TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OSTEOMİYELİT TEDAVİSİ İÇİN ANTİBİYOTİK İÇEREN DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI VE IN VITRO KARAKTERİZASYONU

BURCU AĞIRMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi EMİNE ALARÇİN

2021-İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Burcu Ağırman

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca sürekli yanımda olan, manevi desteğini esirgemeden bilgi ve deneyimlerini paylaşan sevgili danışman hocam Öğr. Üyesi Dr. Emine Alarçin'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasındaki destek ve katkıları için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Timuçin Uğurlu'ya ve Prof. Dr. Oya Kerimoğlu teşekkürlerimi sunarım. Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Sevinç Şahbaz'a çalışmalarıma olan tüm desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

FTIR analizlerindeki destekleri için Dr. Öğr. Üyesi Ayça Bal Öztürk ve AFM analizlerindeki destekleri için Dr. Öğr. Üyesi Gökçen Yaşayan'a teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmama ait etken madde temininde bağışta bulunan Mustafa Nevzat İlaç Sanayii Anonim Şirketi'ne teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında benimle aynı laboratuvar ortamını paylaşan ve manevi desteğini esirgemeyen Ecz. Ozan Erdoğan ve Ecz. Gizem Atmaca arkadaşlarıma teşekkür ederim. Aynı yüksek lisans dönemini paylaştığım Ecz. Yasin Gökay'a ve Ecz. Başak Yılmaz'a, hem lisans hem de yüksek lisansta benimle aynı dönemde olan Ecz. Sezen Süzgeç'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemi destekleyen, her koşulda yanımda olan ve emeği yadsınamayacak olan annem Çidem Ağırman, babam Muzaffer Ağırman ve anneannem Ayla Sertay'a, tüm bunların yanında çok sevgili kardeşim Baran Can Ağırman'a da çokça teşekkür ederim.

Tüm bunlara ek olarak, tez çalışmam boyunca beni destekleyen çok saygı duyduğum müdürüm Nejat Selkan, çok sevgili kıdemlim İlhan Günal ve değerli meslektaşım Ahmet Tarık Yenil'e de teşekkürlerü borç bilirim.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından SAG-C-YLP-130219-0051 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR VE TABLOLAR LİSTESİ…….……..……..…….……vii

KISALTMALAR LİSTESİ…….…….…….……vii

TABLOLAR LİSTESİ…….…….…….…….....ix

ŞEKİLLER LİSTESİ…….…….…….....….....xi

RESİMLER LİSTESİ……..…….…….…...xviii

1.ÖZET…….……...1

2.SUMMARY…….……2

3.GİRİŞ ve AMAÇ…….……3

4.GENEL BİLGİLER…….……6

4.1.KEMİK DOKU…….……..6

4.1.1.Kemik Dokunun Yapısı…….……..8

4.1.2.Kemik Oluşumu ve Rejenerasyonu……...……12

4.2. İNFLAMATUAR HASTALIKLARIN KEMİK ÜZERİNE ETKİSİ……15

4.3. OSTEOMİYELİT……...……..16

4.4. OSTEOMİYELİT TEDAVİ YAKLAŞIMLARI……...……..20

4.4.1 Osteomiyelitin Önlenmesi ve Tedavisinde Genel Prensipler……...…….20

4.4.2 Ölü Alan Yönetimi…….21

4.4.3 Antimikrobiyal Tedavi ve Uygulama Yolları Seçimi…….…..……..22

4.4.4. Lokal Antibiyotik Taşıyıcı Stratejileri…….……25

4.5 DOKU İSKELELERİ…….…….……28

4.5.1. Biyobaskılama Yöntemleri ……..28

4.5.1.1. Stereolitografi……...…….……31

4.5.1.2. Ekstrüzyon Tabanlı Biyoyazıcılar……..……31

4.5.1.3. Mürekkep Püskürtmeli Biyoyazıcılar……...……32

4.5.1.4. Lazer Tabanlı Biyoyazıcılar……..……33

4.5.2 Biyofabrikasyonda Kullanılan Malzemeler…….……..34

4.6. HİDROJELLER…….……..36

4.6.1. Biyofabrikasyon İçin Hidrojellerin Sahip Olması Gereken Özellikler…….40

4.6.1.1. Hidrojellerin Mekanik Özellikleri……..40

4.6.1.2 Hidrojellerin Mekanik Özellikleri Üzerinde Çalışmalar…….……43

4.7. JELATİN……..……47

4.8. SENTETİK SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİ (LAPONİTE)……48

4.9. HYALURONİK ASİT (HA)……50

4.10. VANKOMİSİN …….50

4.10.1. Vankomisinin Genel Özellikleri…….……52

4.10.2. Vankomisinin Etki Mekanizması……52

4.10.3. Vankomisinin Farmakolojik Özellikleri…….53

4.10.4. Vankomisinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri……54

5. GEREÇ VE YÖNTEM…….……57

5.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER……..57

5.2. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER…….……..57

5.3. VANKOMİSİN HİDROKLORÜRÜN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN TAYİNİ…….58

5.3.1. Vankomisin Hidroklorürün Erime Derecesinin Tayin Edilmesi…..…….58

5.3.2. Vankomisin Hidroklorürün Çözünürlüğünün Tayin Edilmesi……...……..58

5.3.3. Vankomisin Hidroklorürün Fouirer Transform Infrared (FTIR) Spektrumunun İncelenmesi…….……59

5.4. VANKOMİSİN HİDROKLORÜRÜN KANTİTATİF TAYİNİ……..……..59

5.4.1. Ultraviyole (UV) Spektrumu……..……..59

5.4.2. Miktar Tayini ……..59

5.4.3. UV Spektrofotometrik Yöntem Validasyonu……...……60

5.4.3.1. Doğrusallık…….60

5.4.3.2. Kesinlik…….…….60

5.4.3.2.A. Tekrar Edilebilirlik (Gün İçi Kesinlik)……..……61

5.4.3.2.B. Tekrar Elde Edilebilirlik (Günlerarası Kesinlik)……61

5.4.3.3. Doğruluk……..……..61

5.4.3.4. Stabilite……..61

5.5. JELATİN METAKRİLATIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU……..61

5.5.1. Jelatin Metakrilatın Hazırlanması…….61

5.5.2. Jelatin Metakrilatın Fouirer Transform Infrared (FTIR) Spektrumunun İncelenmesi…….……62

5.5.3. Jelatin Metakrilatın 1H Nükleer Manyetik Rezonans (1H NMR) Spektrumunun İncelenmesi…….……62

5.6. NANOSİLİKANIN FTIR SPEKTRUMUNUN FOUİRER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPEKTRUMUNUN İNCELENMESİ……..…...……..63

5.7.3. (Trimetoksisilil)Propil Metakrilat Tmspma İle Kaplı Cam Lamların Hazırlanması……...……63

5.8. 3B BİYOYAZICI İLE NANOKOMPOZİT DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI …….……63

5.8.1. 3B Nanokompozit hidrojel biyomürekkeplerin hazırlanması……...…63

5.8.2. Ekstrüzyon Destekli Biyoyazıcı……..……..64

5.8.3. 3B Nanokompozit Doku İskelelerinin Tasarlanması……..……..66

5.8.4. 3B Nanokompozit Doku İskelelerinin Üretimi…...……..……67

5.8.5. Biyobasım Optimizasyonu……...…….67

5.9. ETKİN MADDE İÇERMEYEN NANOKOMPOZİT DOKU İSKELELERİNİN KARAKTERİZASYONU……..……..……..68

5.9.1. Hazırlanan Biyomürekkeplerin Reolojik Özelliklerinin Karakterizasyonu……..……..68

5.9.2 Hazırlanan 3B Doku İskelelerinin Fouirer Transform Infrared (FTIR) Spektrumlarının İncelenmesi ……..……68

5.9.3 Hazırlanan 3B Doku İskelelerinin Atomik Kuvvet Mikroskobu İle Yüzey Karakterizasyonu……...…….68

5.9.4. Nanokompozit Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesi……..…….69

5.9.5. Nanokompozit Doku İskelelerinin Şişme Özelliklerinin Değerlendirilmesi……..…..……69

5.9.6. Nanokompozit Doku İskelelerinin Hidrolitik Degradasyon Özelliklerinin Değerlendirilmesi……..…….70

5.9.7. Nanokompozit Doku İskelelerine Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi……..……70

5.9.8. Nanokompozit Doku İskelelerinden Vankomisin Salım Özelliklerinin Değerlendirilmesi…….……71

6. BULGULAR

6.1. VANKOMİSİN HİDROKLORÜRÜN FİZİKOKIMYASAL ÖZELLİKLERİNE AİT BULGULAR……...……72

6.1.1. Vankomisin Hidroklorürün Erime Derecesinin Tayinine Ait Bulgular……72

6.1.2. Vankomisin Hidroklorürün Çözünürlük Tayinine Ait Bulgular……...…72

6.1.3. Vankomisin Hidroklorürın FTIR Spektrumunun İncelenmesi…….72

6.2. VANKOMİSİN HİDROKLORÜRÜN KANTİTATİF TAYİNİ……73

6.2.1. Ultraviyole (UV) Spektrumu……...……73

6.2.2. UV Spektrofotometrik Yöntem Validasyonu……..…….74

6.2.2.1. Doğrusallık…….74

6.2.2.2. Kesinlik……..75

6.2.2.2.A. Tekrar Edilebilirlik (Gün İçi Kesinlik) ……...……..75

6.2.2.2.B. Tekrar Elde Edilebilirlik (Günlerarası Kesinlik)……...…….75

5.2.2.3. Doğruluk……...……76

6.2.2.4. Stabilite……..……78

6.3. JELATİN METAKRİLATIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU……..……78

6.3.1. Jelatin Metakrilatın Hazırlanması…….78

6.3.2. Jelatin Metakrilatın Fouirer Transform Infrared (FTIR) Spektrumunun İncelenmesi……...……..78

6.3.4. Jelatin Metakrilatın 1H Nükleer Manyetik Rezonans (1H NMR) Spektrumunun İncelenmesi…….79

6.4. NANOSİLİKANIN FTIR SPEKTRUMUNUN İNCELENMESİ……...……80

6.5. HA'NIN FTIR SPEKTRUMUNUN İNCELENMESİ……...…….81

6.6. 3-(TRİMETOKSİSİLİL)PROPİL METAKRİLAT (TMSPMA) İLE KAPLI CAM LAMLARIN HAZIRLANMASINA AİT BULGULAR…….…….81

6.7. 3B BİYOYAZICI İLE NANOKOMPOZİT DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASINA AİT BULGULAR …….……82

6.7.1. Hidrojel Biyomürekkeplerin Hazırlanması……..…….82

6.7.2. Ekstrüzyon Destekli Biyoyazıcı İle Basım Optimizasyonuna Ait Bulgular….82

6.7.3. Hazırlanan Nanokompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonuna Ait Bulgular……..…….91

6.7.3.1. Hazırlanan Biyomürekkeplerin Reolojik Özelliklerinin Karakterizasyonuna Ait Bulgular……91

6.7.3.2. Hazırlanan 3B Doku İskelelerinin Fouirer Transform Infrared (FTIR) Spektrumlarının İncelenmesine Ait Bulgular……...……..97

6.7.3.3. Hazırlanan 3B Doku İskelelerinin Atomik Kuvvet Mikroskobu İle Yüzey Karakterizasyonuna Ait Bulgular……..…….97

6.7.3.4. Hazırlanan 3B Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular……...……..106

6.7.3.5. Hazırlanan 3B Doku İskelelerinin Şişme Özelliklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular…….…….108

6.7.3.6. Hazırlanan 3B Doku İskelelerinin Hidrolitik Degradasyon Özelliklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular…….……110

6.7.4. Hazırlanan 3B Doku İskelelerine Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular…….……113

6.7.5. Hazırlanan 3B Doku İskelelerinden Vankomisin Salım Özelliklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular……...……..114

7. TARTIŞMA VE SONUÇ..…….118

8. KAYNAKLAR……136

ÖZGEÇMİŞ……...…….160

KISALTMALAR VE TABLOLAR LİSTESİ

KISALTMALAR LİSTESİ

UV	Mor ötesi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi
PBS	Fosfat tamponu
SS	Standart sapma
RSD	Relatif Standart Saapma
^{1}H NMR	Nükleer manyetik rezonans
BT	Bilgisayarlı Tomografi
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
PEG	Polietilen glikol
PVA	Polivinil alkol
ECM	Hücre dışı matris
GAG	Glikosaminoglikan
TNFa	Tümör nekroz faktörü
IL-1β	İnterlökin 1 beta
IL-6	İnterlökin 6
RANKL	Nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü
S. aureus	Stafilokok aureus
S. epidermidis	Stafilokok epidermidis
MSSA/MSSE	Metisiline duyarlı S. aureus

