzemeler hali hazırda klinikte kullanılan daha az biyouyumlu poli(metil)metakrilat (PMMA) veya hidroksiapatit sistemlerine alternatif olmuştur [76].

BS'nin güncel yaklaşımlarından biri de yapay kan damarlarının oluşumunda rol almasıdır. Özellikle Klemm ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; BS'nin, aterosklerotik koronerlerin yapay damarlar olarak değiştirilmesinde mükemmel bir aday olduğunu, yeterli kalıplanabilirlik ve küçük çaplı kan damarlarına (<5 mm) benzer mekanik özellikler sergilediğini göstermişlerdir. Geliştirilen materyal,

sıçanların ve domuzların karotis arterlerine başarıyla implante edilmiş ve uzun süreli (3 ay) stabilite göstermiştir [77].

Kemik rejenerasyonuna yönelik birçok BS kompozitinin osteojenik potansiyeli arttırdığı ve daha hızlı iyileşme gösterdiği de literatürde açıklanmıştır. Özellikle, BS'nin gözenekli morfolojisi kalsiyum ile kompleks oluşturabilir ve kemik rejenerasyon süreçleri sırasında mineralizasyonun artmasını tetiklebilir. Ayrıca bu kompozit yapılar osteoprojenitör hücrelerin göçünü artırma gibi özelliklerinden dolayı kemik rejenerasyonunda iyi bir malzeme olduğunu göstermiştir [78].

2.5.1 Bakteriyel Selülozun 3B'lu Sistemlerdeki Yeri

Katmanlı üretim veya 3B'lu baskı teknolojisi; bir yazıcı kasası, nozül veya başka bir baskı teknolojisi kullanılarak malzemenin katman katman biriktirilmesi yoluyla nesnelerin yazdırılmasıdır. Bu 3B'lu yazdırılmış nesneler elektronik, otomotiv, havacılık ve tıp mühendisliğinde potansiyel uygulamalarda kullanılmasının yanı sıra tıbbi uygulamalarda, insan anatomisinin ve biyolojik yapıların fiziksel modellerinin imalatını içeren (a) biyomodellemede, (b) protez operasyonları, rehabilitasyon ve plastik cerrahi için özelleştirilmiş implantların tasarımı ve imalatında (c) doku mühendisliği için gözenekli implantların (iskeleler) imalatında (d) özel cerrahi yardımcıların ve aletlerin imalatında ve (e) diş restorasyonları dahil ilaç verme ve mikro ölçekli tıbbi cihazların tasarlanmasında kullanılmaktadır [79]. Özellikle, kişiye özel doku iskelelerin oluşturmasına olanak sağlayan 3B'lu baskı stratejisi son zamanlarda yara iyileştirme uygulamaları için yeni bir teknoloji olarak ortaya çıkmaktadır [80].

3B'lu yazıcı sistemlerinde sentetik polimerlerin kullanımı yaygın olsa da son dönemlerde biyouyumlu yapılarından dolayı doğal polimerler bu sistemler için ilgi odağı olmaya başlamıştır. 3B'lu sistemlerin biyomedikal uygulamalarında biyopolimer bazlı hidrojeller; yüksek su tutma kapasitesi ve hücre dışı matriks ve yumuşak dokulara yapısal benzerliğinden kaynaklanan biyouyumlu ve düşük sitotoksisiteleri nedeniyle öne çıkmaktadır. Yara iyileşmesi için ideal bir ortam sunan hidrojeller hem yara bölgesine nemlilik sağlar hem de cilt hidrasyonunun sürdürülmesinde etkili olarak iyileşme sürecinde yardımcı olmaktadır [81].

Literatürde 3B'lu sistemlerin dizaynın da proteinler [79], kitosan [82], kollajen [83] veyahut aljinat hidrojelleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Negatif yüklü karboksilik asit gruplarına sahip olan aljinat hidrojeli, iki komşu aljinat zinciri arasında bir köprü oluşturarak iki iyonla çapraz bağlanabilir. Bu iyonik süreç nispeten hızlıdır ve aljinatın diğer biyolojik uygulamaların yanı sıra yapay kıkırdak, biyomedikal cihazlar, giyilebilir sensörler, yara örtü malzemesi ve ilaç salınım sistemleri için 3B'lu baskı tekniklerinde, özellikle ekstrüzyon teknolojisinde kullanılmaktadır [84]. Bununla birlikte, 3B'lu baskı için aljinatın çok yönlülüğü, yapısal çökme ve şekil uygunluğu ile ilgili sorunlar nedeniyle oldukça sınırlıdır. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için 3B'lu basım teknolojisi yönünü mekanik davranışı oldukça güçlü olan BS'ye yöneltmiştir.

BS, birçok farklı mikroorganizma suşundan sentezlenen bir polisakkarittir. Nanometre boyutunda selüloz liflerinin iç içe geçtiği karmaşık bir ağ yapısına sahip bir hidrojeldir. BS, yüksek mekanik mukavemet, su tutma kapasitesi, kristallik ve saflık dahil olmak üzere benzersiz bir dizi özelliğe sahiptir [85]. Ayrıca, spesifik bir bağışıklık tepkisine neden olmadığı ve yüksek biyouyumluluk sergilemektedir. Bu özelliklere sahip olan BS hidrojellerinin esnek tasarımları kontrol edilebilir 3B'lu yapılanmasına izin vermektedir [86]. BS, oksijen açısından zengin ortamın yüzeyinden biyosentezlendiğinden, hava-sıvı ara yüz özelliklerinin kontrol edilmesi, pratik 3B'lu yapılandırma için de gereklidir [86]. Özellikle BS'nin bir formu olan Bakteriyel nanoselüloz (BNS), birbirine bağlı bir selüloz şerit ağından oluşmaktadır. Biyouyumluluğu ve iyi mekanik özellikleri nedeniyle farklı doku mühendisliği uygulamaları için etkili bir hidrojel benzeri malzemedir. NaOH ile yıkandıktan sonra, BNS yapı iskeletlerinin tıbbi cihazlar için eşiğin oldukça altında endotoksin seviyelerine sahip olduğu ve sitotoksik olmadıkları gösterilmiştir. Kanla uyumlu olduğu gösterilmiştir ve doku mühendisliği çalışmalarında yer alan kan damarlarının tasarımı için kullanılmıştır [87][88]. Özellikle de BNS'nin sahip olduğu mikro/nanolifler, geniş yüzey/hacim oranı sunmaktadır [89]. Ayrıca, ECM'nin kolajen fibrillerine benzeyen bu nano morfoloji (yaklaşık 100 nm genişliğe sahip nanolifler) hidrojel iskeletlerini doğal dokuların 3B'lu ortamına benzer hale getirir [90]. Bu nedenle, mikro/nano fiberler sadece baskı stratejisini iyileştirmek için değil, aynı zamanda hücre çoğalması için mikro gözenekli ortamın inşası ve takviyesi için de kullanılabilir [91]. Bundan dolayı BS, BNS ve BNS'nin kompozit bileşenleri birçok 3B'lu basım tekniği ile doku

mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamasında karşımıza çıkmaktadır. Örneğin; *Escherichia coli (E.coli)* ve *Staphylococcus Aureus (S.aureus)* suşlarına karşı aktif antimikrobiyal aljinat/bakır ve BS ile 3B baskılı materyallerin hazırlanması [92], elektrohidrodinamik (EHD)-3B'lu biyobasım tekniği kullanılarak 100 μm çizgi aralığına sahip BS ve polikaprolakton (PCL) kompozit iskele üretimi [93] ve polilaktik asit (PLA) ve BNS'nin kompozit yapılaşmasından vasküler greft basımı [94] gibi örnekler verilebilir.

2.6 3B'lu Yazıcı Sistemleri

Fonksiyonel doku ve organların oluşturulması ve tam organ replasmanı, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp çalışmalarının başlıca odak noktalarıdır. Bu bağlamda en yaygın doku mühendisliği stratejisi hücreleri iskelelere tohumlamaktır. Yapılan işlem daha sonrasında hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını 3B'lu işleyen dokuları elde etmekle devam etmektedir. Özellikle sentetik ve doğal polimerler çeşitleri dokuların üretiminde oldukça fazla kullanılmıştır. Ancak doku ya da organ gibi kompleks yapıların oluşturulabilmesi için seçilen bu malzemeler biyolojik olarak parçalanabilir ve uyumlu olmalıdır. Ayrıca uygun mekanik mukavemete sahip olmasını istediğimiz bu malzemeler hücre bağlanmasını, çoğalmasını ve doğrudan hücre farklılaşmasını desteklemelidir. Araştırma ve klinik uygulamalar geçmiş yıllarda önemli başarılar elde etse de karmaşık 3B'lu yapıları nedeniyle organların, geleneksel yöntemlerle üretilemeyeceğini ve vasküler ağ entegrasyonunu tam anlamıyla oluşturamayacağını göstermiştir [95]. Bu nedenle doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları doğru yapılaşmada doku ve organ üretmek için yönünü 3B'lu yazıcı kullanımına çevirmiştir.

2.6.1 Biyoprinterler (Biyo-yazıcılar)

3B'lu sistemlerden biri olan biyoyazıcılar da 3B'lu yapıları imal etmek için biyolojik malzemelerin, kimyasal malzemelerin ve canlı hücrelerin katman katman hassas konumlandırması, işlevsel bileşenlerin konumsal kontrolü ile sağlanır. 3B'lu biyoyazıma üç ana yaklaşım vardır; biyomimikri, otonom kendi kendine montaj ve mini doku yapı taşlarıdır [96].

Biyomimikri, doğanın modellerinin, sistemlerinin ve unsurlarının taklidi ile karmaşık insan problemlerinin çözümüne odaklanmıştır. Bir doku veya organın hücresel ve hücre dışı bileşenlerinin özdeş reprodüksiyonları, biyomimikrinin 3B'lu biyoyazıma uygulanmasıdır. Otonom; embriyonik organ gelişimini bir dokuyu kopyalamak için kılavuz olarak kullanan yaklaşımdır. Gelişmekte olan bir dokunun erken hücresel bileşenleri, istenen biyolojik mikro mimari ve işlevi üretmek için kendi ECM bileşenlerini, uygun hücre sinyallemesini, otonom organizasyon ve modellemeyi üretir. Mini dokular kavramı, biyomimikri ve 3B'lu biyoyazıcıların her ikisiyle de ilgilidir. Tasarım ve/veya kendiliğinden bir araya getirme ile mini dokular daha büyük yapılar oluşturabilir, imal edilebilir ve monte edilebilir [97].

2.6.1.1 M□rekkep P□sk□rtmeli Biyoyazıcılar

Mürekkep püskürtmeli baskı stratejisine basılacak olan yapı STL formatı şeklinde bilgisayardan dijital olarak alınır ve temassız bir teknik olan mürekkep damlalarını kullanarak bunu bir substrat üzerinde baskılar. Mürekkep damlalarının hacimler kontrolü cihaz ile belirlenir. Genel anlamda üç ana türü vardır; termal, piezoelektrik ve mekanik bazlı mürekkep püskürtmeli biyoyazıcılardır [98].

Termal mürekkep püskürtmeli yazıcılar, nozülden damlacıkları üretmek için baskı kafasının elektrikli ısıtmasını (200 °C ile 300 °C arasında) kullanmaktadır. Ancak bu teknolojinin en büyük dezavantajı yüksek sıcaklık uygulamasında memeli hücrelerinin canlılıklarını kaybetmesidir [99]. Bunun yanı sıra, yüksek baskı hızı, düşük maliyet ve geniş kullanılabilirlik alanları gibi avantajları da bünyesinde barındırır [96].

Piezoelektrik mürekkep püskürtmeli biyoyazıcılar da bir piezoelektrik malzemeye voltaj uygulamaktadır. Bu yüksek voltaj hızlı bir şekil değişikliğine neden olur ve sıvıyı düzenli aralıklarla damlacıklar halinde kesmek için akustik dalgalar oluşturur. Bu tür akustik dalgalar, nozülden damlacıkları fırlatmak için biyomürekkep materyallerin içindeki basıncı oluşturur [100]. Bu tür biyoyazıcılar, daha yüksek viskozitelerde solüsyonları basabildiklerinden sınırlamalara sahiptir. Ayrıca uyguladığı yüksek voltajın hücre membranlarına zarar vermesi de en büyük dezavantajlarındandır [101].

Mekanik mürekkep püskürtmeli biyoyazıcılarda ise biyomürekkebin akışını sağlamak için nozülden geçen basınç kullanılır. Basınç kaynağı pompa tabanlı bir sistemdir. Bu tür mürekkep püskürtmeli biyoyazıcılarda, nozül ucunda bir valf bulunur. Valf, biyomürekkebin uçtan damla damla akmasına izin vermek için açılır. Bu biyo yazıcıların temel dezavantajları, mekanik basınç ve nozül tıkanma problemlerinin neden olduğu hücre hasarıdır [102].

2.6.1.2 Mikroekstr□zyon Biyoyazıcılar

Mikroekstrüzyon tabanlı biyoyazılar jel formunda bir biyomürekkebi basabilmek için otomatik bir robotik sisteme sahiptir. Basılan yapılan 3B'lu ürünler silindirik filamentler yapısındadır. Bu silindirik lifler, hücreleri ve diğer biyolojik malzemeleri de içerebilir [103].

Mekanik mikro ekstrüzyon sistemleri bir piston veya vidalı bir konfigürasyon kullanır. Pistonla çalışan dağıtıcı, nozülden biyomürekkep akışı üzerinde doğrudan kontrol sağlar. Öte yandan, vidalı dağıtıcı daha fazla konum kontrolü sağlayabilir ve yüksek viskoziteli biyolojik bağlantıların işlenmesi için daha kullanışlıdır. Ekstrüzyon tabanlı biyo yazıcıların yapımı basittir ve ekonomiktir. Bu yöntemlerin dezavantajı, yalnızca yüksek viskoziteli malzemelerin ekstrüde edilebilmesidir [104].

2.6.1.3 Lazer Destekli Biyoyazıcılar

Lazer destekli biyoyazıcılar (LAB), lazer kaynaklı ileri aktarım ilkelerine dayanmaktadır. Tipik bir LAB cihazı, bir lazer ışını, odaklama sistemi, genellikle lazer enerjisini emen katmanla kaplı camdan yapılmış bir verici taşıma desteğine sahip bir şerit ve sıvı bir çözelti içinde hazırlanmış bir biyolojik malzeme katmanından oluşur. LAB, hücre içeren malzemeleri toplayıcı substrata doğru hareket ettiren yüksek basınçlı bir balon oluşturmak için şeridin emici tabakasında odaklanmış lazer darbeleri kullanarak çalışır [105]. LAB'nin çözünürlüğü, lazer akış hızı, yüzey gerilimi, alt tabakanın ıslanma yeteneği, şerit ve alt tabaka arasındaki hava boşluğu ve biyolojik tabakanın kalınlığı ve viskozitesi dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenir. LAB, nozulsuz bir yöntemdir; bu nedenle biyo-baskı malzemeleri ve hücreler ile ilgili tıkanma sorunu ortadan kalkmıştır [106].

2.6.2 Katmanlı □retim Sağlayan 3B'lu Yazıcılar

3B'lu baskı stratejilerinden biri olan katmanlı üretim, birçok medikal ve doku mühendisliği çalışmalarının en gözde yaklaşımlarından bir tanesidir. Bu 3B'lu baskı yaklaşımı katman katman istenilen ürünün basılmasını sağlamaktadır. 1980'lerden bu yana kullanılan bu teknoloji stereolitografi (SLA), kaynaştırılmış biriktirme modelleme (FDM) ve seçici lazer sinterleme (SLS) 3B'lu yaklaşımlarından oluşmaktadır [107]. Bağlayıcı püskürtme, dijital ışık işleme, ve macun ekstrüzyonu gibi birçok katmanlı üretim varyasyonu da daha sonraki yıllarda gelişimini göstermiştir [108].

2.6.2.1 Stereolitografi (SLA) Teknolojisi

1986'da icat edilen SLA teknolojisi, 3B'lu nesnelerin basılması için bir sıvı polimer reçine bazlı biyomürekkebi katman katman seçilimli olarak polimerize ederek bir tarama lazeri kullanılarak baskıya hazırlar. SLA lazer tarama tabanlı bir 3B'lu baskı teknolojisidir ve nokta ışık kaynağı aydınlatması kullanarak polimer bazlı reçinin ve kompozitlerin fotopolimerize ederek basımı gerçekleştirir [109]. SLA 3B'lu basım tekniği, yapı platformu hareketine ve lazer hareketine göre iki ana başlık altında incelenebilir.

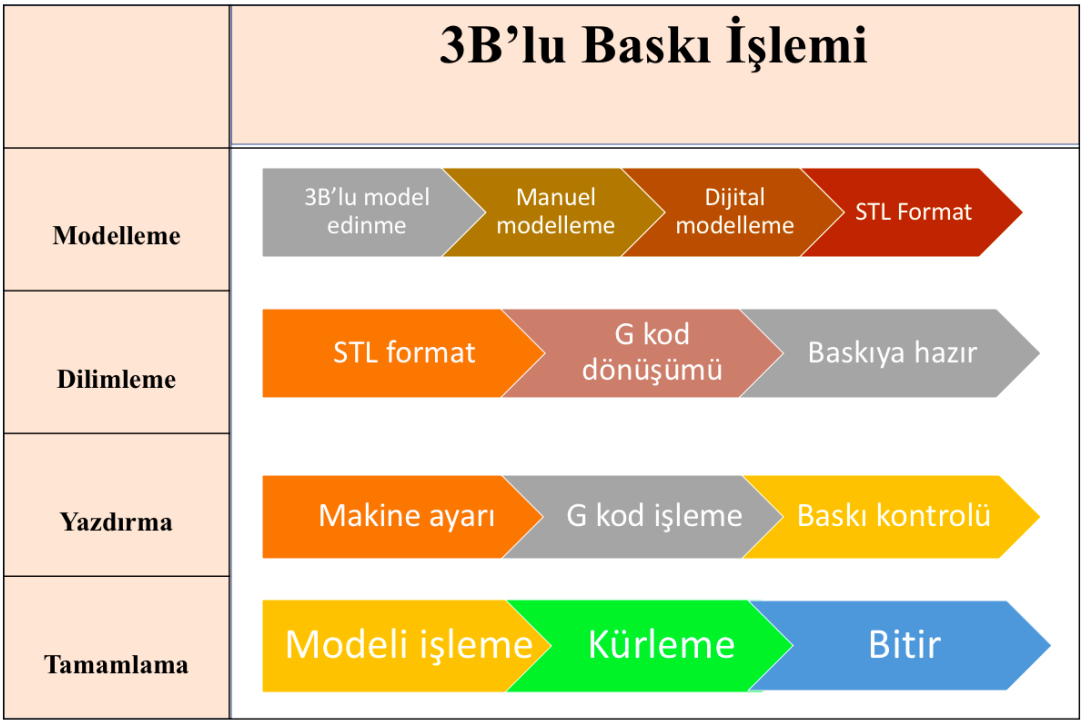
SLA 3B'lu basım stratejisi, diğer katmanlı üretim teknikleri arasında en yüksek çözünürlüğü sağlamaktadır. SLA yazıcıları ile 20 μm veya daha düşük çözünürlüklere kadar kolayca ulaşabilmektedir [110]. Yüksek çözünürlük uygulanan fotonların yoğunluğu ile sağlanmaktadır. SLA teknolojisi ile iki foton lazer başlatma sistemi kullanılarak nano ölçekli baskı kalitesini sağlanmış olmaktadır. İki fotonlu yaklaşım yanında kullanılan Işık İşleme Birimi (LPU) ile erken kürlenme önlenerek baskı kalitesi arttırılmış olmaktadır [111]. Ayrıca basım sürekli sıvı ara yüz üretimi (CLIP) adı verilen yeni bir tekniğin SLA teknolojine entegrasyonu ile de basılacak olan modelin saatler yerine dakikalar içinde basılması sağlanmaktadır. Süreç boyunca basılacak model ile rezervuar taban arasında 'ölü bölge' adı verilen kürlenmemiş reçine bazlı biyomürekkebin bulunduğu bir havuz bulunmaktadır. Bu bölge özel olarak tasarlanmış Ultraviyole (UV) geçirgen ve yüksek oksijen geçirgen bir pencere ile oluşturulur. UV şeffaflığı reçine bazlı biyomürekkebin kürlenmesi için lazer penetrasyonunu sağlarken,

oksijen geçirgenliği, oksijenin reçine rezervuarına nüfuz ederek polimerizasyonu inhibe etmesine izin verir. Bu "ölü bölge", basılı parçanın altında her zaman yeni bir reçine tabakasının bulunmasını sağladığından, sürekli baskı için bir avantaj sağlamaktadır. Dahası, yapı platformu hareketi bir silegeçten oluştuğundan süreklidir ve reçinenin sertleşme hızına uyacak şekilde yavaş hareket eder. Bu nedenle, genel baskı işlemi, lazerin reçineyi sertleştirirken kürlenen reçine basılı parçalar üzerinde biriktiği süreklilikle yürütülür [112].