MRSA/ MRSE	Metisiline dirençli S. aureus
ESR	Eritrosit sedimantasyon hızı
PMMA	Polimetilmetakrilat
CAD	Bilgisayar destekli tasarım
SLA	Stereolitografi
PLLA	Poli L-laktik asit
PGA	Poli glikolik asit
PLGA	Poli DL-laktik-ko-glikolik asit
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
ADA	Aljinat-dialdehitin
DNA	Deoksiribonükleik asit
MPa	Mega paskal
GPa	Giga paskal
RNA	Ribonükleik asit
D2O	Döteryum oksit
TMSPMA	3-(Trimetoksisilil)propil metakrilat
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Yetişkinlerde osteomiyelitin antibiyotik tedavisi

Tablo 2. Kollajen bazlı süngerler ve kemik çimentosu/boncuklar dahil olmak üzere, antimikrobiyallerle yüklü ve osteomiyelit tedavisinde kullanılan, ticari olarak temin edilebilen kemik rejeneratif biyomalzemeler

Tablo 3. Vankomisinin çözünürlük değerleri

Tablo 4. Vankomisin hidroklorürün standart eğrisine ait veriler (n=9)

Tablo 5. Vankomisin hidroklorürün gün içi kesinliğine ait veriler (n=3)

Tablo 6. Vankomisin hidroklorürün günler arası kesinliğine ait veriler (n=3)

Tablo 7. Analitik yöntemin doğruluğuna ait veriler (yüksek konsantrasyon)

Tablo 8. Analitik yöntemin doğruluğuna ait veriler (orta konsantrasyon)

Tablo 9. Analitik yöntemin doğruluğuna ait veriler (düşük konsantrasyon)

Tablo 10. Analitik yöntemin stabilitesine ait bulgular

Tablo 11. Temel basım parametreleri

Tablo 12. Formülasyonlara göre basım parametreleri

Tablo 13. %6 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

Tablo 14. %8 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

Tablo 15. %10 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

Tablo 16. %12 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

Tablo 17. %14 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

Tablo 18. Örneklerinin yüzey pürüzlülüğü değerleri

Tablo 19. %1 HA, %2 NS ve değişken oranlarda JelMA formülasyonlarının 1., 7., 14. Ve 28. gün sonlarında kalan kütle yüzdeleri

Tablo 20. %10 JelMA, %1 HA ve değişken oranlarda NS formülasyonlarının 1., 7., 14. Ve 28. gün sonlarında kalan kütle yüzdeleri

Tablo 21. %10 JelMA, %2 NS ve değişken oranlarda HA formülasyonlarının 1., 7., 14. Ve 28. gün sonlarında kalan kütle yüzdeleri

Tablo 22. 3B Doku iskelelerine etkin madde yükleme etkinlikleri

Tablo 23. Formülasyonların salım kinetikleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. A, Kemikler vücudu dış etkenlerden korur. Başa sert bir nesne çarptığında, kranial kavite içinde yer alan beyin, bu darbenin gücünden, kafatası kemikleri tarafından büyük ölçüde korunur. B, Hematopoez (kan hücrelerinin oluşumu); uzun kemiğin medüller boşluğunda bulunan kırmızı kemik iliği kemiğin, kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve trombositleri oluşturma işlevini yerine getirir. C, Kemikler, kandaki kalsiyum seviyeleri için bir rezervuar görevi görür. Kandaki kalsiyum seviyesi düştüğünde, vücut, kalsiyumun kemiklerden kan dolaşımına salınmasını sağlayan paratiroid hormonunu salgılar. Kandaki kalsiyum seviyesi yükseldiğinde ise vücut, kan dolaşımındaki aşırı kalsiyumun tekrar kemiklere birikmesini sağlayan kalsitonin hormonunu salgılar.

Şekil 2. Aksiyel ve Apendiküler iskelet

Şekil 3. Kemik hücreleri; osteosit, osteoblast, osteojenik hücre ve osteoklast

Şekil 4. Kemik makro yapısı. A, epifiz, epifiz plakları, metafiz ve diyafizi gösteren uzun kemik gelişimi. B, epifiz çizgileri gösteren olgun uzun kemik.

Şekil 5. A, kemiğin içini gösteren uzun bir kemiğin bölümü. B, kompakt kemiğin osteonlarını ve gövdede bulunan süngerimsi kemiği gösteren uzun kemiğin gövdesinin pasta dilimi şeklinde bir parçasının büyütülmesi. C, Lakuna'yı birbirine bağlayan kanaliküller yoluyla birbirleriyle iletişim kuran osteositleri gösteren kompakt kemik dokusunun daha da büyütülmesi.

Şekil 6. Sol: Osteoklastlar rezorbsiyon yoluyla kemik dokusunu yıkarlar. Orta: Bu sırayla kemik progenitör hücrelerinin bölgeye alınmasına ve osteoblastlara farklılaşmasına neden olurken, osteoblastlar kemik dokusunun yüzeyini kaplar ve çoğalır. Sağ: osteoblastlar kemiği kemikleştirme adı verilen bir işlemle biçimlendirirken, bazıları olgun kemik hücrelerine(osteositlere) farklılaşır.

Şekil 7. Osteomiyelitin ilerlemesi. A, bir apse, bölgeye kan akışını daraltan lokalize bir enfeksiyondan gelişir. B, sekestrum adı verilen nekrotik kemik dokusunun avasküler bölgesinde ortaya çıkar. C, ardından sekestrumu çevreleyen yeni kemiğin

gelişimi, aynı zamanda pürülanın kaçabileceği bir sinüs yoluna sahip olabilen entukrum olarak adlandırılır.

Şekil 8. Çeşitli osteomyelitlerde mikrobiyoloji. Mikroorganizmalar yüksek ila düşük prevalans veya göreceli epidemiyolojik öneme sahiptir.

Şekil 9. 3B şekil taklit eden hedef doku veya organın otomatik baskısı için CAD (Bilgisayar destekli üretim) / CAM (bilgisayar destekli tasarım) süreci. Medikal görüntü verilerinden geliştirilen bir 3D CAD modeli, XYZ düzlem hareketleri ve 3D baskı elde etmek için pnömatik basınç için talimatlar içeren görselleştirilmiş hareket programı oluşturur.

Şekil 10. Hidrojellerin biyomürekkep olarak kullanılmasını içeren seçilmiş biyofabrikasyon yaklaşımları.

Şekil 11. Doğada soldan sağa sert ve yumuşak 3D baskılı yapılar. A üst, ağırlıkça %50 hidroksilapatit iskelesi. A alt, gözenek ve çevre seramik parçacıklarının SEM görüntüsü. B, Polikaprolakton iskelesi (çok fonksiyonlu mikro sistemlerin solvent-cast* üç boyutlu baskısı. C, Her biri farklı bir florofor ile boyanan dört PDMS (polidimetilsiloksan) mürekkebinin sırayla biriktirilmesiyle basılan 4-katmanlı örgünün floresan görüntüsü. D, PEG-bazlı hidrojel jelatin (15 mm x 15 mm), alt yapı skalası çubuğu, 500 μm. E, İçi boş küre şekilli lipit damlacık ağının resmi, ölçek çubuğu, 200 mm.

Şekil 12. Üç tür hidrojel şeması. A, bir aljinat jeli içinde, farklı polimer zincirlerindeki G blokları Ca + 2 (kırmızı daireler) boyunca iyonik çapraz bağlar oluşturur. B, Bir poliakrilamid jelde, polimerler N, N-metilen bisakrilamid (MBAA; yeşil kareler) boyunca kovalent çapraz bağlar oluştururlar. C, Bir aljinat-poliakrilamid hibrid jeli içinde, iki tip polimer ağı birbiri içine geçmekte ve poliakrilamid zincirleri ve aljinat zincirleri üzerindeki karboksil grupları üzerindeki amin grupları arasındaki kovalent çapraz bağlar (mavi üçgenler) ile birleşmektedir.

Şekil 13. A-E, JelMA topografik atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüleri, GMAC filmlerin farklı JelMA: kitin ağırlık oranları ve kitin. GMACXY, XY = JelMA: Kitin ağırlık oranına sahip GMAC filmlerdir. A, JelMA. B, GMAC31. C,

GMAC11. D, GMAC13 ve E, Kitin. (ölçek çubukları 500 nm'dir). F, 12.15 mikron ve 450 nm'lik bir yüksekliğe sahip mikro-modelli GMAC13'ün topografik AFM görüntüsü (ölçek çubuğu 20 μm'dir).

Şekil 14. Gerilme testi analizinden hibrid GMAC hidrojellerinin mekanik özellikleri, A, Mühendislik gerilme-gerinim eğrilerinde doğrusal bölgenin eğimlerinden elde edilen elastik modüller. Hidrojellerin farklı JelMA: kitin ağırlık oranları ile karşılaştırılması. Tüm GMAC hidrojelleri için elastik modül, JelMA1 için bildirilenlerden daha yüksektir ve bunlar sadece kitinden daha düşüktür. B, Farklı JelMA: kitin ağırlık oranlarına sahip hibrid hidrojellerde başarısızlık için mühendislik gerinimi hasar değerleri. GMAC13, GelMA1'den %100 daha fazla genleşebilir ve tek başına kitinden %200 daha uzayabilir. C, Mekanik gerilme test cihazında yük uygulamasından önce başlangıç durumunda GMAC13'ün optik görüntüsü. D, GMAC13'ün optik görüntüsü, %224'lük uzatılabilirlik gösterir. 16 mm'lik son uzunluğu gösteren çekme yükü.

Şekil 15. Bir florokarbon sıvısında batırılmış biyomateryalin prosesi. A, yüksek yoğunluklu hidrofobik sıvı, üç boyutlu baskı işlemi sırasında hücre-hidrojel yapılarını mekanik olarak destekler ve daha sonra kolayca çıkarılabilir. B, Florokarbonda gerçekleştirilen tabaka-tabaka biriktirme tekniğinin şematik görünüşü. C, Batırılmış biyomateryal stratejisini kullanan teorik olarak rastgele yazdırılabilir 3B şekilleri.

Şekil 16. FRESH (freeform reversible embedding of suspended hydrogels) kullanılarak yapılan hidrojel lifleri ve yapıların analizi. A, Jelatin destek banyosu (kırmızı) içine gömülü aljinat lif (yeşil). B, jelatin destek banyosu içinde izole aljinat liflerinin çapı 160 ila 260 mm arasındadır. (C'den E'ye) 3D baskıda dolgu için yaygın olarak kullanılan standart bir kare kafes modeli, 3D ile basılmış aljinat (yeşil). D, yukarıdan aşağı ve E olarak görüntülenmiştir. F'den H'ye bir sekizgen dolgu deseni, aljinat (yeşil) 3D ile basılır ve G yukarıdan aşağıya ve H olarak görüntülenmiştir. I, Kırmızı ve yeşil floresanla etiketli aljinatta, üst ve yanal kesitlerde gösterilen sürekli bir ara yüze sahip, iki maddeli silindir baskısı örneği. J, jelatin destek banyosuna gömülü olarak gösterilen bir sarmalın serbest formlu, düzlemsel bir FRESH baskısı örneği. K, FRESH'nin gerçek serbest formda baskı yapabildiğini ve standart katman

katmanı düzlemsel imalatla sınırlı olmadığını gösteren, sarmalın yakınlaştırılmış bir görünümü. Ölçek çubukları; A, 1 mm. D ve G, 500 mm. I, 2 mm. J, 10 mm ve K, 2,5 mm'dir.

Şekil 17. Kimyasal Yapı Görseli

Şekil 18. Axolotl Biyoyazıcıya ait detaylı ürün haritası

Şekil 19. Axolotl Biyoyazıcıya ait başlık kısmına ait detaylı ürün haritası

Şekil 20. Biyobasım işleminin adımları

Şekil 21. Tasarlanan doku iskeleleri

Şekil 22. Biyomürekkeplerin kartuş ile biyoyazıcıya yerleştirilmesi. A, belirlenen çaptaki iğne kartuşa sabitlenir ve biyomürekkep kartuş içerisine alınır. B, kartuş pnömotik boruya bağlanır. C, kartuş yazıcı üzerindeki yuvaya yerleştirilerek kilit ile başlığa kilitlenir ve basınç ayarlanır.