2.7 Dokuların G□r□nt□lenmesi ve Tasarlanması

Karmaşık fonksiyonel dokuları veya organları yazdırmak için bunların doğru bir şekilde modellenmesi ve tasarlanması oldukça önemlidir. Özellikle hücresel, doku, organ ve organizma düzeyinde görüntüleme teknolojilere sahip olan tıbbi görüntüleme teknolojileri, 3B'lu yapıla ve işlevselliği hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Bu bağlamda kullanılan bilgisayar destekli tasarım (CAD) oldukça popülerdir ve karmaşık mimariye sahip olan doku ve organların yapısal formunun anlaşılması için kullanılır. Diğer biryandan manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve bilgisayarlı tomografi (CT) gibi birçok güncel görüntüleme ve teşhis teknolojisi de hedeflenen dokular hakkında bilgi edinmek ve greftlerin CAD verilerini elde etmek için kullanılmaktadır [113].

Teknik anlamda 3B'lu yazıcı sistemlerini inceleyecek olursak; dijital ortamda mevcut olan bilgisayar destekli tasarım dosyalarının kullanılması ile üretilmesi planlanan nesneleri ince katmanlar şeklinde üretebilmektedir [114]. Genellikle bu tasarım dosyaları AutoCAD, 3DS MAX gibi bilgisayar destekli profesyonel 3B'lu yazılımlarından SketchUp, Tinkercad, Autodesk123D gibi web tabanlı yazılım programları sıklıkla tercih edilen programlardan oluşmaktadır [115]. Bu teknolojik süreç temel anlam da dört ana işlemden meydana gelmektedir; modelleme süreci, dilimleme süreci, yazdırma süreci ve tamamlama sürecidir. Şekil 2.9'da bu aşamalar özetlenmiştir.



Şekil 2.8 3B'lu baskı işlemleri

2.8 Biyomürekkep Seçimi

Biyomürekkep olarak uygun biyomalzemelerin seçimi, başarılı bir baskı ürünü elde etmek için hayati bir adımdır. Hem doğal hem de sentetik biyomalzemelere dayalı biyomürekkepler bulunmaktadır [116].

Sentetik polimerlerlerin sahip olduğu iyi mekanik mukavemet ve fizokimyasal özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalar için çokça tercih edilmektedir. Bu malzemeler düşük maliyetle üretilebilir ve ayrıca biyolojik olarak inert özelliktedir. Bu da basım sonrası yapıda patojenik etkinin azaltılması anlamına gelmektedir [117]. Sentetik ve doğal polimer karışımları ise hücresel tepkileri örneğin hücre yapışması, farklanması ve proliferayonunu artırmaktadır [118]. Genellikle; 3B'lu baskı için polikaprolakton (PCL), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli (etilen glikol) (PEG) ve Poloksamer 407 (Pluronic F127) tercih edilmektedir. Bu polimerler içinde PCL ve PLGA en popüler polimer sınıfıdır ve termoplastik ve biyouyumluluk özelliklerini bünyelerinde barındırmaktadır. PLGA, PLA ve poli (glikolik asit) (PGA) arasındaki orana bağlı olarak kontrol edilebilir bozunma özelliklerine sahip, FDA onaylı bir malzemedir. PCL ise hidrojel

bazlı 3B'lu baskılı yapılarda gerekli mekanik özellikleri sağlayan polimerik bir malzemedir [119].

3B'lu baskıda kullanmak için malzeme seçimi ve performansı, basılabilirlik, biyouyumluluk, yapısal ve mekanik bozulma özelliklerine bağlıdır. Malzemelerin jelleşme özellikleri malzeme viskozitesi için önemlidir. Materyaller ayrıca konakçıda bir bağışıklık tepkisi oluşturmamak için biyolojik olarak uyumlu olmalıdır. Malzemelerin bozunma ürünleri toksik olmamalı ve bozunma oranları dokuya uygun olmalıdır. Mekanik özellikler oluşturduğumuz dokuya benzer olmalıdır. Seçilen biyomürekkep materyalleri dokuya özgü endojen materyal kompozisyonlarını taklit etmelidir ve oksijen geçirgenliği sağlamalıdır [96]. Biyomürekkebin sahip olması gereken özellikler şekil 2.10'da özetlenmiştir.



Şekil 2.9 Biyomürekkep formülasyonun özellikleri

Kolajen, kitosan gibi doğal olarak türetilmiş polimerler ve PEG, poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) gibi sentetik polimerlerin bazıları rejeneratif tıp alanında ve

doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomürekkep fomülasyonu 3B'lu baskı uygulaması ile uyumlu olmalıdır. Genel olarak bu yükümlülükler nedeniyle, doğal polimerler bir biyomürekkep malzemesi olarak seçilmektedir.

Agaroz doğal polimer biyomürekkep seçiminde oldukça fazla tercih edilmektedir. D-galaktoz ve 3,6-anhidro-L-galaktopiranozun tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan kırmızı deniz yosunundan türetilen doğal bir polisakkarittir [120]. Agaroz, karbonhidrat polimer ailesinin bir parçasıdır. Isı ile jelleşme özelliği nedeniyle 3B'lu doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılır [121]. Norotte ve arkadaşları tübüler vasküler greftler oluştururken duvar kalınlığını ve çapını kontrol etmeye yardımcı olmak için agaroz doğal polimerini kullandılar [122]. Agaroz hidrojelleri ayrıca kıkırdak dokusunu 3B'lu basmak için kullanılmıştır [123].

Diğer bir doğal polimer olan aljinat ise kahverengi alglerden elde edilen biyouyumlu bir anyonik polimerdir [124]. Biyouyumluluk yeteneği ve diğer polimerlerden nispeten daha düşük maliyetli olan aljinat; yara iyileşmesi, ilaç dağıtımı ve doku mühendisliği dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [125]. Saf aljinat ayrıca düşük viskoziteye sahiptir. Bu da 3B'lu sistemlerde şekil koruma kabiliyetini etkiler. Ancak aljinat, çok düşük biyoaktiviteye sahip olması nedeniyle hücre proliferasyonunu desteklemediği anlamına gelir [126]. Bundan dolayı aljinatın biyomürekkep olarak kullanılması genellikle vizkozite arttırıcı özelliğinden kaynaklanmaktadır [127]. Lee ve arkadaşları aljinat bazlı bir biyomürekkebe metakrilatlanmış hücresizleştirilmiş ECM (dECM) eklenmesinin biyoaktiviteyi iyileştirdiğini bulmuşlardır [126].

Kitosan ise kitin deasetilasyon yoluyla üretilen doğal olarak türetilmiş bir polisakkarittir. Kitosan tipik olarak suda çok az çözünür ancak pH değeri 6,2 veya daha düşük olan solüsyonlarda çözünebilir [128]. Ayrıca, kitosan toksik değildir, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumludur. Ancak kitosan zayıf mekanik mukavemete sahiptir. Bu da kitosanın kıkırdak gibi sert dokular oluşturmak için kullanımının uygun olmadığını gösterir. Literatürde kitosan ile yapılan bir çalışma da kitosanın asidik bir karışım içinde çözülmesi ile biyomürekkep hazırlanmıştır.

Ağırlıkça %11'den yüksek ve ağırlıkça %4'ten düşük kitosan mürekkebi konsantrasyonlarının sırasıyla çok viskoz ve çok seyreltik olduğu görülmüş. Basılı yapılar, yüksek çözünürlük (30 um) ve yüksek şekil koruması göstermiştir [82].

İnsan vücudunun protein kütlesinin yaklaşık %30'unu oluşturan kolajenler ECM'nin önemli yapısal bileşenleri olan hidrofilik proteinlerdir. Kolajenler, α zincirleri olarak bilinen üç polipeptit zincirinden oluşur ve üçlü sarmal yapıdadır [52]. Değişen miktarlarda üçlü sarmallardan ve farklı α zincir kombinasyonlarından oluşan 28 farklı kolajen türü vardır [129]. Kolajenler önemli immünolojik tepkilere neden olmazlar ve hücre yapışmasını, bağlanmasını ve büyümesini teşvik eden integrin bağlayıcı alanlara sahiptir [30]. Kollajen tip I, fibril oluşturan kollajen alt ailesinin bir üyesidir ve biyo-baskıda yaygın olarak kullanılmaktadır [84]. Yang ve arkadaşlaarı aljinat bazlı bir biyo-bağa tip I kollajen eklenmesinin mekanik mukavemetini artırdığını, kondrosit fenotiplerini korumaya yardımcı olduğunu ve kıkırdak yapılarını yazdırırken istenmeyen farklılaşmayı bastırdığını göstermişlerdir [123].

3
MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel □alışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler

- Thoma Lamı (ISOLAB 075.03.002)
- Pipet ucu 1000 µL (ISOLAB TB1000)
- Pipet ucu 200 µL (ISOLAB TB200)
- Pipet ucu 10 µL (ISOLAB TB010)
- 96 kuyucuklu plaka (TPP 92096)
- 24 kuyucuklu plaka (TPP 92024)
- 6 kuyucuklu plaka (TPP 92006)
- Hücre kryo (dondurma) tüpler (ISOLAB 09111102)
- 15 ml'lik steril falkon tüpler (CORNING 352095)
- 50 ml'lik steril falkon tüpler (CORNING 352070)
- Steril tek kullanımlık pipetler (2 ml) (TPP TP94002)
- Steril tek kullanımlık pipetler (5 ml) (TPP TP94005)
- Steril tek kullanımlık pipetler (10 ml) (TPP TP94010)
- Steril petri kabı (ISOLAB 08102061)
- Hücre kültür flaskları (T25) (TPP 90026)
- Hücre kültür flaskları (T75) (TPP 90076)
- Nitril eldiven

3.1.2 Deneysel □alışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) besi yeri (Sigma-MFCD00217820)
- Eendothelial cell growth factor; ECGF
- Endothelial cell growth supplement; ECGS
- Glikoz- (G 8270 Sigma)
- Baktopepton (211677- Thermo Fisher Scientific)

- Maya özütü (Sigma- 21069092400
- KH_2PO4 (Sigma- 7778-77-0)
- K_2HPO4 (Sigma- 7758-11-4)
- HCl (Sigma- 7647-01-0)
- NaOH (Sigma- 221465)
- 4’,6-Diamidin-2'-fenilindol dihidroklorür (DAPI) Boyası (Sigma- 10236276001)
- Hematoksilin&Eosin (H&E) Boyası
- Çinko Sülfat (1kg İso Merck 108883.1000)
- Sığır serum albümini (BSA) (Thermo Fisher- A23018)
- FormLabs- Elastik Reçine
- Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98 (MTT-Sigma M5655)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO-ChemCruz sc358801/Carlo Erba 508001)
- Phosphate buffered saline (PBS) tablet (Sigma Aldrich 524650)
- Fetal Bovine Serum (FBS)(Biological Industries 04-007-1A)
- Tripsin-EDTA (Biological Industries 03-052-1A)
- Tripan mavisi (Sigma T8154)
- Lizozim (sigma- 12650-88-3)
- Total Antioxidant Status (TAS) Test Kiti

3.1.3 Deneysel □alışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi (Shimadzu)



Şekil 3.1 Hassas terazi

- Sonikatör (Bandelin Sonoplus)



Şekil 3.2 Sonikatör

- Manyetik karıştırıcı (Variomag Mono)



Şekil 3.3 Manyetik karıştırıcı

- Çalkalamalı inkübatör (Mikrotest MCI55)



Şekil 3.4 Çalkalamalı inkübatör

- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter Allegra X-30 R)



Şekil 3.5 Santrifüj cihazı

- Mini santrifüj cihazı (Hermle. Z 206 A)



Şekil 3.6 Mini santrifüj

- Vorteks (Velp Scientifica)



Şekil 3.7 Vortex

- Liyafilizatör (Telstar Cryodos)



Şekil 3.8 Liyafilizatör

- FT-IR (Perkin Elmer Spectrum 100)



Şekil 3.9 FT-IR cihazı

- CO_2 inkübatör (Esco, CelCulture CO_2 INCUBATOR)



Şekil 3.10 CO_2 inkübatör

- Otoklav (Hirayama)



Şekil 3.11 Otoklav

- Invert mikroskop (Zeiss, Zen Blue2)



Şekil 3.12 Invert mikroskop

- Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Zeiss, EVO® LS 10)



Şekil 3.13 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

- Biyogüvenlik kabini (Mikrotest MLF120)



Şekil 3.14 Biyogüvenlik kabini

- Elisa reader (Biotek PowerWave XS2)



Şekil 3.15 Elisa Reader

- BET yüzey alanı cihazı (Quantachrome, QuadraSorb SI)



Şekil 3.16 BET cihazı

- RAMAN Spektrofotometresi



Şekil 3.17 RAMAN cihazı

- TG/DTA (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300)



Şekil 3.18 TG/DTA cihazı

- FormsLab 3B'lu yazıcı- Form2



Şekil 3.19 Form2 3B'lu yazıcısı

3.2 Metod

Sunulan tez çalışmasının method kısmı BS bazlı biyomürekkep malzemelerin 3B'lu sistemlerde basılmak üzere hazırlanmasını, 3B'lu basılan malzemenin karakterizasyon çalışmalarını, hücre kültürü çalışmalarını ve 3B'lu yapıda hücre çalışmalarını kapsamaktadır.

3.2.1 BS Temelli Biyomürekkep Hazırlanması

BS üretimi, *Gluconacetobacter xylinus* (Brown) Yamada ve ark. (ATCC® 10245TM) taradından tanımlanan; 5 g/L glikoz, 5 g/L baktopepton, 2,5 g/L maya özütü, 4 mM KH_2PO4 ve 6 mM K_2HPO4 içeren Hestrin – Schramm ortamında, selüloz pelliküller üretmek için 1M HCl eklenerek pH: 5.0'e optimize edilmiş şekilde statik kültür koşulları altında hazırlanmıştır. İnokulum 2 gün boyunca döner bir çalkalayıcı kullanılarak 30 °C 'de gerçekleştirilmiştir. Statik olarak petri kaplarına 1:10 oranında alt kültür oluşturulmuş ve 7 günlük bir sürede BS'de nanofiber yapı oluşumu gözlenmiştir. İstenmeyen ortam bileşenlerini ve bakterileri uzaklaştırmak için elde edilen BS membranları distile su ile yıkanmış ve 80 °C'de 1M NaOH solüsyonunda 2 saat bekletilmiştir Sonrasın da BS membranları, pH: 7'ye ulaşana kadar birkaç kez tekrar suyla yıkanmıştır. Sterilizayon edilen BS 1 gece boyunca liyofizasyon edilerek kurutulmuştur. Kurutulan BS, 60°C'lik bir sıcaklıkta ağırlıkça 1:10 oranında çinko sülfat çözücüsü içerisinde 2 gün boyunca manyetik bir karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra BS, 1 saat süreyle %100 güçte bir sonikatör kullanılarak sonikasyona tabi tutulmuştur. BS örnekleri 6000 Revolutions per Minute (RPM)'de 600 saniye santrifüj edilmiştir. Her santrifüj adımından sonra, süpernatant çıkarılmış ve parçalanmış BS yapısı elde edilmiştir. Üretilen BS ağırlıkça 1:20 konsentrasyonda ticari reçine ile karıştırılmış ve nihai karışım, 23°C'de 1 saat manyetik olarak karıştırılarak uygun biyomürekkep formülasyonu elde edilmiştir.

3.2.2 Vasküler Greftin 3B'lu Basım Stratejisi

BS'nin biyo mürekkep formülasyonu, FormsLab'dan temin edilen Form2 yazıcı ile basılmıştır. Yazıcının içindeki özel olarak tasarlanmış Işık İşleme Birimi (LPU), doğru ve tekrarlanabilir baskılar sağlamak için kompakt bir lens ve ayna sistemi kullanmaktadır. Çözünmüş BS/çinko sülfat, ağırlıkça 1:20 oranında ticari elastik reçine ile karıştırılmıştır. Biyomürekkep STL formatında tasarlanmış bir model olarak insan aort damarı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaz, XY çözünürlüğünü 25 mikron olarak değerlendiren ve katman kalınlığını 25-300 mikron (0.001-0.012 inç) oluşturan Düşük Güçlü Stereolitografi (LFS) teknolojisi ile çalışmaktadır. Ekipman, paslanmaz çelik bir nozül (21G), yüksek voltajlı güç

kaynağı, programlanabilir bir şırınga pompası, X-Y kademede hareket edebilen kontrol başlığı, cam alt tabaka tutucusu ve Z ekseni kontrollü nozül tutucusundan oluşmaktadır. Nozül ve substrat arasındaki mesafe, deneysel kurulum için 1 mm'ye sabitlenmiştir. Akış hızı 100 µL/sa'de tutulmuş ve SLA kısımlarına post-kürleme uygulanmıştır. Mimari, birbirini takip eden iki katman arasında 0 ve 90 açılı adımlarla manipüle edilmiştir. 80°C'ye kadar sertleştirme sıcaklıklarını hassas bir şekilde kontrol eden gelişmiş bir ısıtma sistemi ile Form2 yazıcının son işlemesini kolaylaştırmak ve otomatikleştirmek için yıkama ve sertleştirme adımları kullanılmıştır.

3.2.3 3B'lu Vasküler Greftin Karakterizasyonu

3.2.3.1 Y□zey Morfolojisi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), numune yüzeyinin odaklanmış bir elektron demeti vasıtasıyla görüntü elde eden bir elektron mikroskobu tipidir. Kullandığı elektronlar sayesinde SEM en güçlü ışık mikroskobundan neredeyse 250 kat daha fazla büyütme oranı sergileyebilmektedir. SEM'in oluşturduğu yüksek enerjili demet formundaki elektronların numune atomlarının barındırdığı dış yörünge elektronları ile elastik davranışa sahip olmayan girişimi sonucunda düşük enerjili elektronlar oluşturur. Bu elektronlar; Auger elektronları olarak adlandırılır. Numune yüzeyindeki bilgiler bu elektronlar tarafından sağlanır. Yörüngelerden atılan veya enerjisi azalan demet şeklindeki elektronlar numune yüzeyine doğru hareket ederek yüzeyde toplanır. Bu elektronlara ise ikincil elektron adı verilir. SEM cihazında bulunan sintilatör vasıtası ile ikincil elektron görüntüsü sinyaline çevrilir. Sinyal; ikincil elektronların numune yüzeyinin 10nm veya daha düşük derinliklerinden gelmesi ile yüksek çözünürlüğe sahip toporafik görüntüsü ile sonuçlanır.

BS ve BS bazlı vasküler greftin morfolojisi bir SEM ile analiz edilmiştir. BS membran örneği için gece boyunca 65°C liyofilizasyona tabi tutulmuştur. Morfoloji analizinden önce, örneklere 75 saniye boyunca 10 mA akım altında 1kV potansiyel uygulanıp 'spotter coater' cihazı kullanılarak altın kaplanması sağlanmıştır (Quorum SC-7620). İkincil elektron saptayan dedektör kullanılarak yüzey analizi yapılmıştır. Yüzey analizi yüksek basınç koşulları altında

gerçekleştirilirken ikincil elektron kaynağı olarak LaB6 flaman kullanılmıştır. BS membranı ve 3B'lu basılmış vasküler greft örneği 20.00 ve 50.00K 'de büyütülmüştür. Ayrıca, baskılı aortun ana yapısını görselleştirmek için vasküler greft numunesi malzeme mikroskobu ile incelenmiştir.

3.2.3.2 Yüzey Alanı Analizi

Gaz basıncından yararlanarak katı maddelerin yüzey alanının ölçülmesini sağlayan Yüzey Alanı Ölçümü (BET) 1938 yılında Brunauer, Emmett ve Teller tarafından ilk yapısal formu tanımlanmıştır. 1960 yılında Haul ve Dümbgen tarafından geliştirilmesiyle bugün ki kullanılan formu ortaya çıkmıştır. Katı numunenin yüzey alanı; numunenin gaz basıncına maruz bırakılması ve gazın numunenin gözenekli yapısı tarafından absorbe edilmesiyle bir gaz basıncı yani P değerinin numuneye uygulanan ilk gaz basıncına yani P0 değerine oranı ile hesaplanır.

Çalışma da 3B'lu baskılı vasküler greft yüzey alanını belirlemek için Brunauer-Emmett-Teller (BET) yüzey alanı aparatı (Quantachrome, QuadraSorb SI) kullanılmıştır. Vasküler greft numunesi bir gaz giderici (kuantokrom) içine yerleştirilmiş ve ardından numuneden nemi uzaklaştırmak için 18 saat boyunca 75°C'ye kadar ısıtılmıştır. Yüksek saflıktaki nitrojen ve azotun malzeme yüzeyine 189.3 dakika absorpsiyonu ile yüzey alanını ölçmek için kullanılmıştır. P/P0 0.05-0.3 aralığında analiz edilmiştir.

3.2.3.3 Termogravimetrik Analiz

Termogravimetrik (TG) analiz; malzemenin belirli bir zaman aralığında ısıtılması ve işlem boyunca gerçekleşen kütle kaybının ölçülmesine dayalı bir yöntemdir. Gerçekleşen kütle kaybı maddenin bozulma sıcaklığını göstermektedir. Differansiyel termal analiz (DTA) ise maddedeki sıcaklık artışının maddeye verilen enerji vasıtasıyla hesaplayan metoddur. Bu sıcaklık ve enerji arasındaki ilişki bizlere maddenin hal değişim grafiğini sunmaktadır [130].

Çalışmada; 3B'lu baskılı vasküler modelin termal stabilitesi (SII600 Exstar TG/DTA 6300) TG ve DT analiz ile belirlenmiştir. Alüminyum kalemler, numuneleri dinamik hava altına yerleştirmek için kullanılmıştır. 10°C/dk ısıtma hızlarında azot atmosferi uygulanmış ve kütle kaybı, 25-1000°C'de 90 dakika

boyunca ölçülmüştür. Her numunenin termogramları 10 µg numunelerle analiz edilmiştir. Numuneler, nitrojen gazı altında dakikada 10°C'lik bir oranda -5°C'den 200°C'ye ısıtılmıştır.

3.2.3.4 Dinamik Mekanik Analiz

İn vivo ya da klinik çalışmalar da kullanılmak üzere hazırlanan her biyomalzeme belirli bir mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. Özellikle vücut içi sıvıya maruziyet göz önünde bulundurulduğunda kullanım amacına göre (kemik, vasküler yapılaşma ya da kıkırdak doku) belirli bir stabilite göstermelidir [131].

Çalışmada; Perkin Elmer DMA 8000 analizörü, 3B'lu baskılı vasküler greftin dinamik mekanik davranışını ölçmek için kullanılmıştır. Vasküler greftin mekanik davranışı; oda sıcaklığından 100°C'ye, 1 Hz frekansta ve dakikada 5°C'lik bir ısıtma hızı uygulanarak hesaplanmıştır. 17 mm uzunluğunda, 7 mm genişliğinde ve 0,03 mm kalınlığında 3B'lu baskılı numune ölçüm için hazırlanmıştır. Dinamik meknaiz analiz (DMA) analizi boyunca gripler arası uzaklık 10mm ve çekme hızı dakikada 10mm olacak biçimde düzenlenmiştir. Young's modulus ve elongation at break değerleri test sonucunda hesaplanmıştır. DMA analizi 30°C de, tension modunda (Devotrans- GPUG/R) ve 5 tekrarlı şekilde uygulanmıştır.

3.2.3.5 Fourier D□n□ş□ml□Kızıl□tesi (FTIR) Spektroskopisi

FT-IR spektroskopisi yapısal olarak; ışın bölücü, ışık kaynağı ve detektörden oluşmaktadır. Prensip olarak FT-IR; ışığın yoğunluğuna karşı oluşan dalga sayısını ölçen analitik bir yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisi üç ana bölgeden oluşur; yakın dalga boylu (NIR 4000∼14000 cm^{-1}), orta dalga boylu (MIR 400∼4000 cm^{-1}) ve uzak dalga boylu (FIR 4∼400 cm^{-1}) kızıl ötesidir. MIR bölgesi kendi içinde; fonksiyonel gruplar bölgesi ve parmak izin bölgesini de içermektedir. Bant aralıkları incelendiğin de parmak izi bölgesi (1200–700 cm^{-1}) oldukça dar bir alanı temsil etmektedir. Bu bant aralığı küçük yapıların örneğin; nükleik asit, protein gibi hücre elementlerini ve hücre duvarına ait bileşenlerin tespiti için ideal bir aralık sunmaktadır. Bu sebeple FT-IR analizinde seçilen malzemenin karakteristik bilgisi aynı zamanda bu bölgeden sağlanır [132].

Çalışmada; kimyasal karakterizasyon için Perkin Elmer SpectrumTM 100 FTIR spektrometresindeki evrensel ATR bağlantısı kullanılmıştır. 4000–650 cm^{-1}

aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 32 birikimli tarama kullanılmıştır. FT-IR analizi; BS/çinko sülfat, reçine ve 3B'lu baskılı vasküler greft bileşenleri arasındaki kimyasal grupların varlığını analiz etmek için kullanılmıştır.

3.2.3.6 Raman Spektrofotometresi

Çalışmada Raman spektrumları, lazer gücü 5 mW olan bir diyot lazerden 785 nm radyasyon kullanılarak uyarılıştır. Spektrumlar 230–3500 cm^{-1} aralığında elde edilirken, 40 tarama kullanılmıştır. FT-IR sonuçlarını destekleyen RAMAN analizi BS/çinko sülfat, reçine ve 3B'lu baskılı vasküler greft bileşenleri için hesaplanmıştır. RAMAN analizin de N_2, O_2 ve Cl_2 gibi homonükleer moleküller hariç, bütün molekül yapılarının infrared ışınları absorplanabilmektedir [133].

3.2.3.7 Şişme Analizi

Damar greftinin su tutma kapasitesi şişme testi ile belirlenmiştir. Aort numunesinin kuru ağırlığı (W0) hesaplanmıştır. Daha sonra numune, 37°C'de 10 mL su içerisine daldırmak için $2cm^2$ çapında parçalar halinde kesilmiştir. Üç gün boyunca her 24 saatte bir aort numunelerinin ağırlıkları hesaplanmıştır (Ws). Deney, analiz denklemi kullanılarak beş tekerrürlü gerçekleştirilmiştir ve 3.1'deki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı} = [(W0\ W) / W0] \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.3.8 Biyodegredasyon Analizi

3B'lu baskılı vasküler greftin in vitro biyodegradasyonu gravimetrik yöntemle değerlendirilmiştir. Lizozim (1.5µg/mL) içeren PBS çözeltisi kullanılmıştır. 3B'lu baskılı vasküler greft örneği, 20-10 mm çapında kesilmiş ve sterilizasyon için 120°C'de 20 dakikada boyunca otoklavlanmıştır. Lizozim enzimi içeren solüsyon içerisinde 37°C'de bir ay boyunca 60 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde tayin edilmiştir. 7, 14, 21 ve 28. günlerde 3B'lu baskılı numunenin kuru ağırlıkları ölçülmüş ve her bir ölçüm sonrası lizozim çözeltisi tazelenmiştir. Her ölçüm günü, solüsyondan çıkarılan örnekler distile su ile yıkanıp, Whatman kağıdı ile kurutulduktan sonra ağırlığı hesaplanmıştır. Örneklerdeki kütle kaybı 3.1'deki denkleme göre değerlendirilmiştir:

$$\text{Kilo kaybı (\%)} = [(W0 - W) / W0] \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.3.9 Protein Adsorpsiyon Kapasitesi

3B'lu baskılı vasküler greft örneğinin protein adsorpsiyon kapasitesini belirlemek için BSA) standart eğrileri kullanıldı. Standartlar %1, %0.75, %0.5, %0.25, %0.062 mg/ml olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Tespit için 3B'lu baskılı vasküler greft duvarları seçilmiştir. Vasküler greftin duvar örneklerini 1,5 ml'lik tüplere yerleştirmek için 0.5 x 1 cm boyutunda kesilmiştir ve 1mg/ml BSA çözeltisinden 500μl alınarak 37°C'de örnek tüpüne eklenmiştir. Yapışmayan proteinleri çıkarmak için numuneler, inkübasyon süresinin sonunda distile su ile yıkanmıştır. Örnekler yeni 1,5ml'lik tüplere yerleştirilmiş ve 3B'lu baskılı aort numunesine eklenen proteinleri ayırmak için 37°C'de 30 dakika süreyle %0.5 TritonX içinde inkübe edilmiştir. Coomassie mavisi boyası, 595 nm absorbansta 24 kuyucuklu plakaya 10 ul TritonX içeren numunelerin adsorpsiyonunu hesaplamak için kullanılmıştır.

3.2.4 H□cre K□lt□r□□alışmaları

Hücre kültüründe amaç; belirli bir doku ya da organdan izole edilen hücrelerin in vitro ortamda çoğaltılmasını sağlamaktır. Hücre kültüründe kullanılmak üzere izole edilen hücrelerin, içerisinde temel aminoasitler, mineraller ve tampon çözeltileri bulunan besi yerlerine adaptasyonu çoğaltılma işleminin ana odak noktasıdır. Canlılığı sağlanan hücreler daha sonrasında birçok in vivo çalışmaya olanak sağlamaktadır.

Hücre hatları birincil (primer), ikincil (sekonder) ve devamlı hücre hatları olarak üç ana başlık altında incelenir. Doku ya da organdan genellikle mekanik veyahut enzimatik yollarla izole edilen ilk hücreler primer hücre olarak adlandırılır. Bu kategorideki hücrelerin alt kültürleme sayısı (pasaj sayısı) 8-9 arasında sınırlıdır. Bu yüzden metabolik olarak oldukça yavaş hücrelerdir. Bunlara ek olarak doku ya da organdan direkt izolasyon yoluyla elde edildiklerinden dolayı kültür ortamında kontaminasyona oldukça elverişlidirler.

Sekonder hücre hatları ise primer kültürün devamı olarak incelenirken, pasaj sayısı 50-100 arasında değişen sayılara kadar yükselebilir. Devamlı hücre hatları sonsuz bölünme kabiliyetine sahip hücre hatlarıdır. Sekonder hücre hatları çoğunlukla fibroblastoid hücre tiplerinden meydana gelirken, tümör dokusundan

veyahut kanserli dokulardan elde edilen hücre tipleri devamlı hücre hattı için en belirgin örneklerdir [134].

Günümüzde in vitro çalışmalarda en çok tercih edilen hücre hatlarından biri olan HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) ana suşun 5. alt kültür üretiminden oluşturulmuştur. Çalışmada hücre canlılığı ve yapışma testleri için HUVEC hücre hattı (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC) ile incelenmiştir.

3.2.4.1 H□crelerin Canlandırılması

Donmuş halde -80°C'de muhafaza edilen hücreler cryo tüpler içerisinde saklanmaktadır. Çalışılacak hücre hattı -80°C'den alındıktan sonra hızlı bir şekilde çözdürülmüştür. Çözünen hücreler temiz bir falkon tüpe alındıktan sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santifüjün sonlanması ile elde edilen pellet istenilen hücre hattının göstergesi olup besi yeri ile çözdürülmüştür. İyice pipetaj sonrası çözünen hücre, hücre flasklarında 37°C ve %5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. HUVEC hücre hattı yapışan hücre hattı olduğundan hücrelerin yapışma durumu ve yoğunlukları inverted mikroskop ile takip edilmiştir. Yoğunlukları %80-90 ulaşan hücrelere pasajlama işlemi uygulanmıştır.

3.2.4.2 H□crelerin Pasajlanması

Pasajlama işlemi; hücrelerin bulundukları flasktan başka temiz bir flaska zarar görmeden transfer edilme işlemine denir. Yoğunlukları inverted mikroskop ile incelenen hücreler %80-90 konfluent duruma geçtiklerinde pasajlama işlemi uygulanır. HUVEC hücre hattı yapışan hücre hattı olduğundan pasajlama işleminin gerçekleştirilmesi için öncelikle bulundukları yüzeyden tripsinizayon ile kaldırılmaları gerekmektedir. İlk olarak besi yeri ile dolu olan flask boşaltılmış ve 1X Tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda hücrelerin bulundukları yüzeyden ayrılıp yüzer pozisyona geçmesi gerektiğini inverted mikroskop ile kontrol ederek teyit edilmiştir. Daha sonrasında tripsin içeren yüzeyden ayrılan hücrelerin enzimden zarar görmemesi için inaktive edilmesi gerekmektedir. İnaktivasyon tripsin miktarının minimum iki katı kadar besi yeri ekleyerek yıkama işlemi ile yapılır bu işleme detripsinizayon denir. Yıkama sonrası hücreler temiz falkon tüpe alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen pellet taze besi yeri ile nazikçe

çözdürüldükten sonra yeni hücre kültür flasklarına aktarılmıştır. Pasajlama işlemi hücrelerin %80-90 konfluent olduklarında tekrar edilmiştir. Hücrelerin çoğalma kapasitesi ise her gün inverted mikroskop ile takip edilmiştir.

3.2.4.3 H□crelerin Sayılması ve Canlılık Kontrol□

Sunulan tez çalışmasında yapılacak olan hücre adezyon ve sitotoksite çalışmaları için öncelikle hücrelerin sayılması gerekmektedir. Tripan mavi boyası kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirilir. Tripan mavisi uygulan hücreler inverted mikroskop altında incelenir ve canlı hücreler parlak ve beyaz görünürken ölü hücre hatları mat ve mavi görünmektedir. Hücre sayımı için yapışan hücre hattı tripsin ile kaldırılmış ve besi yeri ile inaktivasyonu sonrası santrifüje atılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen pellet taze besi ile çözdürülmüş ve pipetaj yapılmıştır. Daha sonrasında 10 µL hücre süspansiyonu, 10 µL tripan mavisi alınarak iyice pipetaj yapılmıştır. Thoma lamına yerleştirilmek ve sayılmak üzere hücre-tripan mavisi karışımından 10 µL alınmıştır. Hücre sayımı 16 eşit kareden oluşan Thoma lamının 4 bölgesinin sayılıp ortalamasının alınması ile hesaplanmıştır. Hücre sayımı 3.3 eşitliği ile bulunmuştur.

$$\text{Canlı Hücre Sayısı} = \text{Thoma lamında sayılan hücre sayısının ortalaması} * \text{Dilüsyon faktörü} * \text{Toplam hacim} * 10^4 \quad (3.3)$$

3.2.4.4 H□crelerin Dondurulması

Pasaj işlemi ertesi çoğalan hücreler ihtiyaç halinde tekrardan kullanılmak üzere dondurulur. Bu işlem dondurma işlemi veya kriyopreservasyon olarak adlandırılır. HUVEC hücreleri hücre pasajlanması protokolünde belirtildiği üzere santrifüj edilmiş ardından 1 mL (%90 FBS, %10 DMSO) dondurma solüsyonunda çözdürülmüştür. Dondurulması için cryo tüplere aktarılan hücreler -80°C'de muhafaza edilmeye alınmadan -20°C'de 30 dakika muhafaza edilmiştir. Çünkü çok ani ısı değişime uğrayan hücreler strese girebilmenin yanı sıra mekanik parçalanmaya da uğrayabilirler. Bu sebepten kademeli soğutma işlemin önemi çalışmada dikkate alınmıştır. -80°C'ye transfer edilen hücreler bir sonraki çalışmaya kadar burada muhafaza edilmiştir.

3.2.4.5 3B'lu Basılan Vasküler Greftin Sitotoksisite Çalışmaları

Sitotoksisite çalışmaları ile herhangi bir malzemenin in vitro ortamda test edilmeden önce hücre hatlarından toksik bir etki gösterip göstermediğini anlamak için tercih edilmektedir. Genellikle tercih edilen sitotiksisite testleri; MTT, XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H- tetrazolyum-5-karboksanilide), INT (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5- feniltetrazolyum klorit) ve Nötral red (3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorür) ile gerçekleştirilmektedir. Testler arasında günümüzde en çok tercih edilen ISO (10993.5) standarları içinde bulunan MTT sitotoksisite testleridir. Özellikle yapısal olarak suda çözünür bir tetrazolyum tuzudur [135]. MTT boyası hücrelerin içindeki mitokondri sukinat dehidrojenaz enzimi ile tetrazolyum halkasının ayrılmasıyla mor formazan kristellerinin oluşmasına neden olur. Bu formazan kristelleri hücre zarı içinden geçemeyecek büyüklükte olup sağlıklı hücrelerde birikmeye neden olur. Biriken formazan ürünleri uygun solvent seçimiyle (DMSO gibi) çözdürüldükten sonra ELISA okuyucu vasıtası ile optik yoğunlukla konsantrasyonu hesaplanır [136].

Çalışmada kullanılan hücre hattı (HUVEC) Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) besi yeri, 5% Fetal sığır serumu (FBS, Gibco) ile kültürlenmiştir. Ayrıca endothelial cell growth factor (ECGF) ve bu faktörü içeren endotel hücre büyüme ilavesi (endothelial cell growth supplement; ECGS) eklenerek hücre hattının büyümesi teşvik edilmiştir. 37°C ve %5 CO_2 ile nemlendirilmiş hava inkübatörü ile ortam şatları sağlanmıştır. Hücreler çoğalması %80-90 kapasiteye ulaştığında PBS ile yıkanmış ve her pasaj için 1XTripsin-EDTA ile tripsinize edilmiştir. İn vitro sitotoksisiteyi belirlemek için MTT testi kullanılmıştır ve çalışmalar aseptik ortamda gerçekleştirilmiştir. Analiz için HUVEC hücreleri 96 kuyucuklu kültür plakasına $1x10^5$ hücre/ kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Plaka 37°C ve %5 CO_2 koşullarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 1,5 saat UV ışığı altında sterilasyonu gerçekleştirilmiş $2cm^2X2cm^2$ boyutunda kesilmiş vasküler greft örneği 6 tekrarlı olarak eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak fenol ve negatif kontrol olarak RPMI besiyeri kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plaka 37°C ve %5 CO_2 inkübasyon koşullarında tekrar 24 saat inkübe edilmiştir ve inkübasyon sonrasında tüm kuyuculardaki besi yeri uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa steril PBS ile 1/10 oranında dilüe edilen 100 µL

MTT çözeltisi (5 mg/mL) eklenerek 4 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. 4. saatin sonunda MTT solüsyonu kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır ve MTT boyası sonucunda oluşan mor formazan kristellerinin çözülmesi için 100 µL DMSO eklenmiştir. Sitotoksik etkinin ölçülmesi için ELISA okuyucuda 570 nm absorbans değerinde optik ölçüm alınarak hüclerin canlılığı değerlendirilmiştir. Değerlendirme uygulanırken, negatif kontrolü %100 hücre canlılığı olarak kabul edilerek, 3B'lu basılan vasküler greftin sitotoksisite değeri hesaplanmıştır.