Şekil 23. Vankomisin hidroklorürün infrared spektrumu

Şekil 24. Vankomisin hidroklorürün standart eğri grafiği

Şekil 25. Jelatin ve JelMA'ya ait FTIR spektrumları

Şekil 26. ^{1}H NMR spektrumları. A, Jelatin. B, JelMA

Şekil 27. Nanosilikanın FTIR spektrumu

Şekil 28. HA FTIR spektrumu

Şekil 29. 10J-0NS-1HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')

Şekil 30. 10J-1NS-1HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')

Şekil 31. 10J-2NS-1HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')

Şekil 32. 10J-3NS-1HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')

Şekil 33. 10J-2NS-0HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')

Şekil 34. 10J-2NS-2HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')

Şekil 35. 10JelMA ve 1HA içeren formülasyonların depolama (G') modülleri

Şekil 36. 10JelMA ve 2NS içeren formülasyonların depolama (G') modülleri

Şekil 37. 10JelMA ve 2NS içeren formülasyonların kayma hızı ve viskozite grafikleri

Şekil 38. 10JelMA ve 1HA içeren formülasyonların kayma hızı ve viskozite grafikleri

Şekil 39. Hazırlanan formülasyonların IR spektrumları

Şekil 40. Nanosilika içermeyen örneklerin 3 farklı alandan elde edilen AFM görüntüsü

Şekil 41. Nanosilika içermeyen örneklerin kesit analizi verileri. Kesit analizi, 3 farklı AFM topografi görüntüsü verileri kullanılarak 3 farklı bölgeden elde edilmiştir.

Şekil 12. %1 oranında nanosilika içeren örneklerin 3 farklı alandan elde edilen AFM görüntüsü. 5 µm x 5 µm tarama.

Şekil 43. %1 oranında nanosilika içeren örneklerin kesit analizi verileri. Kesit analizi, 3 farklı AFM topografi görüntüsü verileri kullanılarak 3 farklı bölgeden elde edilmiştir.

Şekil 44. %2 oranında nanosilika içeren örneklerin 3 farklı alandan elde edilen AFM görüntüsü. 5 µm x 5 µm tarama.

Şekil 45. %3 oranında nanosilika içeren örneklerin kesit analizi verileri. Kesit analizi, 3 farklı AFM topografi görüntüsü verileri kullanılarak 3 farklı bölgeden elde edilmiştir.

Şekil 46. %3 oranında nanosilika içeren örneklerin 3 farklı alandan elde edilen AFM görüntüsü. 5 µm x 5 µm tarama.

Şekil 47. %3 oranında nanosilika içeren örneklerin kesit analizi verileri. Kesit analizi, 3 farklı AFM topografi görüntüsü verileri kullanılarak 3 farklı bölgeden elde edilmiştir.

Şekil 48. %2 NS ve %1 HA ile hazırlanan formülasyonların elastisite modülleri

Şekil 49. %10 JelMA ve %1 HA ile hazırlanan formülasyonların elastisite modülleri

Şekil 50. %10 NS ve %2 NS ile hazırlanan formülasyonların elastisite modülleri

Şekil 51. %1 HA, %2 NS ve değişken oranlarda JelMA formülasyonlarının şişme oranları

Şekil 52. %10 JelMA, %1 HA ve değişken oranlarda NS formülasyonlarının şişme oranları

Şekil 53. %10 JelMA, %2 NS ve değişken oranlarda HA formülasyonlarının şişme oranları

Şekil 54. %1 HA, %2 NS ve değişken oranlarda JelMA formülasyonlarının degredasyon oranları

Şekil 55. %10 JelMA, %1 HA ve değişken oranlarda NS formülasyonlarının degredasyon oranları

Şekil 56. %10 JelMA, %2 NS ve değişken oranlarda HA formülasyonlarının degredasyon oranları

Şekil 57. %2 NS, %1 HA ve değişken oranlarda JelMA formülasyonlarının kümülatif salım oranları

Şekil 58. %2 NS, %1 HA ve değişken oranlarda JelMA formülasyonlarının kümülatif salım oranları

Şekil 59. %10 JelMA, %1 HA ve değişken oranlarda NS formülasyonlarının kümülatif salım oranları

Şekil 60. %10 JelMA, %1 HA ve değişken oranlarda NS formülasyonlarının kümülatif salım oranları

Şekil 61. %10 JelMA, %2 NS ve değişken oranlarda HA formülasyonlarının kümülatif salım oranları

Şekil 62. %10 JelMA, %2 NS ve değişken oranlarda HA formülasyonlarının kümülatif salım oranları

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. 3D Biyoyazıcı Sistemi

Resim 2. Vankomisin hidroklorürün en yüksek absorbans gösterdiği dalga boyu ve degaze edilmiş pH 7,4 PBS çözeltisinde verdiği UV spektrumu

Resim 3. G10-NS1-HA1 kartuştan flament akışı (Basınç: 20±2,5 psi; Nozul çapı: 25G)

Resim 4. G10-NS1-HA1 fotoğrafları (Basınç: 20±2,5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:20 kat; İç dolgu: %20)

Resim 5. G10-NS1-HA1 ızgara fotoğrafları (Basınç: 20±2,5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:6 kat; İç dolgu: %20)

Resim 6. G10-NS2-HA1 kartuştan flament akışı (Basınç: 25±2,5 psi; Nozul çapı: 25G)

Resim 7. G10-NS2-HA1 fotoğrafları (Basınç: 25±2,5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:70 kat; İç dolgu: %0)

Resim 8. G10-NS2-HA1 ızgara fotoğrafları (Basınç: 25±2,5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:25 kat; İç dolgu: %20)

Resim 9. G10-NS3-HA1 kartuştan flament akışı (Basınç: 32,5 ± 5 psi; Nozul çapı: 25G)

Resim 10. G10-NS3-HA1 fotoğrafları (Basınç: 32,5 ± 5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:50 kat; İç dolgu: %0)

Resim 11. G10-NS3-HA1 ızgara fotoğrafları (Basınç: 32,5 ± 5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:15 kat; İç dolgu: %20)

Resim 12. G10-NS3-HA1 denenen farklı tasarımların fotoğrafları

1. ÖZET

Osteomiyelit Tedavisi İçin Antibiyotik İçeren Doku İskelelerinin Hazırlanması ve In Vitro Karakterizasyonu

Öğrencinin Adı: Burcu AĞIRMAN

Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Emine ALARÇİN

Amaç: Bu tez çalışmasında osteomiyelit tedavisi için 3B biyoyazıcı ile vankomisin içeren jelatin metakrilat (JelMA), hyaluronik asit (HA) ve nanosilika (NS) nanokompozit doku iskelelerinin hazırlanması ve *in vitro* karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmanın ilk aşamasında JelMA sentezlenmiştir ve yapısı FTIR ve ^{1}H NMR ile belirlenmiştir. Ardından ekstrüzyon tipi 3B biyoyazıcı ile basım için JelMA, HA ve NS içeren biyomürekkeplerin yazdırılabilirlikleri değerlendirilmiş ve biyomürekkep optimizasyonları yapılmıştır. Basım sonrası elde edilen yapılar UV ile çapraz bağlanmıştır. Hazırlanan doku iskelelerinin mekanik özellikleri, yüzey topografileri, degredasyon ve şişme davranışları değerlendirilmiştir. Hazırlanan optimum nanokompozit doku iskelelerine vankomisin yüklenmiş ve *in vitro* etken madde serbestleştirme özellikleri ve salım kinetikleri değerlendirilmiştir.

Bulgular: JelMA, HA ve NS nanokompozit doku iskelelerinin basım optimizasyonu başarı ile tamamlanmıştır. Doku iskelelerinin mekanik dayanıklılıkları JelMA ve NS oranının yükselmesi ile artmış, HA oranının yükselmesi ile azalmıştır. Degredasyon davranışları ise artan JelMA ve NS oranı ile uzamış, artan HA oranı ile ise azalmıştır. *In vitro* salım çalışmalarında tüm doku iskelelerinin uzatılmış salım gösterdiği ve salımın Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modellerine uygun olduğu anlaşılmıştır.

Sonuç: Çalışma kapsamında optimize edilen biyomürekkepler başarı ile üç boyutlu biyoyazıcı ile basılarak doku iskeleleri hazırlamıştır.

Anahtar kelimeler: Biyoyazıcı, biyomürekkep, vankomisin, nanokompozit hidrojel, ilaç taşıyıcı

2. SUMMARY

Preparation and In Vitro Characterization of Scaffolds Containing Antibiotics for the Treatment of Osteomyelitis

Student Name: Burcu AĞIRMAN

Name of Supervisor: Assist. Prof. Dr. Emine ALARÇİN

Objective: In this study, preparation and in vitro characterization of vancomycin containing gelatin methacrylate (JelMA), Hyaluronic acid (HA) and nanosilica (NS) nanocomposite scaffolds for the treatment of osteomyelitis were aimed.

Material and methods: In the first stage of the study, GelMA was synthesized and its structure was determined by FTIR and 1H NMR. Then, the printability of the bioinks containing GelMA, HA and NS for printing with an extrusion type 3D bioprinter was evaluated and bioink optimizations were made. The structures obtained after printing were crosslinked with UV. The mechanical properties, surface topography, degradation and swelling behavior of the prepared scaffolds were evaluated. Vancomycin was loaded onto the prepared optimum nanocomposite scaffolds and their in vitro drug release properties and release kinetics were evaluated.

Results: Compression optimization of JelMA, HA and NS nanocomposite scaffolds has been successfully completed. The mechanical strength of the scaffolds increased with the increase of the ratio of JelMA and NS, and decreased with the increase of the ratio of HA. The degradation behaviors were prolonged with increasing GelMA and NS ratios and decreased with increasing HA ratios. In in vitro release studies, it was understood that all scaffolds showed prolonged release and the release was in accordance with Higuchi and Korsmeyer-Peppas Models.

Conclusion: The optimized bioinks within the scope of the study were successfully printed with a three-dimensional bioprinter and prepared tissue scaffolds.

Keywords: Bioprinter, bioinks, vancomycin, nanocomposite hydrogel, drug delivery

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Osteomiyelit, enfeksiyona neden olan bir mikroorganizmadan kaynaklanan kemik yıkımının eşlik ettiği inflamatuar bir süreçtir. Oluşan enfeksiyon kemiğin tek bir kısmı ile sınırlı olabilir veya kemik iliği, korteks, periosta ve çevresindeki yumuşak doku gibi birkaç bölgeyi kapsayabilir. Progresif kemik yıkımı, şiddetli inflamasyon ve kemik neoformasyonu ile karakterizedir (Lew ve Waldvogel, 2004) (Jin ve ark., 2013) (Putnam ve ark., 2019). Güncel osteomiyelit tedavisi, antimikrobiyal tedavi, oluşan ölü boşluğun yönetimi ve kemiğin stabilizasyonunu içerir (Carek ve ark., 2001; Dhanoa ve ark., 2012; Jin ve ark., 2013). Otolog kemik greftleri ölü alan yönetimi için altın standarttır, ancak mevcut donör eksikliği, donör bölgesinde morbidite, kanama, postoperatif ağrı ve enfeksiyon riski gibi sınırlamaları vardır (Kavanagh ve ark., 2018; Oryan ve ark., 2014; Roberts ve Rosenbaum, 2012). Sistemik antibiyotik tedavisi ise lokal enfeksiyon bölgesine zayıf penetrasyonu nedeniyle istenen miktarda etkin bir tedavi sağlayamamaktadır (Anagnostakos ve ark., 2009). Yüksek doz ve uzun süreli sistemik antibiyotik tedavisi, ilaç direncinin gelişmesine neden olabilmektedir (Barrett ve ark., 2014). Lokal antibiyotik tedavisi, bu dezavantajlar için en çok açıklanan stratejilerden biridir (El-Husseiny ve ark., 2011; Gauland, 2011; Harle ve Ritzerfeld, 1979; Luo ve ark., 2016). Sonuç olarak osteomiyelit için en uygun tedavi, cerrahi debridman ve lokal antibiyotik salımı sağlayan doku iskelelerinin implantasyonu mümkün olan en iyi tedaviyi sağlayacaktır (Anagnostakos ve ark., 2009; Luo ve ark., 2016).

Bu çalışma kapsamında osteomiyelit tedavisi için ekstrüzyon tabanlı 3B biyobaskı teknolojisi ile hazırlanmak üzere jelatin metakrilat, silika nanopartikülleri ve hyaluronik asit nanokompozit biyomürekkeplerinin tasarlanması ve optimizasyonu amaçlanmıştır. Elde edilen malzeme ölü boşlukları doldurabilen, kemik oluşumunu indükleyen ve lokal olarak antibiyotik serbestleşmesi sağlayan multifonksiyonel bir malzeme olması hedeflenmiştir.

3B biyobaskı, yüksek yapısal karmaşıklığa ve tasarım esnekliğine sahip modüler ve hastaya özgü doku iskelelerinin katman katman birikimini sağlayan bir ek üretim tekniğidir. Bu teknik, doku iskelelerinin mimarisi üzerinde doğrudan ve kesin kontrol

sağlar. Bu teknoloji, bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi yaygın olarak kullanılan tıbbi görüntüleme teknikleriyle yakalanan doku görüntülerine dayanan yapıların bilgisayar ortamında tasarlanmasını ve üretilmesini sağlar. Bu geleneksel imalat teknikleriyle mümkün değildir. Son zamanlarda 3D baskı, kraniofasiyal implantlar, dental kalıplar, kronlar ve implantlar, protez bölümleri, isteğe bağlı tıbbi ekipman, cerrahi modeller, deri ve kemik gibi doku yenilenmesi için iskeleler, organ baskıları, ilaç keşfi için doku modelleri dahil olmak üzere geniş bir uygulama yelpazesi bulmuştur (Guvendiren ve ark. 2016).