3.2.4.6 3B'lu Basılan Vask□ler Greftin H□cre Adezyon Kapasitesinin Belirlenmesi

Hücre adezyon çalışmaları vasküler greftin hücre yapışma kapasitesinin hesaplanması ve greftin üzerindeki proliferasyonunun gösterilmesi için uygulanmaktadır. Çalışmada HUVEC hücre hattında 3B baskılı vasküler greftin hücre adezyon kapasitesi 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. 3B baskılı vasküler greft örnekleri disk formlarına kesilmiştir ve %96 etanol ve UV radyasyonu ile sterilize edildikten sonra kuyucuklara yerleştirilmiştir. Gece boyunca inkübasyondan sonra her kuyucuk 4 saat süreyle inkübe edilmiş 100 μl MTT boyası (5 mg/mL PBS içerinde çözdürülmüş) ile işleme tabi tutulmuştur. 4. saatin sonunda MTT çözeltisi boşaltılmış ve formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 100 μl DMSO çözeltisi ilave edilmiştir. Optik yoğunluk, 570 nm'de ELISA okuyucu tarafından belirlenmiştir. MTT analizi altı tekrarlı (n: 6) gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, kontrole yönelik hücre adezyon kapasitesi olarak sunulmuştur (hayatta kalmanın %100'ü). 3B'lu baskılı aortun yapışma ve proliferasyon kapasitesi 1, 3 ve 5 gün sonun da incelenerek belirlenmiştir. İnceleme inverted mikroskobu kullanılarak yapılmıştır.

3.2.4.7 3B'lu Basılan Vask□ler Greftin Histokimyasal Analizi ve Floresan Mikroskobu ile G□r□nt□lenmesi

Hücre adezyonu sağlanan vasküler greft örneklerinin hücre yapışma kapasitesi ayrıca DAPI, H&E ve Rodamin Phalloidin boyaları kullanılarak gösterilmiştir. Vasküler greft örnekleri ilk olarak $2cm^2X2cm^2$ olacak şekilde kesilmiştir ve %96 etanol ve UV radyasyonu ile sterilize edildikten sonra kuyucuklara yerleştirilmiştir. Hücre ekimi 10^5 hücre/kuyucuk olarak 96 kuyucuklu plakalara yapılmıştır. 37°C

ve %5 CO_2 koşullarında gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Boyama çalışmaları için örnekler öncelikle hücre besi yeri kuyucuklardan boşaltılmıştır. Kalıntıları gidermek için iki kez PBS içinde yıkanmıştır. Ardından vasküler greft örnekleri fixasyon için %3.7 formaldehit (Sigma-Aldrich) ile kaplanmıştır ve 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler PBS'ye ile yıkanmıştır ve analize kadar PBS içinde saklanmıştır. Hücrelerin malzemeye fixasyonun ardından boyama için hazırlanması için, örneklere %0.1 TritonX100 (Sigma-Aldrich) eklenmiştir ve +4°C'de 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, numuneler iki kez PBS ile yıkanmıştır. PBS (5 μg/ml) içinde çözdüler DAPI boyası, 30 dakika boyunca numunelerin üstünü kaplayacak şekilde eklenmiştir. Çalışmada DAPI boyası; hücre çekirdeklerini boyamak için kullanılmıştır. Numuneler PBS içinde durulanmış ve görselleştirilene kadar PBS içinde saklanmıştır. Analiz için bir faz kontrast mikroskobu (Leica Digital Microscopes Inverted) kullanılmıştır.

Aynı zaman da vasküler greft örnekleri histokimyasal boyamayla da incelenmiştir. Örnekler 24 saat süreyle %4 nötr tamponlu formalin içinde sabitlenmiştir. Daha sonra, örnekler bir dizi dereceli alkol içinde dehidre edilmiştir ve parafin bloklarına gömülmüştür. Örnekler boyamaya hazırlanması için 6 μm kalınlıkta kesilmiş ve hematoksin ve eozin (H&E) ile boyanmıştır. Görüntüler bir floresan mikroskobu (LEICA DMi8, Leica Microsystems GmBH, Almanya) ile elde edilmiştir.

3.2.4.8 Antioksidan Kapasite □alışmaları

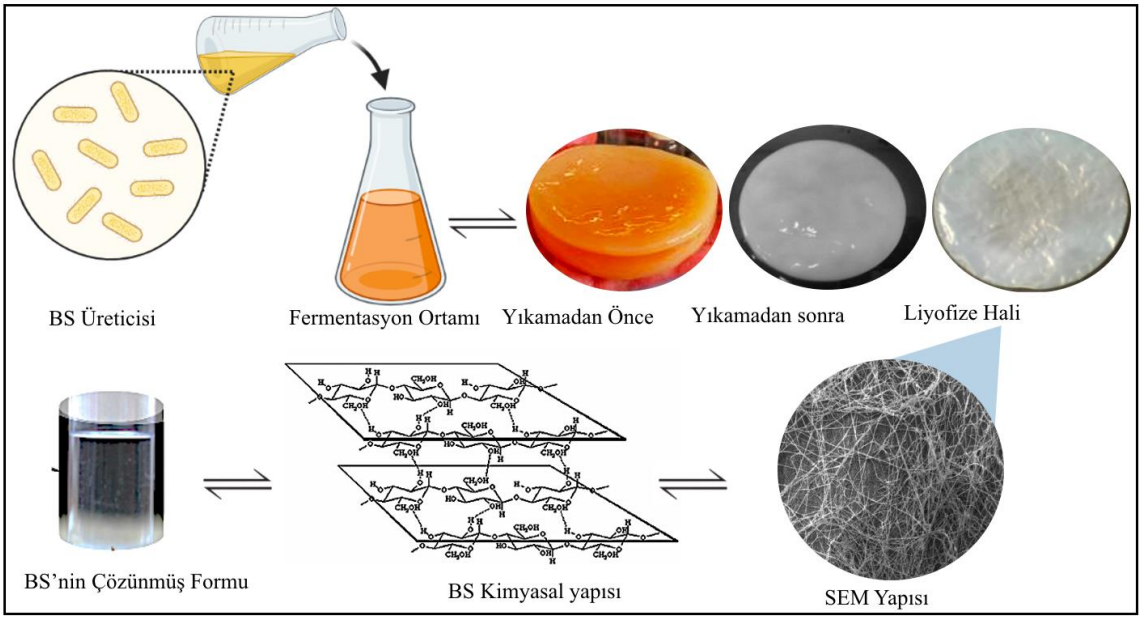
Antioksidant kapasite çalışması HUVEC hücre hattı kullanırak belirlenirken HUVEC hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin içeren RPMI besi yerinde; 37 °C'de, %5 CO_2 atmosferinde kültüre edilmiştir. İnkübe edilen HUVEC hücre hattı 24 kuyulu plakaya 10^6 hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat hücreler inkübasyona bırakılmıştır. 10x5 mm olacak şekilde kasilen vasküler greft örnekleri HUVEC hücrelerinin ekili olduğu kuyulara konularak 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübe edilen vasküler greft örnekleri -80 °C'de 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda hücreler 5000 RPM'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Strese uğratılmış HUVEC hücreleri TAS (Rel assay, Total Antioxidant Status Kit) kiti vasküler greftin antioksidant performansı firmanın önerdiği metod ile hesaplanmıştır.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 BS Temelli Biyom□rekkep Hazırlanması

BS üretimi bir polimerazsyon reaksiyonudur. Polimerizasyon, tek, doğrusal β-1,4-glukan zincirleri halinde meydana gelmektedir ve sonunda bakteriyel selüloz, dış zarlarında bulunan doğrusal gözenek dizisi olan hücrelerin dışına doğru salgılanmaktadır. BS'nin ilk yapısı, malzemenin toplam hacminin %90'ını oluşturan amorf bölgeler arasına serpiştirilmiş paralel biçimde dizilmiş 10-15 yeni oluşmuş β-1,4-glukan zincirlerinden oluşan alt fibriller olarak oluşturulur. Daha sonra mikrofibril yapı elde edilir ve son olarak, yaklaşık 1000 ayrı glukan zincirini içeren mikrofibril demetlerinin gevşek bir şekilde sarılmış şerit yapısı oluşturulur. Sonuç olarak doğal biyopolimer olan BS, nano ölçekte organize olmuş bir fibril yapısıdır. BS'nin bu nanolif morfolojisi yapı içinde rastgele dağıtılmıştır. BS'nin hidroksil grupları, yapısını kristal bir modelde stabilize etmek için komşu zincirle hidrojen bağları oluşturma eğilimindedir. Kristallik, olası molekül içi ve moleküller arası bağ ilişkilerinin çok yönlülüğüne dayanır. BS'nin kristal yapısı çözünürlüğünü etkiler. Yarı saydam jel film yapısı, literatürde bildirildiği gibi ıslak durumda 1–1,5 cm ve kuru durumda 20–40 μm kalınlığa sahiptir. Bu nedenle kuru durumdan ıslak duruma 300 kattan fazla yüksek hacim dönüşümü elde edilir ve çözünürlüğünde etkilidir [137]. Bu nedenle, çalışmada BS biyomürekkep haline getirilmesi adına önce 1 gece boyunca 65°C'de liyofize edilerek kurutulmuştur. Liyofize haldeki BS %20'lik çinko sülfat ($ZnSO_4$) çözeltisi içerisinde ağırlıkça 1:20 oranında 2 gün boyunca bir manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Daha sonra BS, 1 saat süreyle %100 güç çıkışına sahip bir sonikatör (Branson Sonifier 250, BRANSON) kullanılarak sonikasyona tabi tutulmuştur ve çözelti 6000 RPM'de 600 saniye santrifüj edilmiştir. Her santrifüj adımından sonra, süpernatant çıkarılmış ve çözünmüş halde BS elde edilmiştir. Daha sonrasında basıma uygun hale getirebilmek için ağırlıkça 1:20 oranında ticari reçine ile karıştırılmış ve 23°C'de 1 saat manyetik karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Yapılan çalışmada BS'nin

kuru formu çözünürlük üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak; yapısal su miktarının çinko-sülfat sulu çözeltilerinde BS'nin çözünmesini etkilediği gösterilmiştir. Çalışmamızda sıcaklık parametresi, BS membranındaki hidrojen bağlarının inorganik bir çözücü içinde kırılmasını sağlayan yardımcı unsurdur. Ek olarak, Zn^{+2}'nin Lewis asitliği zayıf bir hidrojen bağı kırıcısı olarak kullanılır. Şekil 4.1'de BS'nin çözünme aşamaları özetlenmiştir.

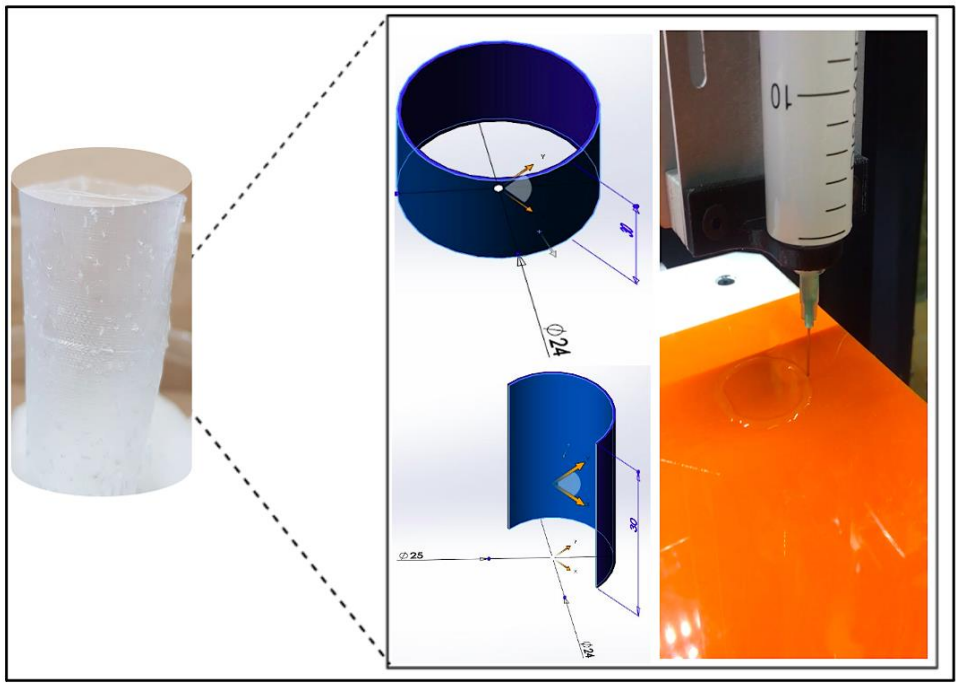


Şekil 4.1 Biyomürekkep formülasyonu için BS'nin çözünmesi

4.2 Vasküler Greftin 3B'lu Basım Stratejisi

Vasküler greftin 3B'lu geometrisi STL formatında modellenmiştir. Vasküler greft bir insan aort paterni olarak tasarlandı ve Şekil 4.2'de gösterildiği gibi STL formata dönüştürülmüştür. Yazılım, içe aktarılan STL dosyasını katmanlara dilimleyerek ve her katman için belirli baskı parametrelerine göre kontur ve dolgu yolları sağlayarak baskı yollarına dönüştürmektedir. 3B'lu baskıdan önce, BS/çinko sülfat ve reçine içeren kompozit biyomürekkep karıştırılarak 37°C'de enjekte edilebilir homojen macun kıvamına getirilmiştir. Elde edilen BS bazlı biyo-mürekkep, her katman için X-Y hedef yolları boyunca basılmış ve her katman tamamlandıktan sonra, baskı aşaması Z yönüne çevrilmiştir. Yüksek güçlü lazer, her katmanı olağanüstü ayrıntılarla oluşturan özel galvanometreler tarafından yönlendirmiştir. Kayan bir mekanizması ve bir silecek optik pencere boyunca kayarken parçayı baskı yatağından nazikçe oluşmasını sağlamaktadır. Duyarlı bir ısıtma sistemi,

biyomürekkebi sabit bir sıcaklığa (80°C) kadar ısıtmaktadır. Deneyimizde kullanılan standart baskı parametreleri 25 mm genişlik, 30 mm yüksekliği ve kalınlık 1 cm idi.

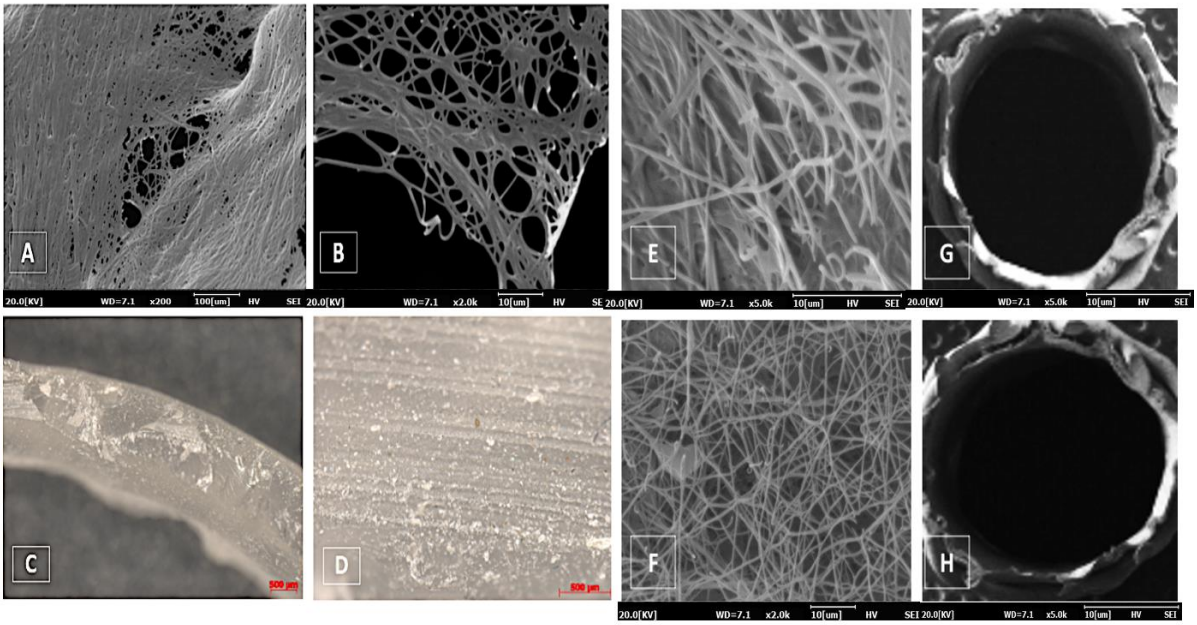


Şekil 4.2 BS tabanlı biyomürekkebin 3B'lu tasarım stratejisi

4.3 3B'lu Basılan Vasküler Greftin Karakterizasyonu

4.3.1 Yüzey Morfolojisi

3B'lu baskılı vasküler greft numunesinin 3B'lu nano ağ yapısı, SEM ve bir malzeme mikroskobu ile gözlemlenmiştir. BS'nin liyofilize formu ve vasküler greft 75 saniye boyunca altınla kaplanmış ve numunelerin yüzey morfolojisi SEM cihazı kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi; BS, yüksek kristallik özelliği nedeniyle oldukça gözenekli bir yüzeye sahiptir (A ve B). Özellikle, baskı stratejisinden sonra basılan vasküler greft örneğinde de SEM görüntüleri mikro gözenek boyutunu ve nano yapılaşmanın değişmediğini ortaya koymuştur (E ve F). Enine kesit görüntüsü (G ve H) ile morfoloji daha net gösterilmiştir.



Şekil 4.3 BS'nin 3B nano ağ yapısının SEM mikro fotoğrafları (A ve B), 3B'lu baskılı aortun malzeme mikroskobu yapısı (C ve D) ve 3B'lu baskılı aortun 3B nano ağ yapısının SEM mikro fotoğrafları (E ve F), enine kesit görüntüsü (G ve H)

Çalışmada, BS ile ticari reçinenin kombinasyonunun oldukça organize bir nano morfolojiye sahip mükemmel biyouyumlu yapı ürettiğini gösterdik. Bu nano morfoloji, yüksek su tutma kapasitesi ve 3B'lu vasküler grefte ideal model ECM yapısı sağlamaktadır. Yapılan karakterizasyon analizi ile BS bazlı biyomürekkebin vasküler greft modellerini basmak için uygun yapılaşma sergilediğini gösterdik. Özellikle de BS fibril boyut aralığı 60 ile 100 nm arasındadır. Yaklaşık 100 nm genişliğe sahip nanolifler ise ECM'nin kolajen fibrilleri ile neredeyse benzer yapılaşma gösterdiğinden dolayı hidrojel iskeleler için uygun 3B'lu ortamı sağlamaktadır [90]. Bir biyomateryalin yüzey pürüzlülüğü, hidrofilikliği ve yüzey enerjisi gibi yüzey özellikleri; hücre bağlanması, çoğalması ve farklılaşması için kritiktir [138]. Yüzey pürüzlülüğü hücresel tepkiyi etkiler ve hücre kaderi için kritiktir. Özellikle basımı gerçekleştirilen 3B'u vasküler greftin iskele gözenek yapısının ve bütünlüğünün in vitro hücre hizalaması, proliferasyonu ve canlılığı üzerinde önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir [139]. Literatürdeki çalışmalara göre gözenekli yapılaşma pürüzsüz yüzey morfolojisine sahip 3B'lu yapılara göre daha fazla doku rejenerasyonunu tetiklediğini ortaya koymaktadır [140]. Bu nedenle yapılan çalışma ile BS/çinko sülfat-reçine kompoziti, sahip olduğu hidrojen bağlarından dolayı yüksek ara yüzey yapışma ve etkileşimlere sahiptir.

Ayrıca, baskı stratejisinden sonra, vasküler greft gözenekli nanofibröz yapı, doğal ECM yapısına benzerlik göstermiştir. Literatürde, 3B'lu sistemler doğal gözenekli nanofibröz ECM'yi tam olarak taklit edemeyen gözenekli yapı eksikliği ile tanımlansa da yapılan çalışmadaki sonuçlar bize gözenekli bir 3B iskele içindeki nanofiber yoğunluğunu kontrol etmek için sağlam bir yöntem sunmaktadır[141].

4.3.2 Yüzey Alanı Analizi

0.097 korelasyon katsayısı ile Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizinin sonuçlarına bağlı olarak, Tablo 4.1'de özetlendiği üzere, 3 boyutlu yazdırılan numunenin yüzey alanı 8.290 m^2/g olarak ölçülmüştür. Doğal ECM'nin yüzey alanını ve mekanik mukavemetini taklit eden bir yapı sağlamayı amaçlamıştır.

Tablo 4.1 3B'lu Vasküler Greft Örneğinin BET sonuçları

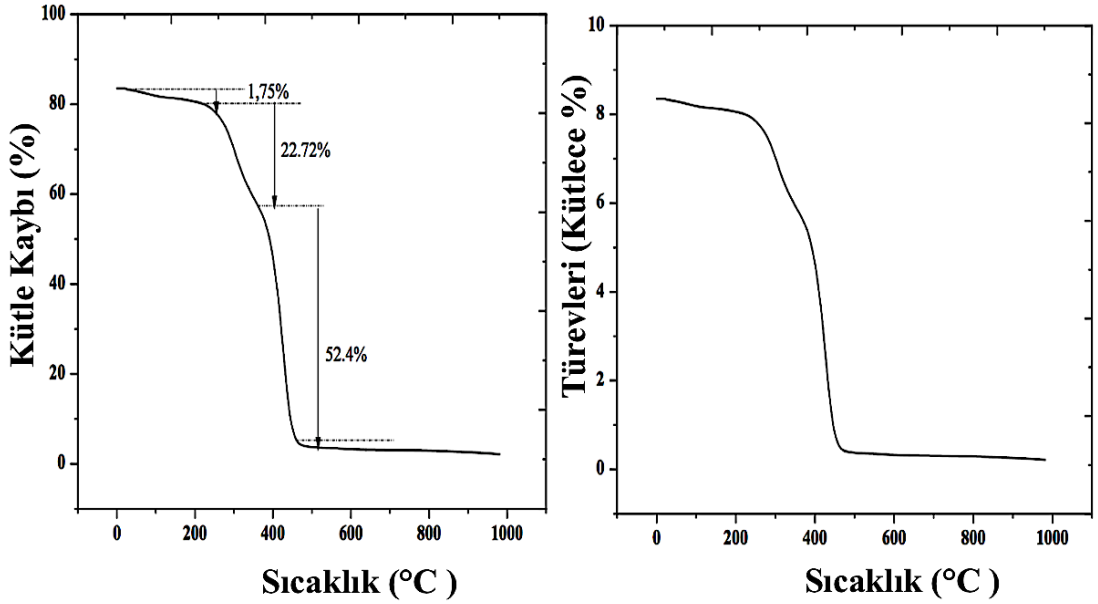
	BET
Eğim	16.570
Güç	4.053e+02
Korelasyon Katsayısı	0.097
C Sabiti	1.041
Yüzey Alanı	8.29 m^2/g

Biyomalzemelerin yüzey morfolojisi her zaman SEM analizi ile yeterli düzeyde analiz edilememektedir. Bu nedenle yüzey analiz parametreleri, 3B'lu baskılı vasküler greftin anatomisi hakkında daha fazla bilgi almak ve SEM sonuçlarını doğrulamak için BET tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. 3B'lu baskılı damar greftinin yüzey alanları porozitelerine göre değişiklik gösterir [142]. Yüzey gözeneklerinin sayısı ve boyutundaki artışlar, yüzey alanının genişlemesine neden olur [143]. Çalışmamızda 3B baskılı vasküler greftin yüzey alanı 8.290 m^2/g olarak bulunmuş olup bu da literatürde örnekleriyle uygun sonuçlar göstermektedir [144].

4.3.3 Termogravimetrik Analiz

TGA, numunenin kütlesinin sıcaklık değişimlerine bağlı olarak zaman içinde hesaplanır. 3B'lu basımı gerçekleştirilen vasküler greftin termal bozunma davranışı termogravimetrik analiz ile hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.4'de

gösterilmiştir. TGA eğrisinin ilk noktasında numunenin kütle kaybı %1,75 olarak hesaplanmıştır. TGA eğrisinin başlangıcındaki %1,75 ağırlık kaybı, malzemenin yüzey suyunun buharlaşması ve dehidrasyonundan kaynaklanmaktadır. 361°C'de kütle kaybı %22,72 ve 421°C'de kütle kaybı %52.4 idi. 800°C boyunca kütle kayıpları azalarak ilerlemiş ve sıcaklık sonunda sabitlenmiştir.



Şekil 4.4 3B'lu baskılı vasküler greftin TG / DTA analizi

TGA analizi ile, çoklu bozunma adımları, ara bozunma ürünlerinin TG eğrisine bağlı olarak belirli sıcaklık aralıklarında stabil olduğunu gösterir. Biyomateryal olarak kullanılması planlanan BS bazlı vasküler greft, sterilizasyon için kullanılan 121°C otoklavlama sıcaklığına dayanıklıdır. Hidrojen bağına bağlı su molekülleri bu ilk aşamada TGA eğrisine göre %1,75 oranında kaybedilebilir. İkinci kütle kaybı, selülozun termal ayrışmasına atanan 200 ila 400°C (361°C) arasında gözlenir [145]. Termal bozunmanın davranışı, liflerin moleküler ağırlığı, kristalliği ve yönelimi gibi bazı yapı parametrelerinden etkilenir [146]. Literatürde, BS için çalışmamızla benzer sonuçlar gösterilmiştir [147].

4.3.4 Dinamik Mekanik Analiz

Çalışmada, 3B'lu baskılı vasküler greft numunesinin mekanik dayanımı Tablo 4.2'de verildiği gibi ölçülmüştür. Numunenin elastisite modülü 172.083 N/mm^2 (standart hata±10,56) hesaplanmıştır. Numunenin kırılmasındaki uzama ise %87.591'dir (standart hata±3,01). Elastisite modülü, stres altında oluşan

deformasyonlar hakkında bilgi sağlar. Bir numunenin çatlamadan şekil değişikliklerine direnme yeteneği ile ilgilidir. Yüksek nihai gerilme mukavemeti ve yüksek uzamanın kombinasyonu, yüksek tokluğa sahip malzemelerin üretilmesine olanak sağlar [148].

Tablo 4.2 3B'lu Baskılı Vasküler Greftin Mekanik Davranışı

	DMA Analizi	
	Kopma Uzaması	Young's Modulüs
	ε_k (%)	E (N/mm^2)
Vasküler Greft	87.591±3.01	172.083±10.564

BS'nin morfolojisi nano ölçekte korunabilirse, daha fazla doku mühendisliği ve rejeneratif tıp çalışmaları, özellikle de 3B'lu doku ve organ yapılarınının elde edilebileceği öngörülmektedir. Bu yüzden özellikle de vasküler yapılar için BS'nin sahip olduğu gerilme mukavemeti ve tokluğu artırılmaya çalışılmıştır. 3B'lu baskılı vasküler greftin optimum mukavemet değerlerinin de in vivo ortamda fayda sağlaması için bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle, hedef doku ya da organın uygulama çalışmaları için baskı stratejilerinde kullanılan biyomalzemelerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi önemlidir. Doğal yumuşak dokular veya organların Young's modülü 0,1 ila 1000 kPa arasında değişmektedir [149]. Doğal dokulara uyacak mekanik özellikler, genellikle de mikro/nanolifler morfolojisi sergilemektedir [150]. BS özellikle yüksek gerilme mukavemeti ve esneklik modülü sağlayan güçlü molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağından kaynaklanan hiyerarşik bir fibril yapısından oluşmaktadır [131]. Çalışmada sunulan BS bazlı vasküler greftin istisnai mekanik özellikleri, geniş yüzey/hacim oranı mikro ve nanofiber morfolojisi ile sağlanmaktadır [151]. Literatürde BS/jelatin kompozitinin 3B'lu baskı stratejisin de Young's modülüsü 1.84±0,13 MPa, saf jelatin iskelesinden yaklaşık 12 kat daha fazla (0,15 ± 0,04 MPa) mekanik davranış sergilediği gösterilmiştir [152]. Başka bir çalışma da ise Young's modülüsün nanoselüloz-aljinat hidrojel yapı iskelesi için %30 gerilimde 70 ila 250 kPa aralığında açıklanmıştır [153].

Ek olarak, BS diğer selülozik malzemelerden ziyade 50 kat daha fazla lif uzunluğu/çapı oranına ve yüksek kristalliğe (>% 80) sahiptir ki bu özellikler, BS'ye uygun mekanik davranış sağlar. Bu çalışmada elastisite modülü 172.083±10.564 N/mm^2 değerleri vasküler greft yapısı için uygun olan mekanik özelliği göstermektedir [154]. Beklendiği gibi, BS bazlı 3B'lu baskılı greft mekanik özelliklerin desteklenmesinde kritik bir rol oynamıştır. Böylece, BS bazlı biyomürekkep formülasyonun gelecekte mekanik özellikler daha da geliştirilebileceğini yapılan çalışma ile ön görmekteyiz.

4.3.5 Fourier D□n□ş□ml□Kızıl□tesi (FTIR) Spektroskopisi

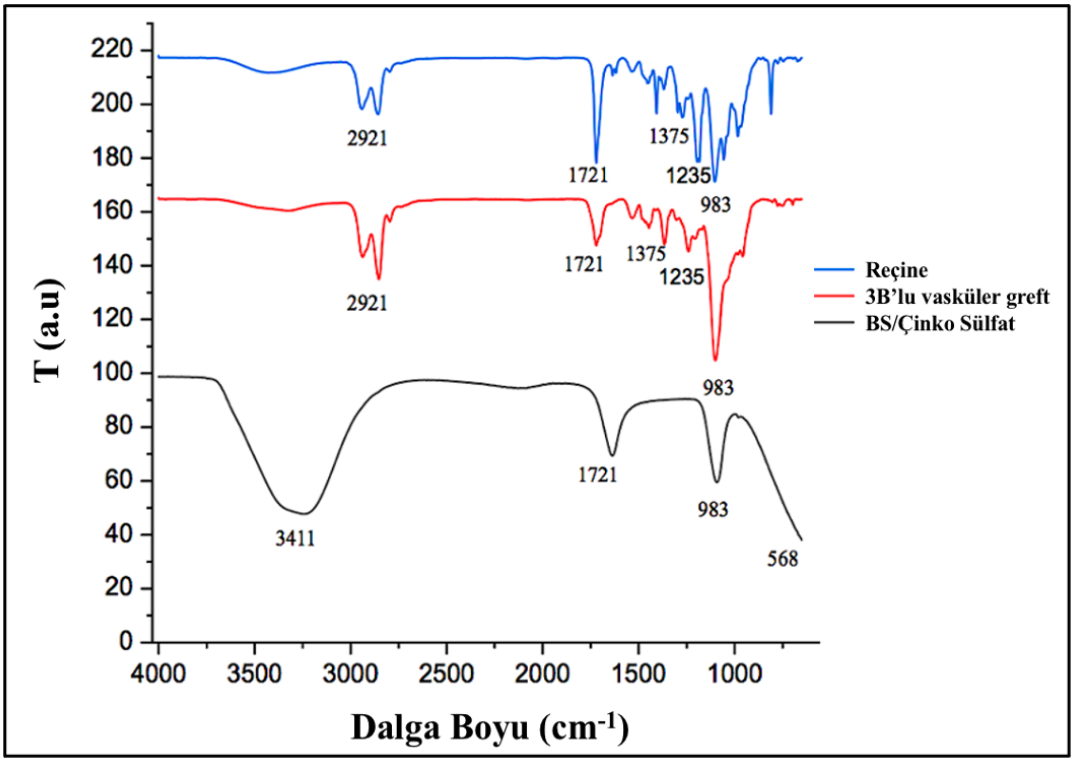
Çalışmada Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), BS/çinko sülfat, reçine ve 3B'lu baskılı vasküler greft bileşenleri arasındaki kimyasal grupların varlığını analiz etmek için kullanılmıştır. FT-IR spektrumu, reçine ve BS'nin karakteristik piklerini göstermektedir. BS'nin çözünür formu, 1740cm^{-1} civarında karakteristik bir FT-IR bandı sergilerken ve oksidasyon derecesinin yükselmesiyle pik tepe yoğunluğu artmaktadır. Bunlar 3411cm^{-1}'de H_2O [155], 2921cm^{-1}'de alifatik CH bağı [156], 1721cm^{-1}'de C=O germe bandı, 1235cm^{-1}'de CH_3 asimetrik büküm bağlanması ve 1375cm^{-1}'de C-O-C gerilme bandını temsil etmektedir [93]. Değerler tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektrumu

Pikler (cm^{-1})	**Kimyasal Bağ**
3411	H_2O
2921	Alifatik C-H gerilme bantı
1721	C=O gerilme bantı
1375	C-O-C gerilme bantı
1235	CH_3 asimetrik büküm bantı

Öte yandan yapılan çalışma ile vasküler greftin kimyasal yapısını anlamak için FT-IR analizlerinden yararlanılmıştır. Spektrum, BS'nin çinko sülfat içinde çözüldüğünde tipik eğrileri göstermektedir. Sonuçlar Şekil 4.5'de özetlenmiştir. BS/çinko-sülfatın FT-IR bandı, BS'nin çözünme aşamasında hiçbir kimyasal

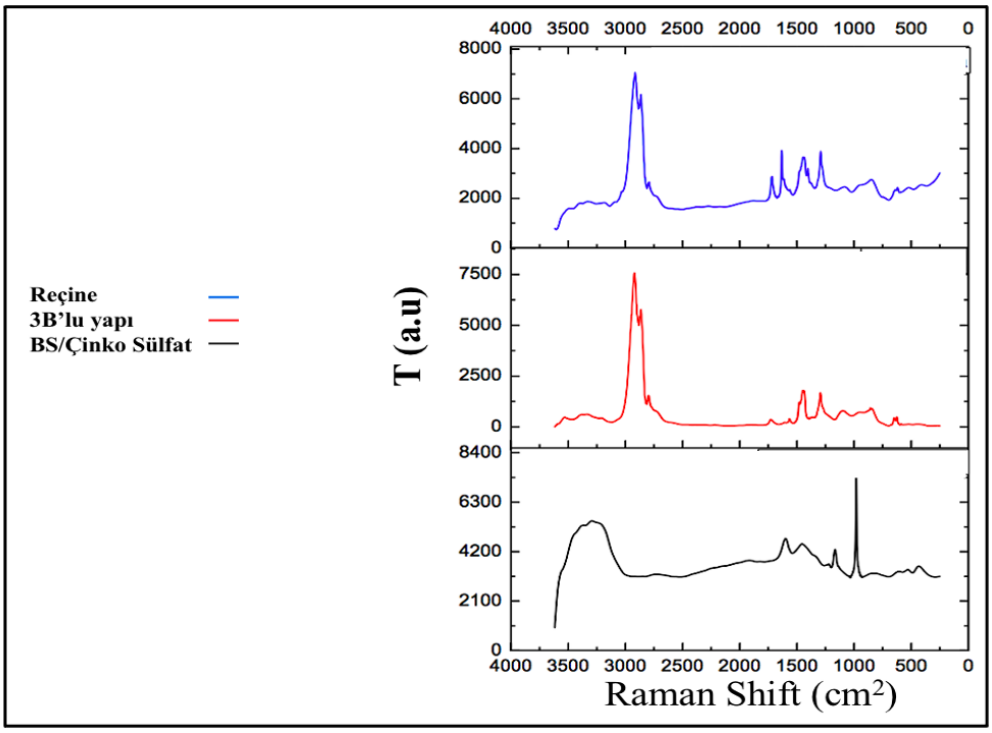
reaksiyonun meydana gelmediğini göstermektedir [2]. BS'nin çinko sülfat içinde çözünmesi sırasında hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler veya hidrojen köprülerinin kombinasyonu da spesifik piklerin elde edilmesini sağlamıştır [157]. Ek olarak, reçine ve BS/çinko sülfat arasında çok sayıda hidrojen bağı da mevcuttu. Literatürde Deniz ve ark. uygun FT-IR sonuçları ile kemik dokusu mühendisliğinde BS bazlı kompozit biyomürekkep formülasyonunu benzer pikler ile tanımlamıştır [155]. Ayrıca Esra ve ark. BS ve PCL kompozit biyomürekkep formülasyonu ile benzer sonuçlar göstermiştir [158].



Şekil 4.5 FT-IR bağ yapısı

4.3.6 Raman Spektroskopisi

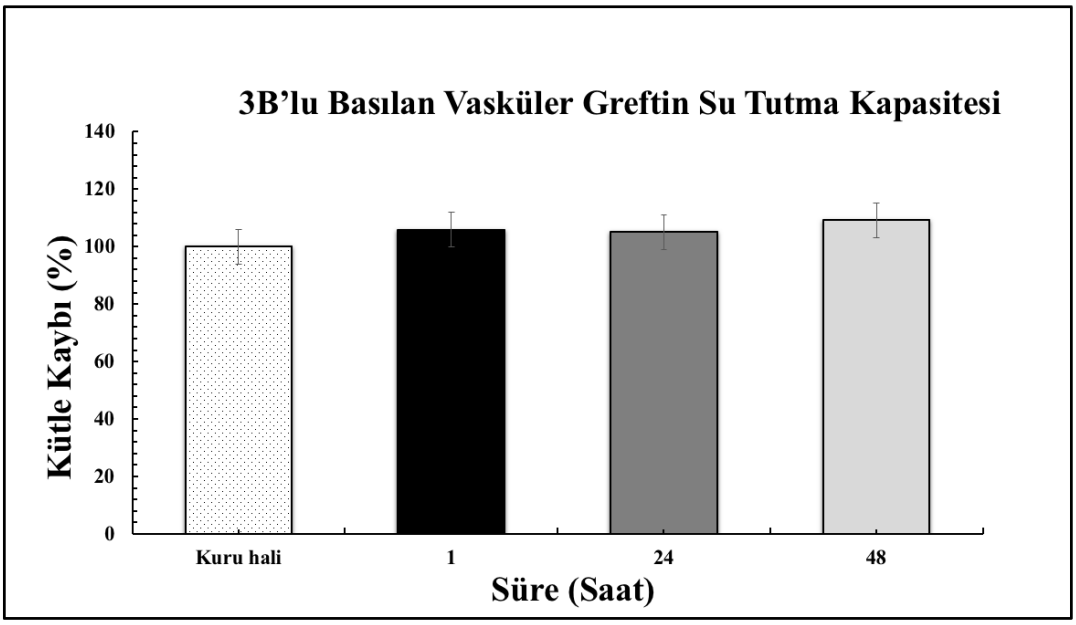
3B'lu basımı gerçekleştirilen vasküler greftin kimyasal yapısı aynı zamanda RAMAN analizi ile de gösterilmiştir. FT-IR spektroskopi sonuçları, Raman spektroskopisi sonuçları ile doğrulanmıştır. Şekil 4.6 ile uygun bağ konfigürasyonu gösterilmiştir. Raman spektroskopisi, çözünmüş BS ve reçinenin harmanlanması sonucunda bağ yapılarında deformasyon ve gerilmelerin meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır.