Biyobaskı için temel stratejiler, stereolitografi, mürekkep püskürtmeli baskı, ekstrüzyon baskı ve lazer destekli baskıdır (Heinrich ve ark., 2019). Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı, baskı modalitesi, çeşitli biyomürekkepler için kullanımı ve nispeten düşük maliyeti ile öne çıkmaktadır (Liu ve ark. 2017; Mazzocchi ve ark., 2018). Ancak başarılı olarak basılabilen ve biyolojik olarak etkili bir biyomürekkep kombinasyonunun seçimi, biyoyazdırma prosesindeki ana zorluklardan biri olarak kabul edilmektedir (Indurkar ve ark., 2020).

Hidrojeller, doğal hücre dışı matrisin temel özelliklerini ve yüksek oranda su içeren 3B ortamı sağlaması nedeniyle hücreleri ve biyoaktif bileşenleri enkapsüle etmek için umut vermektedir. Ekstrüzyon tipi biyobasım için kolajen, jelatin, jelatin metakrilat (JelMA), ipek fibroin ve aljinat gibi çeşitli doğal hidrojeller kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bununla birlikte, bu biyomürekkepler nispeten zayıf basılabilirlik ve zayıf mekanik özelliklere sahiptir. Hidrojellerin bu sınırlamalarını ortadan kaldırmak için iç içe geçen ve nanokompozit hidrojel yapıları geliştirilmiştir (Chimene ve ark., 2020).

Jelatin, hücre dışı matrisin (ECM) en çok bulunan bileşenlerinden biri olan hidrolitik olarak bozulmuş bir kolajendir. Suda çözünür bir foto başlatıcı kullanılarak oluşturulan foto çaprazlanmış JelMA, doku mühendisliği için kullanılan hidrojellerin içerdiği ilacı ve kardiyak ve vasküler doku mühendisliği uygulamalarında doku kültürü içinde suda çözünür jelatinin stabilitesini arttırır (Hassanzadeh ve ark., 2013).

Çalışma kapsamında JelMA'nın basım ve mekanik özelliklerini güçlendirmek için malzemeye NS ilave edilmiştir. Nanosilikanın kayma ile incelme özelliği başarılı bir

ekstrüzyon için önem taşımaktadır. Negatif yüklü NS, biyomürekkep kompozisyonundaki pozitif yüklü JelMA ile elektrostatik etkileşim oluşturarak, fiziksel olarak çapraz bağlanmaktadır. Böylece malzemenin mekanik, degredasyon ve ilaç serbestleştirme özelliklerini desteklemektedir. Ayrıca NS'nin kemik oluşumunu indüklediği de bilinmektedir (Alarçin ve ark., 2018; Gaharwar ve ark., 2013).

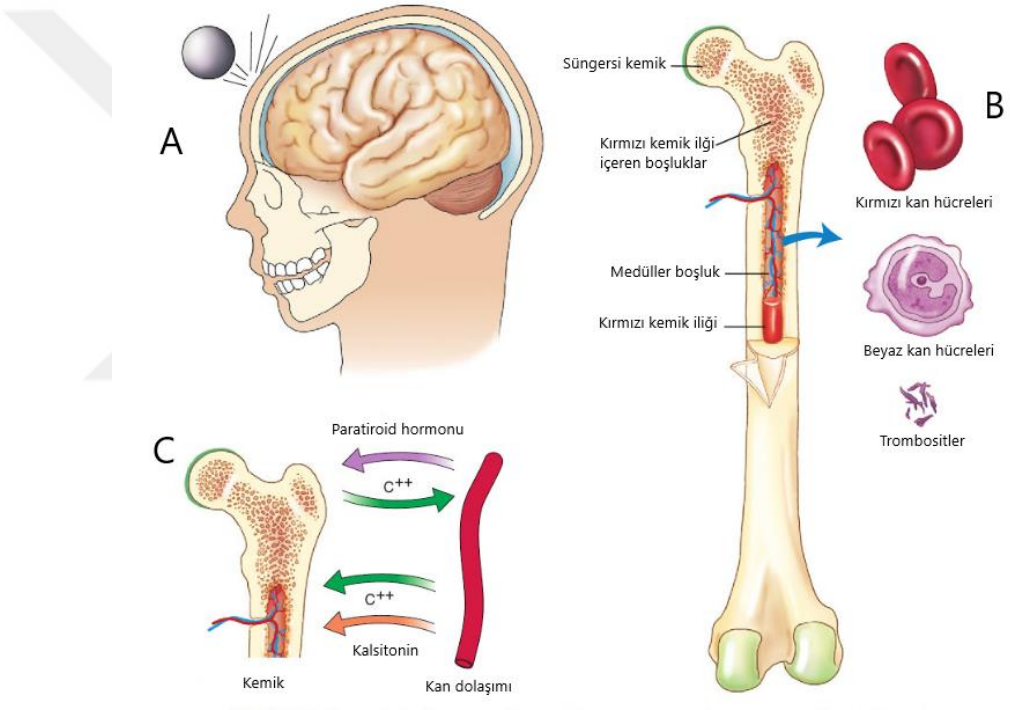
Tez çalışması kapsamında seçilen hyaluronik asit, kemiğin doğal bir bileşenidir ve hücre canlılığını, tutunmasını ve çoğalmasını osteojenik farklılaşmayı, vaskülarizasyonu ve konak entegrasyonunu geliştirmektedir (Martínez-Sanz ve ark., 2011; Silva ve ark., 2018; Tokatlian ve ark., 2012; Juhász ve Marmur, 2015; Amini ve ark., 2012). Ayrıca birçok yaygın ortopedik patojen üzerindeki antimikrobiyal etkileri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (Romanò ve ark., 2017; Ardizzoni ve ark., 2011; Carlson ve ark., 2004; Drago ve ark., 2014).

Çalışma kapsamında öncelikle jelatin metakrilat sentezlenmiştir. Sentezlenen jelatin metakrilatın metakrilasyon derecesi ve fonksiyonel grupları FTIR ve ^{1}H NMR yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Ardından biyomürekkep optimizasyonu aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada öncelikle biyomürekkeplerin biyoyazıcı (Axolotl Biosystems, Türkiye) ile kesintisiz ve muntazam bir yapı oluşturmalarına göre biyobasılabilirlikleri belirlenmiştir. Sonraki aşamada ise basılan biyomürekkeler UV ışığı altında çapraz bağlanmıştır. Doku iskelelerinin yapıları FTIR ile karakterize edilmiştir. Ardından mekaniksel dayanımları belirlenmiştir. Sonrasında yüzey topografileri, degredasyon, şişme davranışları ve *in vitro* etken madde serbestleştirme özellikleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, optimize edilen jelatin metakrilat, nanosilika ve hyaluronik asit hidrojellerinin gerek doku mühendisliği uygulamalarında gerekse ilaç taşıyıcıların hazırlanmasında başarılı olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.Kemik Doku

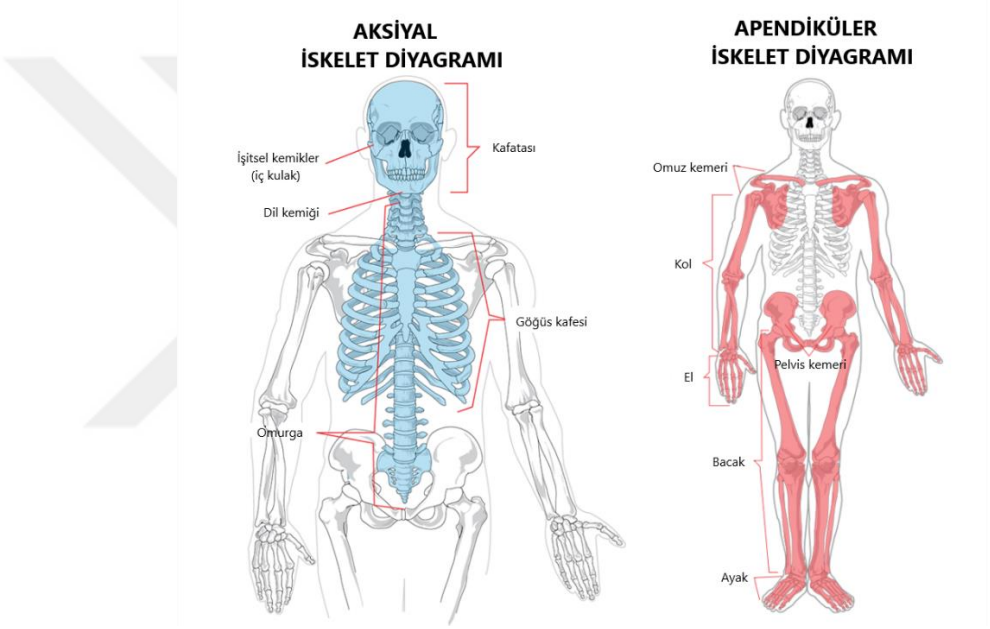
Kemik, çoklu fizyolojik fonksiyonları olan dinamik bir mineralize bağ dokusudur. Organ seviyesinde kemikler, yük taşıma ve hareket yeteneği için mekanik destek ve hassas iç organlara fiziksel koruma sağlar. Kemikler çok çeşitli metabolik fonksiyonlar için gerekli olan ana kalsiyum ve fosfat rezervuarlarıdır (Şekil 1). Ayrıca kemik iliği ve hematopoetik hücrelerin gelişimi için çevresel bir niş sağlarlar (Weiner ve Wagner, 1998; Grabowski, 2009).



Şekil 1. A, Kemikler vücudu dış etkenlerden korur. Başa sert bir nesne çarptığında, kranial kavite içinde yer alan beyin, bu darbenin gücünden, kafatası kemikleri tarafından büyük ölçüde korunur. **B,** Hematopoez (kan hücrelerinin oluşumu); uzun kemiğin medüller boşluğunda bulunan kırmızı kemik iliği kemiğin, kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve trombositleri oluşturma işlevini yerine getirir. **C,** Kemikler, kandaki kalsiyum seviyeleri için bir rezervuar görevi görür. Kandaki kalsiyum seviyesi düştüğünde, vücut, kalsiyumun kemiklerden kan dolaşımına salınmasını sağlayan paratiroid hormonunu salgılar. Kandaki kalsiyum seviyesi yükseldiğinde ise vücut, kan dolaşımındaki aşırı kalsiyumun tekrar kemiklere birikmesini sağlayan kalsitonin hormonunu salgılar (Muscolino, 2011).

Vücudun genel çerçevesi esas olarak, bazı bölgelerde kıkırdak parçalarıyla desteklenmiş bir dizi kemikten oluşur; çerçevenin kemikli kısmı iskeleti oluşturur. Yetişkin insan iskeleti, susamoid kemikleri hariç olmak üzere toplam 206 kemikten oluşur (Gray, 1918).

İnsan iskeletinin kemikleri iki ana gruba ayrılmıştır (Şekil 2). Aksiyel iskelet, vücudun uzun ekseni boyunca tüm kemikleri içerir. Apendiküler iskelet kemikleri ise iskeletin geri kalanını oluşturur Apendiküler iskelette 126 kemik, eksenel iskelette 74 kemik ve 6 işitsel kemik bulunur (Clarke, 2008).



Şekil 2. Aksiyel ve Apendiküler iskelet
(https://en.wikipedia.org/wiki/Appendicular_skeleton,
https://en.wikipedia.org/wiki/Axial_skeleton, Erişim tarihi: 15.10.2020)

Aksiyel iskelet

-Omurga: (26 kemik)

-Kafatası: (22 kemik)

-Dil kemiği: (1 kemik)

-Kaburga ve sternum: (25 kemik)

Apendiküler iskelet

-Üst ekstremiteler (64 kemik)

-Alt ekstremiteler (62 kemik)

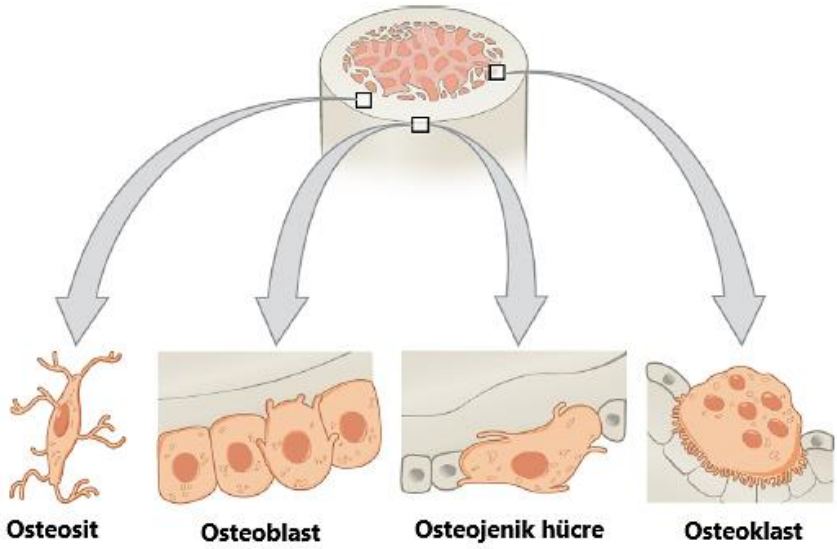
İşitsel kemikler: (6 kemik) (Gray, 1918)

Kemikler şekillerine göre ise majör olarak dört sınıfa ayrılır. Bunlar; uzun, kısa, düz ve düzensiz kemiklerdir (Muscolino, 2011). Uzun kemikler arasında klavikula, humerus, radius, ulna, femur, tibia, fibula, metakarplar, metatarsallar ve fajanlar bulunur. Kısa kemikler arasında karpal ve tarsal kemikleri, patella ve sesamoid kemikleri bulunur. Yassı kemiklere örnek; kafatası, mandibula, kürek kemiği, sternum ve kaburgalardır. Düzensiz kemikler, omurları, sakrum, koksiks ve hyoid kemiğini içerir (Clarke, 2008).

4.1.1.Kemik dokunun yapısı

Kemik, ortak yapıtaşı olarak “mineralize kollajen fibril" içeren biyokompozit bir dokudur. Kemiğe elastikiyet kazandırarak kırılmaları önleyen kollajen, içerisinde veya üzerinde minerallerin bulunduğu üç boyutlu bir matrisin ana bileşenini oluşturur. (Weiner S. ve Wagner H. D., 1998). Organik matris, kollajen tip I liflerden (yaklaşık %95) ve proteoglikanlardan ve çok sayıda kollajen olmayan proteinlerden (%5) oluşur (Barrère F. Ve ark., 2006). Kemiğin yapısında yüksek oranda mineral ve inorganik bileşenler bulunur. Kemiğe sertliğini veren ise karbonatlı apatit olarak da bilinen minerallerdir. Ayrıca, kemikte yaklaşık %25 oranında su bulunmaktadır. Kemiğin belirtilen ana bileşenlerinin oranları ve yapı taşlarının düzenlenme şekli, farklı kemik türleri arasında değişkenlik gösterebilir. Kemikte ayrıca damar dokusu ve hücresel aktivite ürünleri ve büyüme sürecinde bu büyüme sürecini büyük ölçüde düzenleyen hormonlar bulunur (Setiawati ve Rahardjo, 2018; Muscolino, 2011; Tübitak Bilim ve Teknik, 2014, Weiner ve Wagner, 1998).

Kemik hücreleri, kemiklerin işlevi için çok önemlidirler. Kemik dokusunda her biri farklı fonksiyonlara sahip majör dört tip hücre (Şekil 3) bulunur: Osteojenik hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar (Setiawati ve Rahardjo, 2018; Barrère ve ark., 2006).



Şekil 3. Kemik hücreleri; osteosit, osteoblast, osteojenik hücre ve osteoklast (Rice University Textbook, Anatomy and Phsiology, 2017).

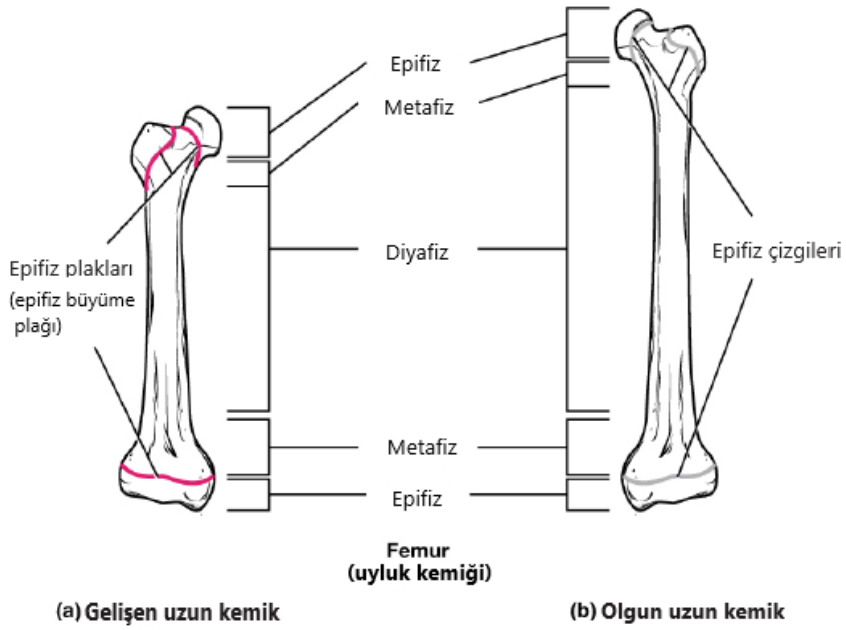
Osteoblastlar, mezenkimal bir kök hücre dizisi olan osteoprogenitör (osteojenik) hücrelerden türetilirler (Setiawati ve Rahardjo, 2018). Yeni kemik oluşturmaktan, kemik matrisinin sentezlenmesinden ve mineralizasyonundan sorumlu olan kemik hücreleridir ve periost (kemik dış zarı) ve endosteum da (kemik iç zarı) dahil olmak üzere büyüyen kemik kısımlarında bulunur (Setiawati ve Rahardjo, 2018; Rice University Textbook, Anatomy and Phsiology, 2017). Osteositler, oluşturdukları kemik içerisinde sıkışıp kalmış aktif olmayan osteoblastlardır (Setiawati ve Rahardjo, 2018). Osteoblastı çevreleyen salgılanan matris kemikleştikçe, osteoblast onun içinde tutulur ve olgun kemiğin primer hücresi ve en yaygın tipte kemik hücresi olan osteosite dönüşür (Rice University Textbook, Anatomy and Phsiology, 2017). Osteoklastlar ise fagositoz yoluyla kemik matrisini yıkmaktadır (Setiawati ve Rahardjo, 2018).

Makroskobik olarak kemikler, kortikal ve trabeküler kemik olarak adlandırılan iki tür dokudan oluşur. Yetişkin insan iskeleti, genel olarak %80 kortikal kemik ve %20 trabeküler kemikten oluşur. Farklı kemikler, farklı oranlarda trabeküler ve kortikal kemik içerir (Clarke, 2008). Kemik iliği alanını çevreleyen, kortikal kemiğin (kompakt kemik) yapısı yoğundur ve sağlamdır (Clarke, 2008). Süngerimsi (trabeküler) kemik ise retiküler bir yapı oluşturmak için birleşen, örgüye benzeyen ince liflerden ve lamellerden oluşmaktadır (Gray, 1918; Huddleston 1988;

Cowin ve Doty, 2006). Kompakt doku ve süngerimsi doku arasındaki yapısal fark, sadece farklı miktarda katı madde miktarına ve her birindeki boşlukların büyüklüğüne ve sayısına bağlıdır; kompakt dokularda oyuklar küçük ve aralarındaki katı madde bolken, süngerimsi dokularda boşluklar büyüktür ve katı madde daha az miktardadır. Bu iki tür dokunun miktarı, farklı kemiklerde ve aynı kemiğin farklı kısımlarında, değişkenlik gösterebilir (Gray, 1918). Kortikal ve trabeküler kemiklerin, hücresel ve moleküler yapıları çok benzer, ancak işlevleri ve mekanik özellikleri önemli farklılıklar gösterir (Grabowski, 2009). Kortikal kemik, en yaygın olarak uzun kemiklerin gövdelerinde bulunur ve etrafındaki osteositleri ve bunların bağlantılı hücresel süreçlerini içeren kan damarları ve kanaliküllerin nüfuz ettiği yoğun bir kompakt dokudan oluşur. Trabeküler veya süngerimsi kemik, uzun kemiklerin ucunda, omurlarda ve eklem yüzeylerinde bulunur ve ince bir kemik ağından ve kemik iliği ile çevrili destek bağlantılarından oluşur (Grabowski, 2009).

Makroskobik olarak uzun kemikler (Şekil 4); içi boş bir gövde (diyafiz), büyüme kıkırdağının altında koni şeklinde metafiz ve büyüme kıkırdağının üstündeki epifizlerden oluşur. Diyafiz esas olarak yoğun kortikal (kompakt) kemikten oluşur, metafiz ve epifiz ise nispeten ince bir kortikal kemik kabuğu ile çevrili trabeküler kemikten oluşur (Clarke, 2008). Diyafizin dışı, kasların, bağların ve tendonların bağlandığı lifli bir dış tabaka olan periosta ile kaplıdır. İçi ise, kortikal ve süngerimsi kemik arasındaki sınırda ve trabeküllerin astarında, endosteum ile kaplıdır (Setiawati ve Rahardjo, 2018).

Periost canlı kemiğin yüzeyinden sıyrılırsa, periosteal damarların girişini gösteren küçük kanama noktaları görülür. Uzuvların uzun kemiklerinin her birinin içi, kemik iliği dolu ve medüller membran denilen oldukça vasküler bir gözenekli yapıyla kaplı, silindirik bir boşluk sunar (Gray, 1918).



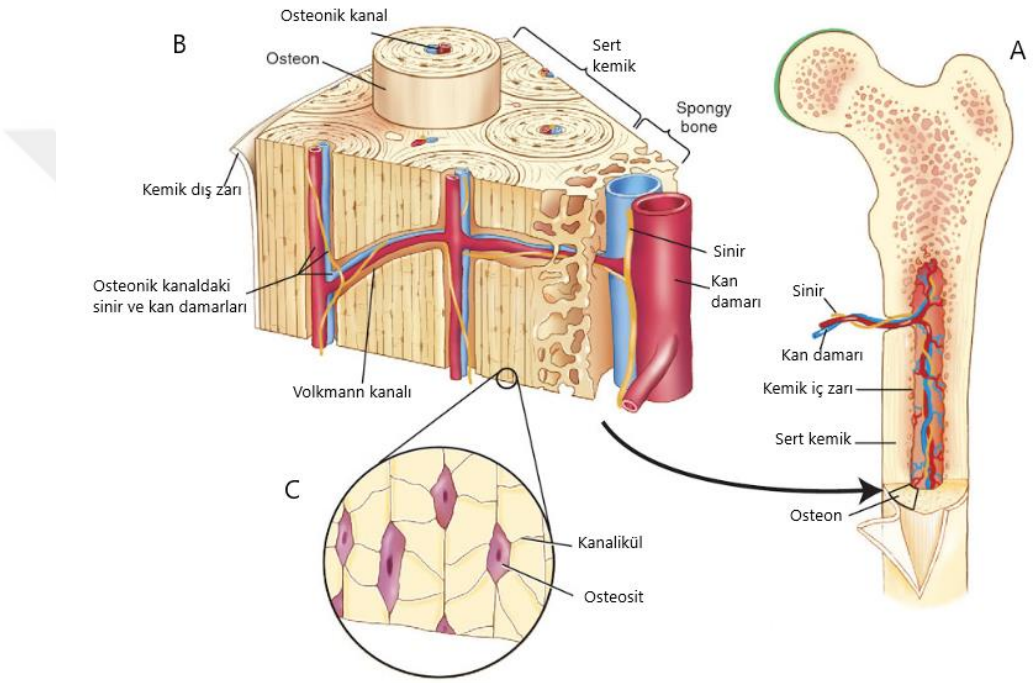
Şekil 4. Kemik makro yapısı. A, Epifiz, epifiz plakları, metafiz ve diyafizi gösteren uzun kemik gelişimi. B, Epifiz çizgileri gösteren olgun uzun kemik (Setiawati ve Rahardjo, 2018).

Mikroskobik olarak bakıldığında kompakt kemik osteon veya Havers sistemi denilen yapısal üniteler içerir (Rice University Textbook, Anatomy and Phsiology, 2017). Kemik, uzun kemiklerin ekseni boyunca aşağıya doğru uzanan Havers sistemleri olarak bilinen paralel sütunlar şeklinde organize olmuştur (Setiawati R. ve Rahardjo, 2018).

Havers sistemleri silindir şeklindedir, yaklaşık 400 mm uzunluğunda ve 200 mm genişliğindedirler ve kortikal kemiğin içinde bir dallanma ağı oluştururlar (Clarke, 2008). Bu sütunlar (osteon) lamellerden, eş merkezli kemik ve matriks halkalarından, merkezi bir kanalı çevreleyen bir kanal yani Havers kanalından oluşur ve sinirleri, kan damarlarını ve kemiğin lenfatik sistemini içerir. Paralel Havers kanalları, dik Volkmann kanalları ile birbirine bağlanır (Clarke, 2008, Setiawati ve Rahardjo, 2018). Bu damarlar ve sinirler, periost ve endosteuma ulaşmak için dik açılar ile Volkmann kanallarının içerisinde dallanırlar (Rice University Textbook, Anatomy and Phsiology, 2017).