Şekil 4.6 RAMAN bağ yapısı

4.3.7 Şişme Analizi

3B'lu baskılı vasküler greftin su tutma kapasitesini (WRC) belirlemek için su içerisinde bekletilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Analiz beş tekrarlı olacak şekilde değerlendirilmiştir. Örneklerin kütle kaybı 1, 24 ve 48. saat sonunda hesaplanmıştır. Şişme analizi, 3B'lu yazdırılan numunenin 1. saat sonunda %5 arttığını göstermiştir (standart hata±0,18). Ek olarak, 24 ve 48 saatlik sonunda %9 (standart hata ± 3,34) arttığı hesaplanmıştır.

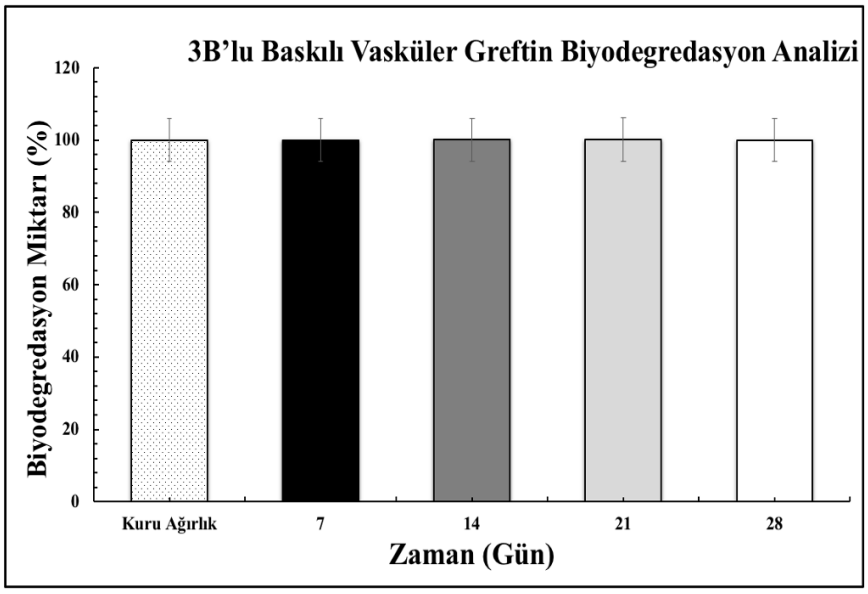


Şekil 4.7 3B'lu basılan vasküler greftin su tutma kapasitesi

Literatürde BS, şişme kabiliyeti yüksek olarak tanımlanan bir hidrojeldir [159]. Ayrıca Karol ve ark. BS'nin bu yüksek verimlilikteki su tutma kapasitesini yaptıkları çalışma ile de desteklemişlerdir [160]. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıptaki çalışmalar ile malzemenin şişme davranışının hücre yapışması, proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde önemli ölçüde etkili olduğu gösterilmiştir [161]. Çalışmada, BS-reçine biyomürekkep formülasyonu iyi gözeneklilik ve fibril morfolojisi göstermiş olup bu da 3B'lu baskılı vasküler greftin şişme özelliğini artırmıştır. Dahası, 3B'lu basılı geometri, doku mühendisliği ve rejenerasyon çalışmalarında hücresel infiltrasyonun yanı sıra yeni dokunun içe büyümesini indükleyebilen hiyerarşik gözenekli yapıyı göstermektedir [151].

4.3.8 Biyodegredasyon Analizi

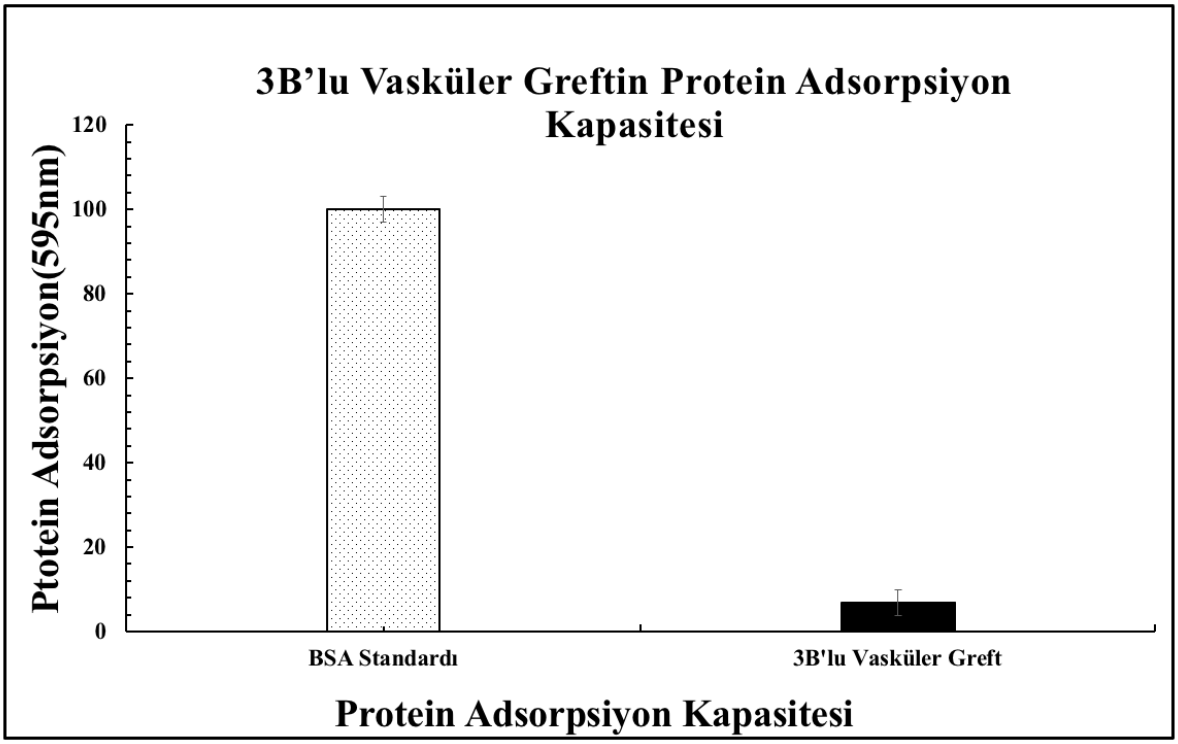
Çalışma da biyodegdedasyon analizi 3B'lu baskılı vasküler greft örneklerinin kütle kaybı ile hesaplanmıştır. Vasküler greft örneklerinin kütle kaybı 28 gün boyunca lizozim enzimini içeren PBS çözeltisi içinde (1.5 µg/ml) belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.8'de verilmiştir. 3B'lu yazdırılmış vasküler greft örneğinde kütle kaybı belirlenmemiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada ticari reçine-BS kompoziti, biyolojik bozunma çalışmalarına dayalı doku yapısı oluşumu için uygun formu sergilemiştir.



Şekil 4.8 3B baskılı vasküler greftin biyodegredasyon analizi

4.3.9 Protein Adsorpsiyon Kapasitesi

3B'lu vasküler greftin protein adsorpsiyon kapasitesi, vasküler yapının iç duvar yapısı üzerinde incelenmiştir. 3B'lu baskılı vasküler greft duvarlarının protein adsorpsiyon kapasitesini hesaplamak için farklı BSA standart konsantrasyonlarının standart eğrisi çizilmiştir. Konsantrasyon eğirişi için %1, %0,5, %0,25, %0,125 ve %0,625 mg/ml olarak farklı konsantrasyonlarda seçilmiştir. Çalışmada BSA standart protein adsorpsiyonu 0,99 mg/mL (standart hata±0,03) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak %100 oranında BSA standardı kullanılmıştır. Bu perspektifte, 3B'lu baskılı aort duvarlarının protein adsorpsiyon kapasitesi %7 (standart hata±0.02) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.9'da tüm veriler özetlenmiştir.



Şekil 4.9 3B'lu vasküler greftin protein adsorpsiyon kapasitesi

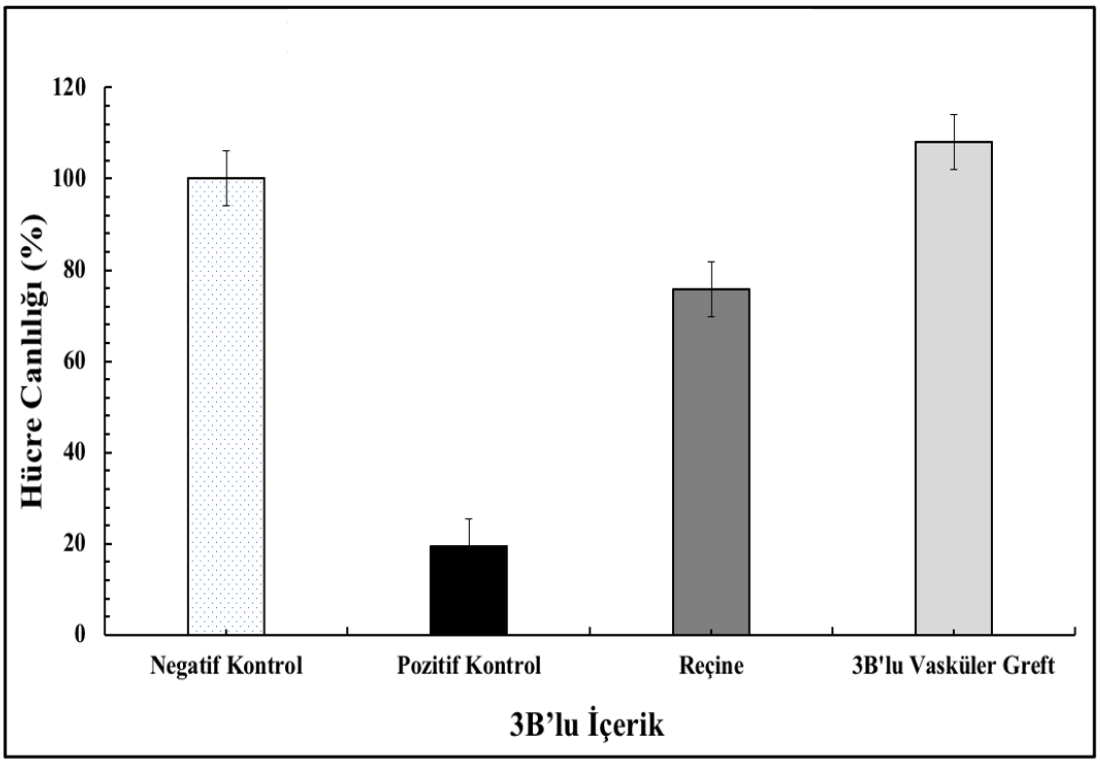
Özellikle protein adsorpsiyon kapasitesi vasküler greftin vücut içindeki tromboz etkisi için önemli bir kriterdir. Proteinlerin 3B'lu baskılı vasküler greft duvarlarından adsorpsiyon kabiliyeti tromboza neden olur. Dünya çapında en yaygın doğum kusurlarından biri doğuştan kalp hastalığıdır (CHD) [162]. CHD tedavisi için, anatomik farklılıklar nedeniyle farklı hastalardan sağlanan kalp nakli başarısızlıkla sonuçlanabilir. Bu nedenle, başarılı CHD tedavisi için implante greftlerin uygun tasarımı ve adaptasyonu sağlanmalıdır [163]. Bununla birlikte, şu anda kullanılan greftler artmış tromboembolik komplikasyon riskinden muzdariptir [164]. Böylelikle bu çalışmada, vasküler greft örneğinin protein adsorpsiyon kapasitesi ile vasküler greft duvarından tromboz engeli en aza indirilmiştir.

4.4 H□cre K□lt□r□□alışmaları

4.4.1 3B'lu Basılan Vask□ler Greftin Sitotoksisite □alışmaları

3B'lu baskı stratejilerinde hücre yapışması ve sitotoksisite çalışmaları malzemenin biyouyumluluk yeteneği için kritik noktalardır. İdeal doku yapısı, hücre yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemelidir. 3B'lu vasküler greftin

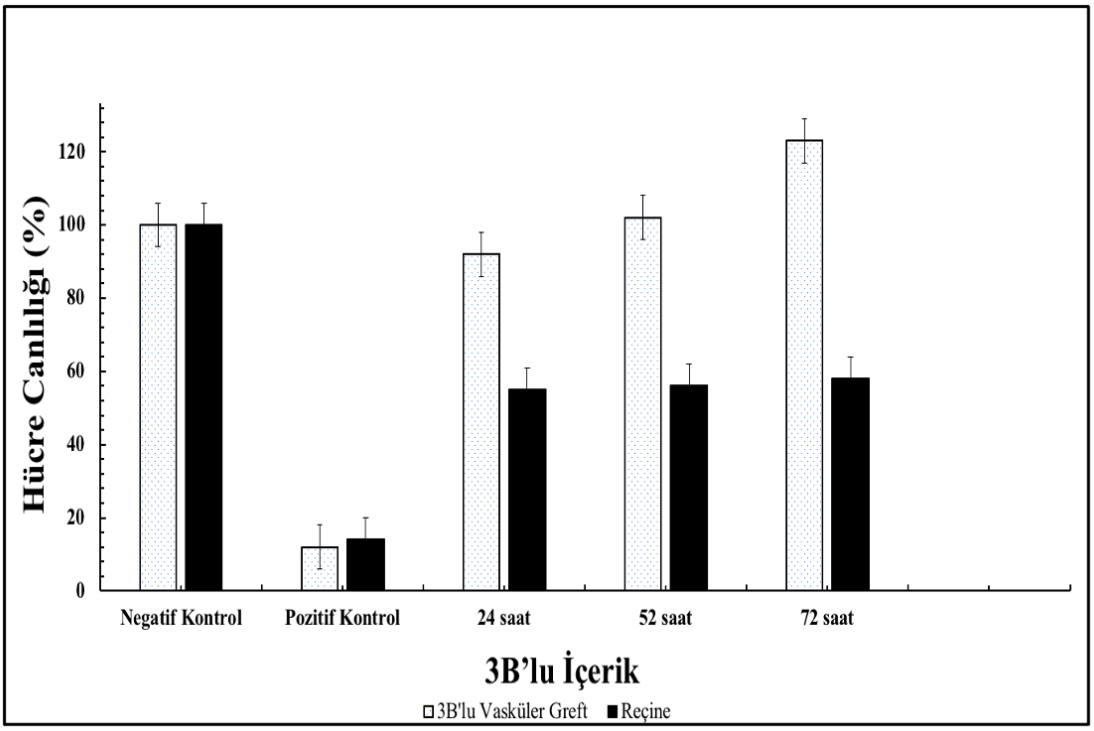
sitotoksisite etkisi ve hücre yapışma kapasitesi bu çalışma da değerlendirilmiştir. Mitokondriyal aktivite testi (MTT), Şekil 4.10'da gösterildiği gibi HUVEC kullanılarak test edilmiştir. Hücre canlılığının sonuçları, kontrol gruplarının yüzdesi olarak ifade edilmiştir (negatif kontrol: sadece besi yeri, pozitif kontrol: fenol). Sadece 3B'lu basılmış olan reçine bazlı biyomürekkebin hücre canlılığı %75,84 (standart hata±3,53) iken BS-reçine biyomürekkebi ile 3B'lu baskılı vasküler greftin %108,64 (standart hata±4,53) olarak hesaplanmıştır. Negatif kontrolün hücre canlılığı %100 (standart hata±0,3) varsayılmıştır. Böylelikle, BS/çinko sülfat ve reçine bazlı biyomürekkep ile basılan 3B'lu vasküler greftin MTT analizine göre hücrelerin yaşama kapasitesini yalnızca reçine ile basılmış olan 3B'lu yapıdan daha fazla desteklediğini göstermiştir. Hesaplanan sitotoksitite çalışmalarına göre; 3B'lu baskılı vasküler greft, ISO 10993:5 standart düzenlemelerine göre toksik olmayan ve sito-uyumlu olarak kabul edilmektedir [165]. Sonuçlara göre BS-reçine bazlı biyommürekkep ile basılan 3B'lu vasküler greft kontrol grubuna göre %44 daha fazla canlılığı desteklerken, reçine bazlı 3B'lu yapıyla karşılaştırıldığında %70 daha fazla canlılığı sağlamıştır.



Şekil 4.10 3B'lu baskılı vasküler greftin HUVEC hücre hattı üzerinde in vitro sitotoksisiteleri

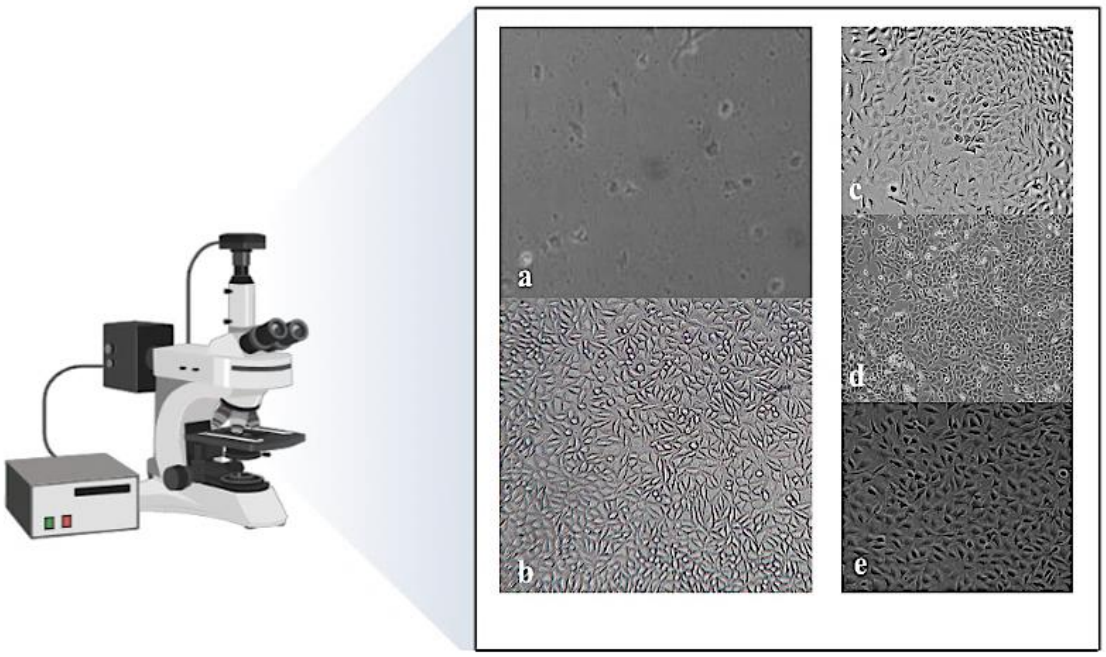
4.4.2 3B'lu Basılan Vasküler Greftin Hücre Adezyon Çalışmaları

HUVEC hücre hattı, hücre yapışma ve proliferasyon oranlarını belirlemek için 96 kuyucuklu plakalarda 3B'lu baskılı vasküler greft üzerinde 10^5 hücre/1 cm olarak tohumlanmıştır. Hücrelerin ilk adezyonu için numuneler 37 °C'de %5 atmosferde 2 saatte inkübe edilmiştir. HUVEC hücre hattının morfolojisi, Şekil 4.12'de gösterildiği gibi 24, 52 ve 72. saatteler de gözlemlenmiştir. Hücre adezyon kapasitesi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır (negatif kontrol: sadece besi yeri, pozitif kontrol: fenol). HUVEC hücre hattının adezyon kapasitesi sayısı analiz günü ilerledikçe önemli ölçüde artmıştır. MTT sonuçlarına göre 3B'lu baskılı vasküler greftin hücre yapışması 24 saatte sonunda %92,02 (standart hata±1,3), 52 saatte sonunda %102,01 (standart hata±2,4), 74 saat sonunda %123,02 olarak hesaplanmıştır. Başka bir açıdan ise sadece 3B'lu baskılı reçine içeriği 24 saatte sonunda %55,02 (standart hata±1,3), 48 saat sonunda %56 (standart hata±2,1) ve 72 saat sonunda %58,04 (standart hata±1,8) olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak BS bazlı biyomürekkep formülasyonunun sadece reçine ile basılmış 3B'lu yapılara nazaran hücre adezyonunu desteklediğini göstermiş olduk. Şekil 4.11'de sonuçlar özetlenmiştir.