Havers sistemlerinin lamelleri osteoblastlar tarafından oluşturulmuştur. Bu hücreler matris salgıladıkça, lakuna denilen alanlarda sıkışıp kaldıklarında osteositler olarak

bilinir (Setiawati ve Rahardjo, 2018). Osteositler, bitişik lamellerin sınırlarında bulunan lakuna (kemik boşluğu) adı verilen alanların içine yerleşmiştir (Şekil 5). Kanaliküller (birbirine bağlı küçük kanallardan geçen sitoplazmik uzantılar), diğer lakunaların kanalikülleriyle ve sonunda merkezi kanal (Havers kanalı) ile bağlanır. Bu sistem besin maddelerinin osteositlere taşınmasını ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlar (Setiawati ve Rahardjo, 2018, Rice University Textbook, Anatomy and Phsiology, 2017).



Şekil 5. A, kemiğin içini gösteren uzun bir kemiğin bölümü. B, kompakt kemiğin osteonlarını ve gövdede bulunan süngerimsi kemiği gösteren uzun kemiğin gövdesinin pasta dilimi şeklinde bir parçasının büyütülmesi. C, Lakuna'yı birbirine bağlayan kanaliküller yoluyla birbirleriyle iletişim kuran osteositleri gösteren kompakt kemik dokusunun daha da büyütülmesi. (Muscolino, 2011)

4.1.2.Kemik oluşumu ve rejenerasyonu

İskeletin gelişimi ve oluşumu (ossifikasyon) iki farklı şekilde oluşur: i) intramembranöz ve ii) endokondral ossifikasyon. Hem intramembranöz hem de endokondral kemik ossifikasyon vasküler büyümeye yakın bir yerde meydana gelir (Kanczler ve Oreffo, 2008). Yassı kemikler, membranöz kemik oluşumu, uzun

kemikler endokondral ve membranöz kemik oluşumu kombinasyonu ile oluşur (Clarke, 2008).

İntramembranöz ossifikasyon, kılcal damarların mezenkimal bölgeye girmesi ve mezenkimal hücrelerin olgun osteoblastlara farklılaşması ile karakterize edilir. Bu osteoblastlar, yapısal olarak kemik spiküllerinin (iğnemsi, diken benzeri uzantılar) oluşumuna yol açan kemik matriksini biriktirir. Bu spiküller büyür ve gelişir ve sonunda trabekül oluşturmak için diğer spiküller ile birleşir. Trabeküllerin büyüklüğü ve sayıları arttıkça, sonunda daha organize, daha güçlü, lamel kemiği ile yer değiştirecek olan yüksek oranda osteosidli düzensiz bir yapı oluşturarak birbirine bağlı hale gelirler (Kanczler ve Oreffo, 2008).

Endokondral ossifikasyon, adından da anlaşılacağı gibi, bir kıkırdak modelinde meydana gelen ossifikasyondur (kondral, kıkırdak anlamına gelir). İnsan vücudunun çoğu kemiği endokondral kemikleşme ile gelişir. Uzun bir kemik için endokondral ossifikasyon adımları aşağıdaki gibidir:

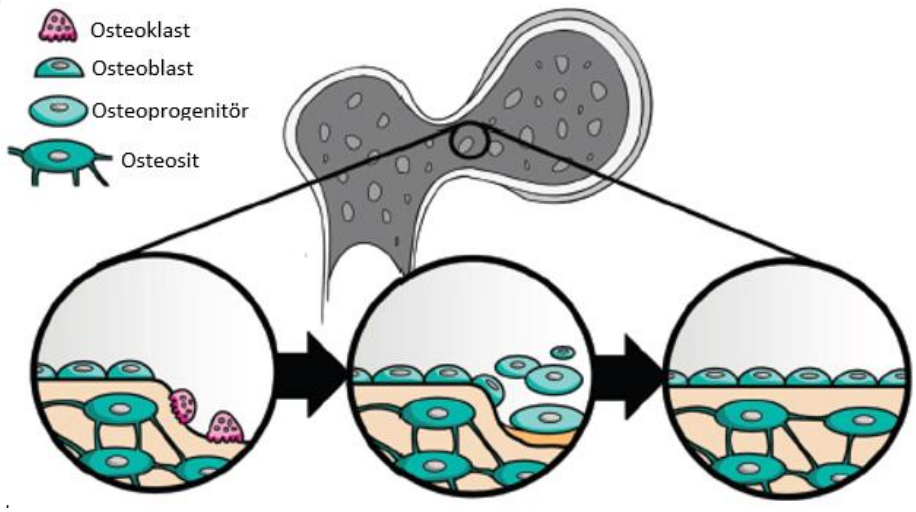
1. Kıkırdak modeli, diyafizi çevreleyen periosteal zarı geliştirir.
2. Diyafizdeki kıkırdak kademeli olarak parçalanır ve periosttaki osteoblastlar tarafından kemik dokusu ile değiştirilir. Gelişmekte olan kemik dokusunun bulunduğu bölgeye ossifikasyon merkezi denir. Diyafizde kemiğin gelişmekte olan bu ilk bölgesine birincil ossifikasyon merkezi denir.
3. Birincil ossifikasyon merkezi yavaş yavaş epifizlere doğru büyür ve kıkırdak yerine kemik konur.
4. İkincil ossifikasyon merkezleri, uzun kemiğin epifizlerinde görünür ve kıkırdak yerine kemik eklenir ve primer ossifikasyon merkezine doğru büyür.
5. Birincil ve ikincil ossifikasyon merkezleri arasındaki bölge, hala, kıkırdak dokusu üreten ve kıkırdak modelinin uzunluğunu arttırmaya devam eden kıkırdak hücreleri içerir. Bu kıkırdak büyümesi bölgesine epifiz diski denir.
6. Bu arada, diyafiz merkezinde, osteoklastlar kemik dokusunu parçalayarak medüller boşluğu oluşturur.

7. Epifiz diski kıkırdağı bırakarak kemiği uzatmaya devam ettikçe, ossifikasyon merkezleri epifiz diski kıkırdağını kemik dokusu ile değiştirerek büyümeye devam eder (Muscolino, 2011).

Doku seviyesinde, kemik oluşumu ve rezorpsiyonunun koordineli aktiviteleri, kemik modellemesi ve yeniden şekillenmesi için mekanizmalar sağlar. Hücresel düzeyde, kemik matrisi oluşumu ve mineralizasyonuna osteoblastlar, kemik rezorpsiyonuna ise osteoklastlar aracılık eder (Grabowski, 2009).

Osteoblast ve osteoklast aktivitesi arasındaki denge kemik dönüşümünü yönetir ve kemiğin fazla üretilmemesini veya aşırı bozulmamasını sağlar (Şekil 6). Bu hücreler, aşağıdakilerden oluşan kemik matrisini oluşturur ve yıkar:

- Tip I kollajen ve glikosaminoglikanlardan (GAG'ler) oluşan, mineralize edilmiş matris olan Osteoid.
- Kalsiyum hidroksiapatit, kemiğe kuvvetini ve sertliğini veren bir kalsiyum tuzu kristali (Setiawati ve Rahardjo, 2018).



Şekil 6. Sol: Osteoklastlar rezorbsiyon yoluyla kemik dokusunu yıkarlar. Orta: Bu sırayla kemik progenitör hücrelerinin bölgeye alınmasına ve osteoblastlara farklılaşmasına neden olurken, osteoblastlar kemik dokusunun yüzeyini kaplar ve çoğalır. Sağ: osteoblastlar kemiği kemikleştirme adı verilen bir işlemle biçimlendirirken, bazıları olgun kemik hücrelerine(osteositlere) farklılaşır (Rupani ve ark., 2012).

4.2. İnflamatuar Hastalıkların Kemik Üzerine Etkisi

Kronik inflamatuar hastalıklar sıklıkla sistemik kemik kaybı ile ilişkilidir. Bu kemik kaybının altında yatan mekanizmalar karmaşık ve birbiriyle ilintilidir. Ayrıca bu mekanizmaların kemiğin yeniden şekillenme döngüsüne etki ettiği bilinmektedir. İnflamatuar hastalıklar kemik rezorpsiyonunu artırabilir, kemik oluşumunu azaltabilir, ancak sıklıkla bu işlemlerin her ikisini de etkiler (Hardy ve Cooper, 2009).

Romatoid artrit, eklem kıkırdağının tahribatı ve aşırı subkondral osteoklastik kemik rezorpsiyonu ile karakterizedir. İnflamatuar durumda, romatoid sinoviyal membranda (osteoklastlara farklılaşan) makrofajlar birikir. Burada, birçok osteoklastojenik sitokin vardır. Romatoid sinovyal fibroblastların, osteoklast oluşumunu desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca bazı stokinlerin insan romatoid sinovyum invitro ve indüklenen artritli farelerde proinflamatuar etkileri izlenmiştir (Rodan ve Martin, 2000).

En yaygın kemik hastalıklarından biri olan periyodontit, diş plağına neden olan bakteri birikiminin periodontiyumun hücresel ve yapısal bileşenlerinin tahrip olmasına yol açtığı periodontal bir hastalıktır (Rodan ve Martin, 2000).

Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, aksiyel spondilartrit ve psoriatik artrit, inflamatuar barsak hastalığı, çölyak hastalığı, kistik fibrozis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve periyodontit gibi çeşitli kronik inflamatuar hastalıklar sistemik osteoporoz ve kemiklerde kırık gibi bazı sorunlara sebep olabilir. Periodontitte hem lokal hem de sistemik kemik kaybı bildirilmiştir. Periodontit, insanlarda en sık görülen kronik hastalıklardan biridir ve çeşitli bakteri türleriyle subgingival enfeksiyonlarla ortaya çıkar (Redlich ve Smolen, 2012).

Kemik kaybı ve bunların onarımı ortopedi ve ilgili uzmanlık alanlarındaki önemli konulardır. Travmatik yaralanma, kemik enfeksiyonu, osteonekroz, artrit, osteoporoz, omurga füzyonu, osteoekroz, artrit, osteoporoz, omurga füzyonu, kemikle ilişkili partikül aşınması hastalarının tedavisi için kemik kaybı ve onarımının temel prensiplerinin anlaşılması önemlidir. Kemik kaybı ve onarımı konusunun klinik ve ekonomik önemi büyüktür (Loi ve ark., 2016).

ABD'de her yıl yaklaşık 100.000 nonünyon kırık (kırık kemik uçlarının gerekli şekilde kaynama gösterememesi) gelişmektedir. Bu kırıklar için tıbbi bakım 2025 yılına kadar 25 milyar dolardan fazlaya mal olacağı düşünülmektedir. Kemik defektlerini onarmak veya sağlam bir füzyon elde etmek için otogreft veya allogreft kemiği kullanan cerrahi vakaların sayısı, dünya çapında yıl başına toplam 2.2 milyon ve ABD'de yaklaşık 1.5 milyon vakadır. Sonuç olarak, kemik kaybı ve onarımı sosyal ve ekonomik olarak oldukça büyük bir yük oluşturmaktadır. Bu nedenle etiyoloji, biyolojik mekanizmalar, kırığın önlenmesi ve kemiğin iyileşmesi için yöntemler hakkında daha derin bir anlayışa ihtiyaç vardır (Loi ve ark., 2016).

4.3. Osteomiyelit

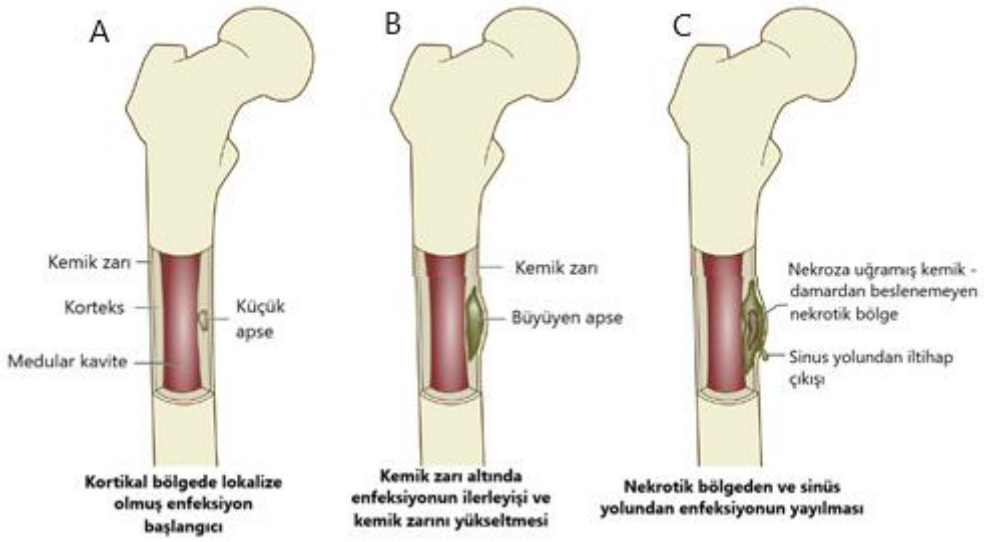
Osteomiyelit, yüz milyonlarca yıl önce fosilleşmiş şekilde hayvan enfeksiyonu olarak bulunan eski bir hastalıktır. İnsan osteomiyelitinin tartışılması Hipokrat döneminde olmuştur (M.Ö. 460–370). Akut hematojen osteomiyelit, 1773'te Broomfield tarafından “medullada apse” olarak adlandırılmıştır. 1844'te “osteomiyelit” terimi, Nelaton'a atfedilmiştir (Schmitt, 2017).