Şekil 4.11 3B'lu vasküler greftin 1., 3. ve 5. gün sonundaki hücre tutunma kapasiteleri

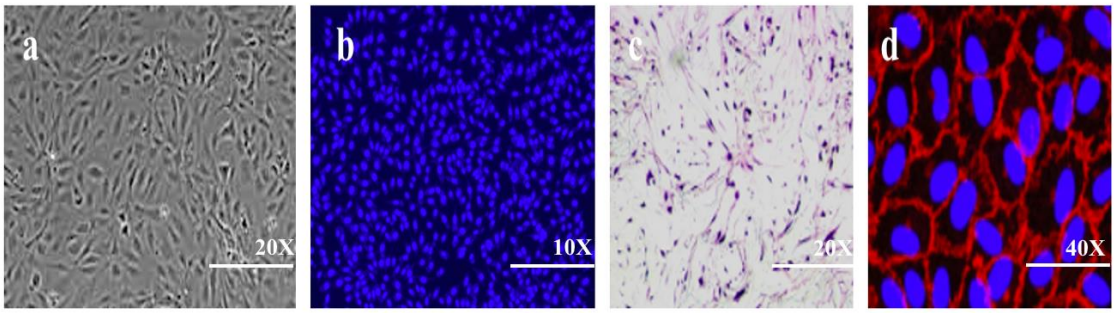
Çalışmada 3B'lu yapı iskeletlerinin biyouyumluluğu, hücre proliferasyonu ve morfolojisi üzerinde değerlendirilmiştir. 24 saatlik kültürden sonra hücreler, mikrofiber vasküler greft yönünde yayılmaya ve uzamaya başlamıştır. 48 saat sonra, çoğalan hücreler sadece 3B'lu baskılı bir vasküler greftin tüm yüzeyini kaplamakla kalmamış, lifler arasındaki gözeneklere de yapışma sağladığı gözlemlenmiştir. 72 saatin sonunda, kültürlenmiş hücrelerin adezyonu artış göstermiştir ve vasküler greft kompozit iskele numunesi üzerinde kümeler oluşturmaya başlamıştır. Fernanda ve arkadaşlarının çalışmasında BS yüzeyinin hücre-nanofiber etkileşimi ile hücre davranışını (adezyon, proliferasyon, ikincil nekroz) etkilediğini göstermiştir [166]. Bu bağlamda yapılan çalışmada 3B'lu baskılı vasküler greft örneğinin adezyon kapasitesi sonuçları ile BS-reçine kompozit yapısının hücre yapışmasını arttırdığını ortaya koymuştur. 72 saatin sonunda, Şekil 4.12'de gösterildiği gibi inverted mikroskobu ile teyit edilen ideal yapıya sahip bir 3B'lu vasküler greft örneği elde edilmiştir. Literatürde benzer sonuçlar örneklenmiştir [152]. Gözlemlenen yüksek düzeyde hücre yapışması ve yaşayabilirliği, BS bazlı biyomürekkep ile 3B'lu baskı yönteminin hücre sağlığı için zararlı olmadığını ve iskelelerdeki hücrelerin canlılığını artırabileceğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.12 a-pozitif kontrol, b-negatif kontrol, c-24 saat sonunda hücre adezyonu, d-52 saat sonunda hücre adezyonu, e-72 saat sonunda hücre adezyonu

4.4.3 3B'lu Vasküler Greftin Histokimyasal Analizi ve Floresan Mikroskobu ile G□r□nt□lenmesi

3B'lu baskılı vasküler greft örneğinin 72 saatin sonunda sahip olduğu hücre adezyon kapasitesi ayrıca DAPI ve H&E boyama ile de doğrulanmıştır. DAPI, hücre çekirdeklerini boyayabilen bir boya çeşididir. Öte yandan, protein adsorpsiyon kapasitesi analizi ile, proteinlerin vasküler grefte önemli bir şekilde bağlanmadığını gösterdik. Sonuçlar, Şekil 4.13'de gösterildiği gibi H&E boyamayla da doğrulandı.



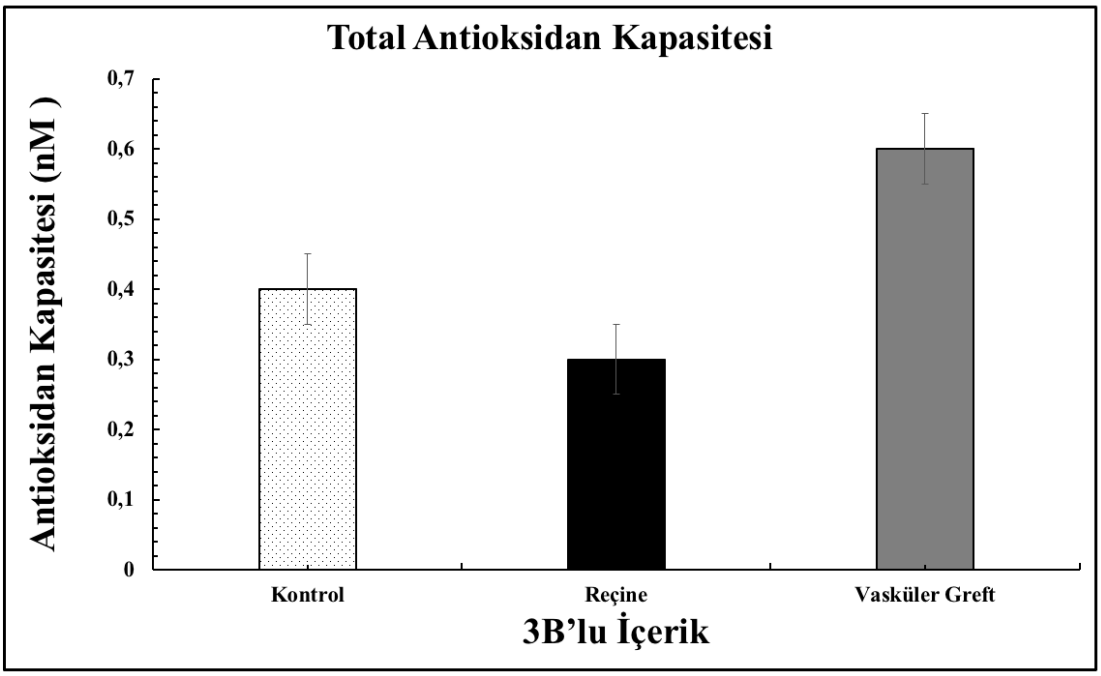
Şekil 4.13 a) 72 saat sonra hücre bağlanmasının inverted mikroskop ile görüntüsü b) DAPI boyama ve c) H&E boyama d) Rodamin Phalloidin ve DAPI boyama

3B'lu baskılı vasküler greftin hücre adezyon kapasitesi, BS-reçine kompozit yapısının hücre yapışmasını arttırdığını ortaya koymuştur. 72 saatin sonunda, inverted mikroskobu, DAPI ve ayrıca H&E boyama ile teyit edilen ideal yapıya sahip bir 3B'lu vasküler greft örneği elde edilmiştir. Literatürde aynı sonuçlar örneklenmiştir [152]. Gözlemlenen yüksek düzeyde hücre yapışması ve yaşanabilirliği, BS tabanlı biyomürekkep ile 3B'lu baskı yönteminin hücre sağlığı için zararlı olmadığını ve iskelelerdeki hücrelerin canlılığını artırabileceğini doğrulamış olduk.

4.4.4 Antioksidan Kapasite □alışmaları

10^6 hücre/ mL olacak şekilde 24 kuyulu plakaya ekilen HUVEC hücre hattı, stres modelinde antioksidant performansı belirlenmesi için kullanılmıştır ve 24 saat inkübe edilmiştir. 10x5 mm olacak şekilde hazırlanan vasküler greft örnkeleri HUVEC hücrelerinin ekili olduğu kuyulara konularak 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, vasküler greft örnekleri -80°C'de 1 saat

bekletilmiştir. 1 saatin sonunda vasatlar toplanarak 5000 RPM'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Strese uğratılmış HUVEC hücreleri TAS kiti kiti kullanarak vasküler greft örnkelerinde antioksidant performansı firmanın önerdiği metod ile hesaplamalar yapılmıştır. Hesaplama yapılırken yalnızca reçine örneği ile BS-reçine ile basılmış vasküler greft örnekleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.14'te sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 4.14 3B'lu basımı gerçekleştirilen vasküler greftlerin HUVEC hücre hattı üzerinde Total Antioksidan Kapasitelerinin değerlendirilmesi

3B'lu basımı gerçekleştirilen vasküler grefler üzerinde total antioksidan seviyesi ölçülmüştür. Kontrol grubuna göre kıyaslanan vasküler greft örnekleri istatistiksel açıdan anlamlı olmayan artış göstermiştir ($P>0.05$). Bununla birlikte BS-reçine bazlı biyomürekkep ile basımı gerçekleştirilen vasküler greft örnekleri ile kontrol grubu arasında total antioksidan seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir ($P<0.05$). Ayrıca BS-reçine ile basılmış vasküler greft örneği yalnızca reçine bazlı vasküler greft örneğine göre total antioksidan seviyesinde istatiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür($P<0.05$).

[1] K. Qiu *et al.*, "3D Printed Organ Models with Physical Properties of Tissue and Integrated Sensors," *Adv. Mater. Technol.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–9, 2018.

[2] N. T. Laçin, "Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014.

[3] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, and J. E. Ramirez-Vick, "Scaffold design for bone regeneration," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 15–56, 2014.

[4] A. Bruce, D. Castle, C. Gibbs, J. Tait, and C. B. A. Whitelaw, "Novel GM animal technologies and their governance," *Transgenic Research*. 2013.

[5] P. Bucher, P. Morel, and L. H. Bühler, "Xenotransplantation: An update on recent progress and future perspectives," *Transplant International*. 2005.

[6] J. P. Vacanti and R. Langer, "Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation," *Lancet*, vol. 354, no. SUPPL.1, pp. 32–34, 1999.

[7] E. Bell, H. P. Ehrlich, D. J. Buttle, and T. Nakatsuji, "Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness," *Science (80-.).*, 1981.

[8] J. F. Burke, O. V. Yannas, W. C. Quinby, C. C. Bondoc, and W. K. Jung, "Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury," *Ann. Surg.*, vol. 194, no. 4, pp. 413–427, 1981.

[9] V. Bisceglie, "Heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühnerembryonen," *Ztschr f Kerbsforsch*, 1933.

[10] C. W. Patrick, A. G. Mikos, and L. V. McIntire, "Prospectus of Tissue Engineering," in *Frontiers in Tissue Engineering*, 1998.

[11] Y. Ikada, "Challenges in tissue engineering," *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, no. 10, pp. 589–601, 2006.

[12] T. A. Mayhew, G. R. Williams, M. A. Senica, G. Kuniholm, and G. C. Du Moulin, “Validation of a quality assurance program for autologous cultured chondrocyte implantation,” *Tissue Eng.*, vol. 4, no. 3, pp. 325–334, 1998.

[13] J. Yu *et al.*, “Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells,” *Science (80-.).*, 2007.

[14] T. Mitaka, F. Sato, T. Mizuguchi, T. Yokono, and Y. Mochizuki, “Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells,” *Hepatology*, vol. 29, no. 1, pp. 111–125, 1999.

[15] D. Faustman and C. Coe, “Prevention of xenograft rejection by masking donor HLA class I antigens,” *Science (80-.).*, vol. 252, no. 5013, pp. 1700–1702, 1991.

[16] P. Pakzaban, T. W. Deacon, L. H. Burns, J. Dinsmore, and O. Isacson, “A novel mode of immunoprotection of neural xenotransplants: Masking of donor major histocompatibility complex class I enhances transplant survival in the central nervous system,” *Neuroscience*, 1995.

[17] D. W. Hutmacher, “Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - State of the art and future perspectives,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2001.

[18] E. K. Hendow, P. Guhmann, B. Wright, P. Sofokleous, N. Parmar, and R. M. Day, “Biomaterials for hollow organ tissue engineering,” *Fibrogenesis Tissue Repair*, vol. 9, no. 1, p. 3, 2016.

[19] J. A. Hubbell, “Biomaterials in tissue engineering,” *Bio/technology*, vol. 13, no. 6, pp. 565–576, 1995.

[20] D. W. Grainger, “The Williams dictionary of biomaterials,” *Mater. Today*, 1999.

[21] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2004.

[22] J. Black, “The education of the biomaterialist: Report of a survey, 1980–81,” *J. Biomed. Mater. Res.*, 1982.

[23] S. J. Kalita, “Nanostructured biomaterials,” in *Functional Nanostructures*, Springer, 2008, pp. 168–219.

[24] J. D. Bronzino, *Biomedical engineering handbook*, vol. 2. CRC press, 1999.

[25] A. Tathe, M. Ghodke, and A. P. Nikalje, “A brief review: biomaterials and their application,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 19–23, 2010.

[26] B. D. Ratner, “A History of Biomaterials,” *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*. 2013.

[27] E. Crubézy, B. Ludes, J.-D. Poveda, J. Clayton, B. Crouau-Roy, and D. Montagnon, “Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott’s disease of 5400 years old,” *Comptes Rendus l’Académie des Sci. III-Sciences la Vie*, vol. 321, no. 11, pp. 941–951, 1998.

[28] S. Pramanik, A. K. Agarwal, and K. N. Rai, “Chronology of total hip joint replacement and materials development,” *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 19, no. 1, pp. 15–26, 2005.

[29] G. Batista, M. Ibarra, J. Ortiz, and M. Villegas, “Engineering biomechanics of knee replacement,” *Appl. Eng. Mech. Med. GED-University Puerto Rico, Mayagüez*, pp. 1–12, 2004.

[30] H. Suh, “Recent advances in biomaterials,” *Yonsei Med. J.*, vol. 39, no. 2, pp. 87–96, 1998.

[31] G. M. Raghavendra, K. Varaprasad, and T. Jayaramudu, “Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications,” in *Nanotechnology applications for tissue engineering*, Elsevier, 2015, pp. 21–44.

[32] S. Y. Güven, “Ortopedik malzemelerin biyouyumlulukları ve mekanik Özelliklerine göre seçimi,” in *2nd National Design and Manufacturing Congress, Balıkesir*, 2010, pp. 472–484.

[33] D. F. Williams, “On the mechanisms of biocompatibility,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2941–2953, 2008.

[34] F. H. Silver and D. L. Christiansen, “Biomaterials Science and biocompatibility. 1999.” Springer-Verlag, New York.

[35] D. S. Kohane and R. Langer, “Polymeric biomaterials in tissue engineering,” *Pediatr. Res.*, vol. 63, no. 5, pp. 487–491, 2008.

[36] S. M. Ahmadi *et al.*, “Mechanical behavior of regular open-cell porous biomaterials made of diamond lattice unit cells,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 34, pp. 106–115, 2014.

[37] S. Kara, *A roadmap of biomedical engineers and milestones*. BoD–Books on Demand, 2012.

[38] M. Niinomi, “Recent metallic materials for biomedical applications,” *Metall. Mater. Trans. A*, vol. 33, no. 3, p. 477, 2002.

[39] M. Niinomi, “Metallic biomaterials,” *J. Artif. Organs*, vol. 11, no. 3, pp. 105–110, 2008.

[40] M. Vallet-Regí, “Ceramics for medical applications,” *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.*, 2001.

[41] D. R. Jordan, S. M. Munro, S. Brownstein, S. M. Gilberg, and S. Z. Grahovac, “A synthetic hydroxyapatite implant: The so-called counterfeit implant,” *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.*, 1998.

[42] V. P. Orlovskii, V. S. Komlev, and S. M. Barinov, “Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics,” *Inorg. Mater.*, 2002.

[43] R. Bermejo and R. Danzer, “High failure resistance layered ceramics using crack bifurcation and interface delamination as reinforcement mechanisms,” *Eng. Fract. Mech.*, 2010.

[44] A. Iftekhar, “Biomedical composites,” *Stand. Handb. Biomed. Eng. Des. McGraw-Hill Co.*, 2004.

[45] S. V Dorozhkin, “Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates,” *Biomatter*, vol. 1, no. 1, pp. 3–56, 2011.

[46] Z. M. Isa and J. A. Hobkirk, “Dental Implants: Biomaterial, Biomechanical And Biological Considerations.,” *Ann. Dent. Univ. Malaya*, vol. 7, no. 1, pp. 27–35, 2000.

[47] K. Anselme, “Osteoblast adhesion on biomaterials,” *Biomaterials*, vol. 21,

no. 7, pp. 667–681, 2000.

[48] M. Mehdizadeh and J. Yang, “Design strategies and applications of tissue bioadhesives,” *Macromol. Biosci.*, vol. 13, no. 3, pp. 271–288, 2013.

[49] J. M. Anderson, “Biological responses to materials,” *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 81–110, 2001.

[50] G. A. Di Lullo, S. M. Sweeney, J. Körkkö, L. Ala-Kokko, and J. D. San Antonio, “Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen,” *J. Biol. Chem.*, 2002.

[51] S. Ricard-Blum and F. Ruggiero, “The collagen superfamily: From the extracellular matrix to the cell membrane,” *Pathol. Biol.*, 2005.

[52] S. Ricard-Blum, “The Collagen Family,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011.

[53] S. M. Mithieux, S. G. Wise, and A. S. Weiss, “Tropoelastin - A multifaceted naturally smart material,” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013.

[54] D. Hubmacher, K. Tiedemann, and D. P. Reinhardt, “Fibrillins: From Biogenesis of Microfibrils to Signaling Functions,” *Current Topics in Developmental Biology*. 2006.

[55] F. Ramirez and H. C. Dietz, “Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events,” *Journal of Cellular Physiology*. 2007.

[56] R. Sasisekharan, R. Raman, and V. Prabhakar, “GLYCOMICS APPROACH TO STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF GLYCOSAMINOGLYCANS,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2006.

[57] C. G. Gebelein and R. L. Dunn, *Progress in biomedical polymers*. Springer Science & Business Media, 2013.

[58] R. A. A. Muzzarelli, Riccardo A. A. Muzzarelli, and Riccardo A A Muzzarelli, *Natural chelating polymers; alginic acid, chitin, and chitosan*. 1973.