Osteomiyelit, kemik yıkımının eşlik ettiği ve enfeksiyona neden olan bir mikroorganizmanın neden olduğu inflamatuar bir süreçtir. Kemik steril bir organ sistemidir, ancak bakteriler sağlıklı kemiğe doğrudan yayılma, hematojen yayılma veya birleşik bir enfeksiyon odağından ulaşabilir. Osteomiyelit veya kemik iltihabı, en yaygın olarak invaziv bakteriyel enfeksiyondan kaynaklanır. Enfeksiyon kemiğin tek bir kısmı ile sınırlı olabilir veya kemik iliği, korteks, periosta ve çevresindeki yumuşak doku gibi birkaç bölgeyi kapsayabilir (Şekil 7). Progresif kemik yıkımı, şiddetli inflamasyon ve kemik neoformasyonu ile karakterizedir (Lew ve Waldvogel, 2004) (Jin ve ark., 2013) (Putnam ve ark., 2019).

Kemik yeniden şekillenmesinin normal omurgalı fizyolojisinin bir parçası olarak meydana geldiği doğrudur fakat kemiğin yeniden şekillenmesinin kinetiği, lokal ve sistemik inflamasyona yanıt olarak büyük ölçüde değişebilir. Özellikle osteomiyelit, TNFa, IL-1β ve IL-6 gibi bol miktarda proinflamatuar sitokin seviyeleri ile ilişkilidir. Bu pro-inflamatuar sitokinlerin, hem doğrudan osteoklastları uyararak hem de

dolaylı olarak osteoklastogenezi yönlendirmek için RANKL'ın osteoblast üretimini teşvik ederek iskelet hücresi farklılaşmasını in vitro olarak desteklediği gösterilmiştir (Birt ve ar., 2017; Berendt ve Byren, 2004; Haas ve McAndrew, 1996; Lew ve Waldvogel, 2004; Putnam ve ark., 2019).

Osteomiyelitten, aralarında Staphylococcus aureus'un (S. aureus) ana etken olduğu çok çeşitli bakteri türleri izole edilmiştir. S. aureus, kültür pozitif vakaların %38 ila %67'sinde tanımlanmıştır (Jin ve ark., 2013). S. aureus, hem akut hem de kronik bakteriyel osteomiyelitin en sık izole edilen etiyolojik ajanıdır. S. aureus hematojen yayılım, cerrahi veya kaza sonucu travmayı takiben kemiğin kontaminasyonu veya çevredeki yumuşak doku enfeksiyonundan doğrudan yayılma yoluyla kemiğe kolonize olabilir. Kemik, sürekli olarak osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından dönüşüme uğradığından, istilacı bakteriyel patojenler için benzersiz bir alandır. Kemik iliği lenfositlere ve miyeloid hücreleri oluşturan hematopoietik kök hücreler barındırdığından, ayırt edici bir immünolojik nişi temsil eder (Birt ve ar., 2017; Berendt ve Byren, 2004; Haas ve McAndrew, 1996; Lew ve Waldvogel, 2004; Putnam ve ark., 2019).



Şekil 7. Osteomiyelitin ilerlemesi. **A,** bir apse, bölgeye kan akışını daraltan lokalize bir enfeksiyondan gelişir. **B,** sekestrum adı verilen nekrotik kemik dokusunun avasküler bölgesinde ortaya çıkar. **C,** ardından sekestrumu çevreleyen yeni kemiğin gelişimi, aynı zamanda pürülanın kaçabileceği bir sinüs yoluna sahip olabilen entukrum olarak adlandırılır (Kavanagh ve ark., 2018).

Antibiyotik öncesi çağda osteomiyelit tedavisi, debridmandan oluşan bakım standardı, kaviteyi açmak için etrafındaki deriyi ve dokuyu oyma işlemi ve sekonder iyileşmeyle yara doldurma işlemini içerecek şekilde cerrahi olarak uygulanmıştır. 1940'larda penisilinin geliştirilmesiyle birlikte, stafilokokal osteomiyelit kaynaklı mortalite %30'dan %10'a düşmüştür (Schmitt, 2017).

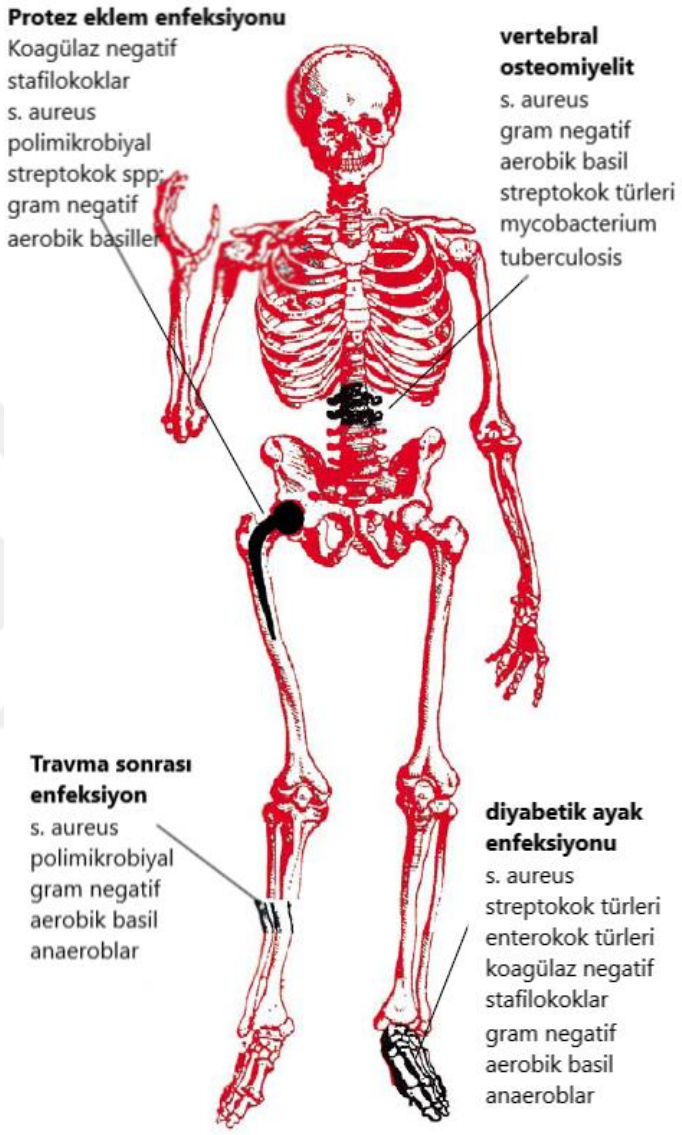
Osteomiyelitte; hematojen osteomiyelit, vertebral osteomiyelit, travma sonrası osteomiyelit ve diyabetik ayak enfeksiyonu dahil olmak üzere (Şekil 8) birçok majör sendrom görülür (Schmitt, 2017).

Travma, kemik ameliyatı veya eklem replasmanı devamında görülen, bitişik kontamine bir enfeksiyon kaynağındaki lokal yayılmaya bağlı osteomiyelit her yaşta ortaya çıkabilir ve herhangi bir kemikte görülebilir. Bu tip hastalarda, yabancı cisim implantı yapılmış olan hastaların tanımlanması hem enfeksiyona karşı yüksek duyarlılıklarından hem de tedavilerinin zorluğundan dolayı önemlidir (Lew ve Waldvogel, 2004). Osteomiyelit, açık kırıkların kontaminasyonu veya kapalı kırıkların açık onarımı sonucu da oluşabilir. Açık kırıkların %25'inde enfeksiyon gelişebilmektedir. Enfeksiyon gelişimi; kırığın şiddeti, yumuşak doku hasarının şiddeti, bakteriyel kontaminasyon, vaskülarizasyon derecesi, debridmanın yeterliliği ve profilaktik antibiyotiklerin verilmesi gibi faktörlere bağlıdır (Schmitt, 2017).

Diyabetli kişilerde diyabetin metabolik sonuçları, kemik ve yumuşak doku iskemisi ve nöropati gibi faktörler osteomiyelit gelişimine neden olabilir. Diyabet varlığında vasküler yetmezliğe bağlı görülen osteomiyelitte hemen hemen tüm vakalarda kemiğe yayılan bir ayak yumuşak doku enfeksiyonu gözlenmektedir (Lew ve Waldvogel, 2004).

Hematojen osteomiyelit, çoğunlukla prepubertal çocuklarda ve yaşlı hastalarda görülmektedir. Hematojen osteomiyelit kanda bulunan bakterilerin sadece hafif yaralanmış bir kemik içine yuvalanması ile karakterize edilir (Lew ve Waldvogel, 2004). Çocuklar en sık olarak hematojen yoldan osteomiyelit edinir. Vakaların yarısından fazlası 5 yaşından önce ortaya çıkar ve sıklıkla uzun kemikler etkilenir. Yeni doğanlarda enfeksiyonlar kalıcı damar kateterleri, anormal idrar anatomisi ve

cilt veya yumuşak doku enfeksiyonu sebepli bakteremi ile ilişkilidir. Üç aylıktan büyük çocuklarda orak hücre hastalığı ve hastalığa veya tedaviye bağlı immün yetmezlik de rol oynayabilir (Schmitt, 2017).



Şekil 8. Çeşitli osteomyelitlerde mikrobiyoloji. Mikroorganizmalar yüksek ila düşük prevalans veya göreceli epidemiyolojik öneme sahiptir (Lew ve Waldvogel, 2004).

Akut osteomiyelit birkaç gün veya haftada gelişebilirken, kronik osteomiyelit ise aylara veya hatta yıllara uzanan bir süreçte gelişir. Kronik osteomiyelit mikroorganizmaların kalıcılığı, düşük dereceli iltihaplanma ve ölü kemik izlerinin varlığı ile karakterize, uzun süreli enfeksiyon olarak tanımlanabilir., Aynı bölgede ve

eşlik eden ateşe bağlı relapslar, kronik osteomiyelitin açık bir işaretidir. On günden uzun süren klinik bulgular nekrotik kemik ve kronik osteomiyelit gelişimi ile ilişkilidir (Lew ve Waldvogel, 2004).

4.4. Osteomiyelit Tedavi Yaklaşımları

4.4.1 Osteomiyelitin önlenmesi ve tedavisinde genel prensipler

Osteomiyelit tedavisi, enfekte olmamış, ağrısız bir fonksiyon hedefine ulaşmak için hasta değerlendirmesi, antibiyotik tedavisi ve cerrahi müdahaleyi içeren disiplinler arası bir yaklaşım gerektirir. Birleştirilmiş ve etkili bir tedavi planı oluşturmak için cerrah ve bulaşıcı hastalıklar uzmanı arasındaki iletişim ve koordinasyon esastır (Kavanagh ve ark., 2018, Schmitt, 2017). Tüm osteomiyelit vakalarında kombine bir antimikrobiyal ve cerrahi yaklaşım düşünülmelidir (Lew ve Waldvogel, 2004). Antibiyotikler ölü veya yaralı kemiğe ve vücutta toplanan enfekte sıvılara zayıf nüfuz ettiğinden, cerrahi debridman tedavinin temel taşıdır (Schmitt, 2017,).

S. aureus ve S. epidermidis, doğal kemik ve eklem enfeksiyonlarının en yaygın etiyolojik ajanları olmaya devam etse de, osteomiyelitin ampirik tedavisi, optimal antimikrobiyal seçime izin vermek için kültür numuneleri elde edilinceye kadar (mümkün olduğunda) ertelenmelidir. Teşhis için altın standart kemik biyopsisidir. Tedavi edilecek bir organizma bulduktan sonra, duyarlılık testinin sonuçları, optimal ajan seçimi, yol ve tedavi süresi hakkında bilgi verebilir (Kavanagh ve ark., 2018).