[59] A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jezierska, M. Gonçalves-

Miśkiewicz, M. Turkiewicz, and S. Bielecki, “Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2002.

[60] P. R. Chawla, I. B. Bajaj, S. A. Survase, and R. S. Singhal, “Microbial cellulose: Fermentative production and applications,” *Food Technology and Biotechnology*. 2009.

[61] P. Ross, R. Mayer, and M. Benziman, “Cellulose biosynthesis and function in bacteria,” *Microbiological Reviews*. 1991.

[62] W. Czaja, D. Romanovicz, and R. malcolm Brown, “Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture,” *Cellulose*, 2004.

[63] O. M. Alvarez, M. Patel, J. Booker, and L. Markowitz, “Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: Results of a single center randomized study involving 24 patients,” *Wounds*, 2004.

[64] A. Krystynowicz, W. Czaja, L. Pomorski, M. Kolodziejczyk, and S. Bielecki, “The evaluation of usefulness of microbial cellulose as a wound dressing material,” *Meded. Landbouwkd. EN TOEGEPASTE Biol. Wet.*, vol. 65, no. 3; ISSU A, pp. 213–220, 2000.

[65] W. Czaja *et al.*, “Application of bacterial cellulose in treatment of second and third degree burns.,” in *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 2004, vol. 227, pp. U303–U303.

[66] J. D. Fontana *et al.*, “Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1990.

[67] “4912049 Process for the preparation of cellulose film, cellulose film produced thereby, artificial skin graft and its use,” *Biotechnol. Adv.*, 1990.

[68] R. Jonas and L. F. Farah, “Production and application of microbial cellulose,” *Polym. Degrad. Stab.*, 1998.

[69] A. Slezak, M. Kucharzewski, A. Sieroń, W. Gołda, and G. Cieślar, “Testing the osmotic-diffusion properties for the membranous dressing Bioprocess,”

Polim. Med., 1998.

[70] U. S. Congress, “Biopolymers: Making Materials Nature’s Way-Background Paper,” *Off. Technol. Assessment, Washingt. DC*, 1993.

[71] E. J. Vandamme, S. De Baets, A. Vanbaelen, K. Joris, and P. De Wulf, “Improved production of bacterial cellulose and its application potential,” *Polym. Degrad. Stab.*, 1998.

[72] M. H. Kwak *et al.*, “Bacterial cellulose membrane produced by Acetobacter sp. A10 for burn wound dressing applications,” *Carbohydr. Polym.*, 2015.

[73] N. Lin and A. Dufresne, “Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect,” *Eur. Polym. J.*, 2014.

[74] S. Goncalves *et al.*, “Bacterial cellulose as a support for the growth of retinal pigment epithelium,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 4, pp. 1341–1351, 2015.

[75] J. Wang, C. Gao, Y. Zhang, and Y. Wan, “Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 1, pp. 214–218, 2010.

[76] J. J. Dutton, “Coralline hydroxyapatite as an ocular implant,” *Ophthalmology*, vol. 98, no. 3, pp. 370–377, 1991.

[77] D. A. Schumann *et al.*, “Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes,” *Cellulose*, vol. 16, no. 5, pp. 877–885, 2009.

[78] J. C. Fricain, P. L. Granja, M. A. Barbosa, B. De Jéso, N. Barthe, and C. Baquey, “Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 971–980, 2002.

[79] Y. He, F. Yang, H. Zhao, Q. Gao, B. Xia, and J. Fu, “Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, 2016.

[80] M. Albanna *et al.*, “In situ bioprinting of autologous skin cells accelerates

wound healing of extensive excisional full-thickness wounds," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–15, 2019.

[81] B. C. Streifel *et al.*, "Hemostatic and absorbent PolyHIPE–kaolin composites for 3D printable wound dressing materials," *Macromol. Biosci.*, vol. 18, no. 5, p. 1700414, 2018.

[82] Q. Wu, D. Therriault, and M.-C. Heuzey, "Processing and properties of chitosan Inks for 3D printing of hydrogel microstructures," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 4, no. 7, pp. 2643–2652, 2018.

[83] C. Z. Liu, Z. D. Xia, Z. W. Han, P. A. Hulley, J. T. Triffitt, and J. T. Czernuszka, "Novel 3D collagen scaffolds fabricated by indirect printing technique for tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.*, vol. 85, no. 2, pp. 519–528, 2008.

[84] M. Hospodiuk, M. Dey, D. Sosnoski, and I. T. Ozbolat, "The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials," *Biotechnology Advances*. 2017.

[85] A. Nakayama *et al.*, "High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 14, no. 11, pp. 1124–1128, 2004.

[86] H. X. Li, S.-J. Kim, Y.-W. Lee, C. D. Kee, and I. K. Oh, "Determination of the stoichiometry and critical oxygen tension in the production culture of bacterial cellulose using saccharified food wastes," *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 28, no. 12, pp. 2306–2311, 2011.

[87] D. Klemm, D. Schumann, U. Udhardt, and S. Marsch, "Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 26, no. 9, pp. 1561–1603, 2001.

[88] C. J. Malm *et al.*, "Small calibre biosynthetic bacterial cellulose blood vessels: 13-months patency in a sheep model," *Scand. Cardiovasc. J.*, vol. 46, no. 1, pp. 57–62, 2012.

[89] T. Abitbol *et al.*, "Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications," *Curr.*

Opin. Biotechnol., vol. 39, pp. 76–88, 2016.

[90] T. Starborg *et al.*, "Using transmission electron microscopy and 3View to determine collagen fibril size and three-dimensional organization," *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 7, p. 1433, 2013.

[91] L. K. Narayanan, P. Huebner, M. B. Fisher, J. T. Spang, B. Starly, and R. A. Shirwaiker, "3D-bioprinting of polylactic acid (PLA) nanofiber–alginate hydrogel bioink containing human adipose-derived stem cells," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 2, no. 10, pp. 1732–1742, 2016.

[92] E. Gutierrez, P. A. Burdiles, F. Quero, P. Palma, F. Olate-Moya, and H. Palza, "3D Printing of antimicrobial alginate/bacterial-cellulose composite hydrogels by incorporating copper nanostructures," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 11, pp. 6290–6299, 2019.

[93] E. Altun, N. Ekren, S. E. Kuruca, and O. Gunduz, "Cell studies on Electrohydrodynamic (EHD)-3D-bioprinted Bacterial Cellulose\Polycaprolactone scaffolds for tissue engineering," *Mater. Lett.*, vol. 234, pp. 163–167, 2019.

[94] S. Sämfors, K. Karlsson, J. Sundberg, K. Markstedt, and P. Gatenholm, "Biofabrication of bacterial nanocellulose scaffolds with complex vascular structure," *Biofabrication*, vol. 11, no. 4, 2019.

[95] I. T. Ozbolat and Y. Yu, "Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 60, no. 3, pp. 691–699, 2013.

[96] S. V. Murphy and A. Atala, "3D bioprinting of tissues and organs," *Nature Biotechnology*. 2014.

[97] B. Derby, "Printing and prototyping of tissues and scaffolds," *Science (80-.).*, vol. 338, no. 6109, pp. 921–926, 2012.

[98] T. Xu, H. Kincaid, A. Atala, and J. J. Yoo, "High-throughput production of single-cell microparticles using an inkjet printing technology," *J. Manuf. Sci. Eng.*, vol. 130, no. 2, 2008.

[99] X. Cui, D. Dean, Z. M. Ruggeri, and T. Boland, “Cell damage evaluation of thermal inkjet printed Chinese hamster ovary cells,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 106, no. 6, pp. 963–969, 2010.

[100] E. Tekin, P. J. Smith, and U. S. Schubert, “Inkjet printing as a deposition and patterning tool for polymers and inorganic particles,” *Soft Matter*, vol. 4, no. 4, pp. 703–713, 2008.

[101] J. D. Kim, J. S. Choi, B. S. Kim, Y. C. Choi, and Y. W. Cho, “Piezoelectric inkjet printing of polymers: Stem cell patterning on polymer substrates,” *Polymer (Guildf).*, vol. 51, no. 10, pp. 2147–2154, 2010.

[102] K. W. Binder, A. J. Allen, J. J. Yoo, and A. Atala, “Drop-on-demand inkjet bioprinting: a primer,” *Gene Ther. Regul.*, vol. 6, no. 01, pp. 33–49, 2011.

[103] V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, and R. R. Markwald, “Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering,” *TRENDS Biotechnol.*, vol. 21, no. 4, pp. 157–161, 2003.

[104] I. T. Ozbolat and M. Hospodiuk, “Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting,” *Biomaterials*, vol. 76, pp. 321–343, 2016.

[105] M. Gruene *et al.*, “Laser printing of stem cells for biofabrication of scaffold-free autologous grafts,” *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 17, no. 1, pp. 79–87, 2011.

[106] F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, and B. Guillotin, “Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering,” *Nanomedicine*, vol. 5, no. 3, pp. 507–515, 2010.

[107] I. Gibson, D. Rosen, B. Stucker, and M. Khorasani, *Additive manufacturing technologies*, vol. 17. Springer, 2014.

[108] J. Z. Manapat, Q. Chen, P. Ye, and R. C. Advincula, “3D printing of polymer nanocomposites via stereolithography,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 302, no. 9, p. 1600553, 2017.

[109] C. W. Hull, “Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography,” *United States Patent, Appl., No. 638905, Filed*, 1984.

[110] J. S. Choi, H.-W. Kang, I. H. Lee, T. J. Ko, and D.-W. Cho, “Development of micro-stereolithography technology using a UV lamp and optical fiber,” *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 41, no. 3–4, pp. 281–286, 2009.

[111] Y. Torii *et al.*, “Flexible Evanescent Wave Interference Lithography System for Sub-half-Wavelength Complex Relief Structures Fabrication,” *Nanomanufacturing Metrol.*, pp. 1–15, 2021.

[112] J. R. Tumbleston *et al.*, “Continuous liquid interface production of 3D objects,” *Science (80-.).*, vol. 347, no. 6228, pp. 1349–1352, 2015.

[113] D. W. McRobbie, E. A. Moore, M. J. Graves, and M. R. Prince, *MRI from Picture to Proton*. Cambridge university press, 2017.

[114] P. Olla, “Opening Pandora?s 3D Printed Box,” *IEEE Technol. Soc. Mag.*, 2015.

[115] M. Vaezi, C. K. Chua, and S. M. Chou, “Improving the process of making rapid prototyping models from medical ultrasound images,” *Rapid Prototyp. J.*, 2012.

[116] R. Oklu *et al.*, “3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication,” 2016.

[117] Y.-J. Seol, T.-Y. Kang, and D.-W. Cho, “Solid freeform fabrication technology applied to tissue engineering with various biomaterials,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 6, pp. 1730–1735, 2012.

[118] J. K. Park *et al.*, “Solid free-form fabrication of tissue-engineering scaffolds with a poly (lactic-co-glycolic acid) grafted hyaluronic acid conjugate encapsulating an intact bone morphogenetic protein–2/poly (ethylene glycol) complex,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 15, pp. 2906–2912, 2011.

[119] F. Pati, D.-H. Ha, J. Jang, H. H. Han, J.-W. Rhie, and D.-W. Cho, “Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration,” *Biomaterials*, vol. 62, pp. 164–175, 2015.

[120] L. E. Bertassoni *et al.*, “Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 13, pp. 2202–2211, 2014.

[121] P. Zarrintaj *et al.*, “Agarose-based biomaterials for tissue engineering,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 187, pp. 66–84, 2018.

[122] C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason, and G. Forgacs, “Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5910–5917, 2009.

[123] X. Yang, Z. Lu, H. Wu, W. Li, L. Zheng, and J. Zhao, “Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering,” *Mater. Sci. Eng. C*, 2018.

[124] K. Y. Lee and D. J. Mooney, “Alginate: properties and biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126, 2012.

[125] Z. Emami, M. Ehsani, M. Zandi, and R. Foudazi, “Controlling alginate oxidation conditions for making alginate-gelatin hydrogels,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 198, pp. 509–517, 2018.

[126] J. Lee, J. Hong, W. Kim, and G. H. Kim, “Bone-derived dECM/alginate bioink for fabricating a 3D cell-laden mesh structure for bone tissue engineering,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 250, p. 116914, 2020.

[127] M. Müller, E. Öztürk, Ø. Arlov, P. Gatenholm, and M. Zenobi-Wong, “Alginate sulfate–nanocellulose bioinks for cartilage bioprinting applications,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 45, no. 1, pp. 210–223, 2017.

[128] Y. He *et al.*, “Characterization and application of carboxymethyl chitosan-based bioink in cartilage tissue engineering,” *J. Nanomater.*, vol. 2020, 2020.

[129] M. D. Shoulders and R. T. Raines, “Collagen structure and stability,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, pp. 929–958, 2009.

[130] P. J. Haines, *Thermal methods of analysis: principles, applications and problems*. Springer Science & Business Media, 2012.

[131] P. Wei, J. Cai, and L. Zhang, “High-strength and tough crystalline polysaccharide-based materials,” *Chinese J. Chem.*, vol. 38, no. 7, pp. 761–771, 2020.

[132] G. B. KILIÇ and A. G. Karahan, “Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması,” *Gıda*, vol. 35, no. 6, pp. 445–452, 2010.

[133] P. Larkin, *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier, 2017.

[134] J. Cao, X. Wu, X. Qin, and Z. Li, “Uncovering the Effect of Passage Number on HT29 Cell Line Based on thex Cell Metabolomic Approach,” *J. Proteome Res.*, vol. 20, no. 3, pp. 1582–1590, 2021.

[135] O. Damour, S. Z. Hua, F. Lasne, M. Villain, P. Rousselle, and C. Collombel, “Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes,” *Burns*, vol. 18, no. 6, pp. 479–485, 1992.

[136] J. K. Lee, D. B. Kim, J. Il Kim, and P. Y. Kim, “In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants,” *Toxicol. Vitr.*, vol. 14, no. 4, pp. 345–349, 2000.

[137] J. S. O. H. M. Xia and L. L. Z. Kairui, “Experimental Study on the Structure and Properties of Bacterial Cellulose [J],” *J. Cellul. Sci. Technol.*, vol. 3, 2002.

[138] N. T. Laçin, “Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 67, pp. 22–27, 2014.

[139] B. Raphael *et al.*, “3D cell bioprinting of self-assembling peptide-based hydrogels,” *Mater. Lett.*, 2017.

[140] V. Karageorgiou and D. Kaplan, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, 2005.

[141] H. Chen, A. D. B. F. B. Malheiro, C. Van Blitterswijk, C. Mota, P. A. Wieringa, and L. Moroni, “Direct Writing Electrospinning of Scaffolds with Multidimensional Fiber Architecture for Hierarchical Tissue Engineering,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017.

[142] C. Gao *et al.*, “Preparation and characterization of bacterial cellulose sponge

with hierarchical pore structure as tissue engineering scaffold," *J. porous Mater.*, vol. 18, no. 2, pp. 139–145, 2011.

[143] J. Guo and J. M. Catchmark, "Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by Gluconacetobacter xylinus," *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 2, pp. 1026–1037, 2012.

[144] M. Ul-Islam, T. Khan, and J. K. Park, "Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification," *Carbohydr. Polym.*, vol. 88, no. 2, pp. 596–603, 2012.

[145] H. S. Barud *et al.*, "Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 87, no. 3, pp. 815–818, 2007.

[146] L. Segal, J. J. Creely, A. E. Martin, and C. M. Conrad, "An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer text. Res J 29: 786–794." 1959.

[147] A. Vazquez, M. L. Foresti, P. Cerrutti, and M. Galvagno, "Bacterial cellulose from simple and low cost production media by Gluconacetobacter xylinus," *J. Polym. Environ.*, vol. 21, no. 2, pp. 545–554, 2013.

[148] "https://omnexus.specialchem.com/polymer-properties/properties/elongation-at-break#A-C." .

[149] I. Levental, P. C. Georges, and P. A. Janmey, "Chen, J., Zhuang, A., Shao, H., Hu, X., & Zhang, Y. (2017). Robust silk fibroin/bacterial cellulose nanoribbon composite scaffolds with radial lamellae and intercalation structure for bone regeneration. Journal of Materials Chemistry B, 5(20), 3640–3650.," *Soft Matter*, vol. 3, no. 3, pp. 299–306, 2007.

[150] W. Song, D. Liu, N. Prempeh, and R. Song, "Fiber alignment and liquid crystal orientation of cellulose nanocrystals in the electrospun nanofibrous mats," *Biomacromolecules*, vol. 18, no. 10, pp. 3273–3279, 2017.

[151] L. Huang *et al.*, "Bacterial cellulose nanofibers promote stress and fidelity of 3D-printed silk based hydrogel scaffold with hierarchical pores," *Carbohydr. Polym.*, vol. 221, no. May, pp. 146–156, 2019.

[152] B. Wang *et al.*, “A simple method for controlling the bacterial cellulose nanofiber density in 3D scaffolds and its effect on the cell behavior,” *Cellulose*, vol. 26, no. 12, pp. 7411–7421, 2019.

[153] K. Markstedt, A. Escalante, G. Toriz, and P. Gatenholm, “Biomimetic Inks Based on Cellulose Nanofibrils and Cross-Linkable Xylans for 3D Printing,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017.

[154] R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, and J. Youngblood, “Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 7, pp. 3941–3994, 2011.

[155] D. Aki *et al.*, “3D printing of PVA/hexagonal boron nitride/bacterial cellulose composite scaffolds for bone tissue engineering,” *Mater. Des.*, vol. 196, p. 109094, 2020.

[156] R. Auta, G. Adamus, M. Kwiecien, I. Radecka, and P. Hooley, “Production and characterization of bacterial cellulose before and after enzymatic hydrolysis,” *African J. Biotechnol.*, vol. 16, no. 10, pp. 470–482, 2017.

[157] S. Chawla, S. Midha, A. Sharma, and S. Ghosh, “Silk-based bioinks for 3D bioprinting,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 8, p. 1701204, 2018.

[158] E. Altun, N. Ekren, S. E. Kuruca, and O. Gunduz, “Cell studies on electrohydrodynamic (ehd)-3d-bioprinted bacterial cellulose\polycaprolactone scaffolds for tissue engineering,” *Mater. Lett.*, vol. 234, pp. 163–167, 2019.

[159] I. Reiniati, A. N. Hrymak, and A. Margaritis, “Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 37, no. 4, pp. 510–524, 2017.

[160] K. Fijałkowski *et al.*, “Increased water content in bacterial cellulose synthesized under rotating magnetic fields,” *Electromagn. Biol. Med.*, vol. 36, no. 2, pp. 192–201, 2017.

[161] A. Salerno and P. A. Nettis, “Optimal design and manufacture of biomedical foam pore structure for tissue engineering applications,” in *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*, Elsevier, 2014, pp. 71–100.

[162] A. S. Go *et al.*, “Heart disease and stroke statistics-2013 update: A Report from the American Heart Association,” *Circulation*. 2013.

[163] J. Stark, “The use of valved conduits in pediatric cardiac surgery,” *Pediatric Cardiology*. 1998.

[164] J. A. Dearani *et al.*, “Late follow-up of 1095 patients undergoing operation for complex congenital heart disease utilizing pulmonary ventricle to pulmonary artery conduits,” *Ann. Thorac. Surg.*, 2003.

[165] International Standads Organization, “Biological evaluation of medical devices,” *ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. 2009.

[166] F. V. Berti, C. R. Rambo, P. F. Dias, and L. M. Porto, “Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix,” *Mater. Sci. Eng. C*, 2013.

TEZDEN TÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

[1] N. P. Cesur and N. Türkoğlu Laçin, “The role of bacterial cellulose in bioinc and bio printing strategy,” Mas 14th International European Conference On Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences, Széchenyi, István University, Mart 26-28, 2021, pp. 362.