Cerrahi debridman etkilenen kemik ve yumuşak dokuya antibiyotiklerin girmesini kolaylaştırmanın yanı sıra, antibiyotik tedavisini yönlendirmek için derin doku kültürü verileri elde etme fırsatı verir. Debridmandan sonra kemikte, varsa kırılma ve kaynamama tespit edilir. Devamında ise çeşitli formülasyon stratejileri ile lokal antibiyotik uygulanabilir. Bunun için antibiyotik içeren boncuklar veya polimetilmetakrilat ara dolgular kullanılmıştır. Son olarak, flep yerleştirme için ölü boşluk açığa çıkarılabilir (Schmitt, 2017, Kavanagh ve ark., 2018).

Osteomiyelit tedavisi için kabul edilen tedavi prensipleri hakkında çok az nesnel kanıt vardır ve büyük ve kapsamlı çalışmalar eksiktir. Tedavinin süresi ve yolu

hakkında çeşitli tavsiyeler ve intravenöz / parenteral tedavinin oral tedaviye üstünlüğü konusunda tartışmalar devam etmektedir. Yetişkinlerde akut osteomiyelit tedavisi için Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (ECCMID, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) kılavuzu yoktur, ancak İtalyan Enfeksiyon Tropikal Hastalıklar Derneği (SIMIT-Italian society of infectious and tropical disease) Kemik Eklem Enfeksiyon Komitesi kılavuzları İngilizce olarak yayınlanır ve klinisyenler için faydalı rehberlik sağlayabilir. Prostetik eklem enfeksiyonu ve vertebral osteomiyelit tedavisi için yaygın olarak kabul edilen ve kullanılan Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA- Infectious Diseases Society of America) tedavi uygulama kılavuzları vardır, ancak akut osteomiyelit için özel tedavi kılavuzları hala oluşturulmamıştır. Akut osteomiyelit tedavisi zor olabilir ve çoğunlukla uzman görüşüne dayanır (Kavanagh ve ark., 2018).

4.4.2 Ölü alan yönetimi

Enfekte olmuş bölgenin debridmanından sonra, ölü alan olarak adlandırılan bir alan kalır. Ölü alan yönetimi tipik olarak, genellikle pelvik iliak krestinden otolog veya otojen kemik greftlerinin toplanmasını ve ardından defekt bölgesine implantasyonu içerir. Otolog kemik greftleri iyileşmeyi teşvik etmek için altın standart olarak görülür ve yılda yaklaşık 2,2 milyon operasyon olduğu tahmin edilmektedir. Bu tür greftler osteojenite, osteoindüktivite ve osteokondüktivite açısından optimum biyolojik performansa sahiptir. Bununla birlikte, otolog kemik greftlerinin kullanımı, donör bölgesinde morbidite, postoperatif ağrı ve enfeksiyon riski ve mevcut doku eksikliği ile sınırlıdır (Kavanagh ve ark., 2018). Allojenik kemik greftleri de sıklıkla sterilize kadavra kemiğinin nakli ile yapılır. Bununla birlikte, viral bulaşma ve immün reddi sorunları nedeniyle de sınırlıdır (Oryan ve ark., 2014; Roberts ve Rosenbaum, 2012; Kavanagh ve ark., 2018).

Ölü alanı yönetmek için kullanılan diğer bir yöntem, kas fleplerinin kullanılmasıdır. Bu yöntem, işlenebilirlik, yoğun bir kılcal ağ ve hızlı kollajen birikiminin teşvik edilmesi gibi birçok avantaja sahiptir. Anthony ve ark. bu stratejiyi kullanarak 34 hastada %96 başarı göstermiştir. Bununla birlikte, dezavantajları, kas flebin

enfeksiyonuna neden olabilecek kronik osteomiyelit vakalarında tekrarlayan enfeksiyonu içerir (Anthony ve ark., 1991).

Osteomiyelit için uygun tedavi, cerrahi debridman ve lokal antibiyotik uygulaması ile ölü alanın ortadan kaldırılmasını gerektirmektedir. Ölü dokuların uzaklaştırılması dolayısıyla ortaya çıkan boşlukların yerine, antibiyotik salımı sağlayan doku iskelelerinin implantasyonu mümkün olan en iyi tedaviyi sağlayacaktır (Anagnostakos ve ark., 2009; Luo ve ark., 2016).

4.4.3 Antimikrobiyal tedavi ve uygulama yolları seçimi

Tedavide kullanılacak ajan, antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçları ile yönlendirilmelidir. En önemli duyarlılık ayrımı, metisilin duyarlı veya dirençli (MSSA / MSSE veya MRSA / MRSE) S. aureus veya S. epidermidis'in dahil olup olmadığını tanımlayan oksasilin / metisilin duyarlılığı sonucudur. Seçilen tedavi yönteminin başarısının bir göstergesi, eritrosit sedimantasyon hızındaki (ESR) ve C-reaktif protein seviyesindeki azalmalar ile verilebilir (Gordon ve ark., 2014; Spellberg ve Lipsky, 2012; Kavanagh ve ark., 2018).

Etkilenen bölgenin cerrahi kontrolü tamamlandıktan sonra etkili antibiyotik tedavisi uygulanabilir. Vankomisin ve üçüncü kuşak sefalosporin veya beta laktam / beta-laktamaz inhibitör kombinasyonu, geniş gram-pozitif ve gram-negatif kapsama alanı sağlar ve kültür verisi bekleyen en yaygın ampirik rejimdir. Metisiline duyarlı stafilokoklar kültürlerden izole edildiğinde, oksasilin veya nafsilin gibi penisilinaza dirençli penisilinler veya sefazolin gibi bir birinci nesil sefalosporin yaygın olarak kullanılır. İzole edilmiş stafilokoklar metisiline dirençli olduğunda, vankomisin en sık kullanılan ajandır. Daptomisin, linezolid, seftarolin, dalbavankin ve televizyonankin gibi yeni ajanların kullanımına ilişkin veriler ortaya çıkmaktadır. Penisiline duyarlı streptokoklar veya enterokoklar için penisilin G ve ampisilin kullanılır. Duyarlı olan gram-negatif basiller için, uzun süreli intravenöz tedavi için seftriakson veya ertapenem günde bir kez uygulanabilir. Pseudomonas aeruginosa izole edildiğinde sefepim, seftazidim veya meropenem intravenöz seçimlerdir (Schmitt, 2017).

Tablo 1. Yetişkinlerde osteomiyelitin antibiyotik tedavisi (Lew ve Waldvogel, 2004)

İzole edilen mikroorganizmalar	Seçilmiş Tedavi	Alternatifleri
Penisiline duyarlı Staph aureus	Benzilpenisilin (günde 12–20 milyon ünite)	Sefazolin (1 g her 6 saatte bir) Klindamisin (6 saatte bir 600 mg) Vankomisin (1 g her 12 saatte bir)
Penisiline dirençli Staph aureus	Nafcillin* (1,0 veya 1,5 g her 4-6 saatte bir) veya sefazolin (2 g her 8 saatte bir)	İkinci kuşak sefalosporin (örn. sefuroksim, sefamandol) Klindamisin (6 saatte bir 600 mg) Vankomisin (1 g her 12 saatte bir) Siprofloksasin (12 saatte bir ağızdan 750 mg) veya rifampisin ile kombinasyon halinde levofloksasin (günde 600 mg) da sıklıkla kullanılır.
Metisiline dirençli S. aureus**	Vankomisin (12 saatte bir 1 g)	Teikoplanin (24 saatte bir 400 g, ilk gün 12 saatte bir)
Çeşitli streptokoklar (A grubu veya B -beta hemolitik; Strep pnömoni)	Benzilpenisilin (günde 12–20 milyon ünite)	Klindamisin (6 saatte bir 600 mg) Eritromisin (6 saatte bir 500 mg) Vankomisin (1 g her 12 saatte bir)
Enterik gram negatif basil	Kinolon (örn. Siprofloksasin, Her 12 saatte bir 400-750 mg; oral kullanıma erken geçiş ile)	Üçüncü kuşak sefalosporin (örn., seftriakson 2 g her 24 saatte bir; sefapim)

Serratia sp; Pseudomonas aeruginosa	Piperasilin*** (4 saatte bir 2–4 g) ve aminoglikozitler	Sefepim 12 saatte bir 2 g g veya bir kinolon ve aminoglikozitler (duyarlılığa göre günde bir doz)
Anaeroblar	Klindamisin (6 saatte bir 600 mg)	Ampisilin-sulbaktam (2 g her 8 saatte bir) Gram negatif anaeroblar için metronidazol (8 saatte bir 500 mg)
Karışık enfeksiyon (aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar)	Ampisilin-sulbaktam (2–3 g her 6–8 saatte bir)****	Imipenem (6 saatte bir 500 mg)*****

Tüm dozlar normal böbrek/karaciğer fonksiyonu için verilmiştir ve böbrek veya karaciğer yetmezliğinde ayarlanmalıdır. Aksi belirtilmedikçe tedavi intravenözdür. Teikoplanin şu anda yalnızca Avrupa'da mevcuttur. *Avrupa'da flukloksasilin, oksasilin veya kloksasilin. **Koagülaz negatif stafilokokların çoğu metisiline dirençlidir ve vankomisin veya teikoplanin ile tedavi edilir. ***Hassasiyete göre değişir; dördüncü kuşak sefalosporin (sefepim), piperasilin/tazobaktam, meropenem ve imipenem faydalı alternatiflerdir. ****Amoksisilin-klavulanat Avrupa'da (1.2–2.2 g her 6–8 saatte bir). *****Amoksisilin-klavulanata dirençli aerobik gram-negatif mikroorganizmalarda.

Osteomiyelit için tek bir antibiyotik veya ajan kombinasyonunun kullanılmasını öneren iyi randomize, klinik çalışmalar yoktur ve bu eksiklik pratikte önemli ölçüde farklılıklara yol açmıştır. Antimikrobiyal tedavi, herhangi bir tipteki akut osteomiyelit vakalarının çoğunun tedavisi için yeterlidir. Tek ajanlı antimikrobiyal tedavi, protez eklem enfeksiyonları (rifampisin dahil antimikrobiyal bir kombinasyonun yaygın olarak kullanıldığı) hariç oseomiyelit ve kronik osteomiyelit için genellikle yeterlidir. Genel bir ilke olarak, bu antibiyotikler mümkünse intravenöz yoldan 4-6 hafta süreyle verilmelidir (Lew ve Waldvoge, 2004).

S. aureus'un neden olduğu osteomiyelit için şu anda önerilen tedavi, parenteral olarak uygulanan yarı sentetik bir penisilin veya vankomisinin uzun süreli uygulamasıdır. Bununla birlikte, bu tedavi hastanede uzun süre kalmayla ilişkili komplikasyonlar ve intravenöz kateter kullanımı nedeniyle olumsuz olayların yanı sıra uzun süreli

hastanede kalıştan kaynaklanan kişisel ve ekonomik maliyetler de taşır (Lew ve Waldvogel, 2004).

Düşük maliyeti nedeniyle kabul gören yaklaşım ayakta tedavi gören hastaya antibiyotiklerin parenteral yoldan uygulanmasıdır. Ancak bu yöntem de çeşitli zorluklar içerir (Tice ve ark., 2003; Osmon ve Berbari, 2002). Örneğin seftriakson gibi beta laktamların intravenöz uygulaması sonucu kemiğe sadece serum konsantrasyonlarının yaklaşık %10-20'si nüfuz edebilir. Seftriakson intravenöz olarak uygulanması ise çok yüksek serum konsantrasyonları verir, bu nedenle kemikteki konsantrasyonları tedaviye duyarlı izolatların minimum inhibitör konsantrasyonunu çok aşar. Uzun serum ve kemik yarı ömrü, ayaktan parenteral tedavi için yararlı bir özellik olan bir kerede dozlamaya izin verir. Bu kolaylık, S. aureus kemik enfeksiyonu için seftriaksonun dahil edilmesini yararlı kılar, ancak bu endikasyon için birincil bir ajan değildir ve istenenden daha geniş bir aralığa sahiptir (Lew ve Waldvogel, 2004). Metisiline dirençli S. aureus (MRSA) veya birçok etkin maddeye dirençli olan gram negatif basiller ile hastane enfeksiyonları, glikopeptidler veya geniş spektrumlu antibiyotiklerle uzun süreli intravenöz tedaviyi gerektirir. Bu amaçla, ayakta parenteral olarak tedavi edilen hastalarda, sürekli vankomisin perfüzyonları MRSA osteomiyelitinde umut verici bir yaklaşımdır (Ariza ve ark., 1999; Bernard ve ark., 2001; Bernard ve ark., 2004).

Nekrotik bölgeye ulaşmak ve enfeksiyonu temizlemek için yeterince yüksek bir antibiyotik dozunun sistemik olarak verilmesi, genellikle toksisite ile sonuçlanır. Bu nedenle, son yıllarda eşzamanlı olarak kemik yenileyerek enfeksiyon bölgesine lokal antibiyotik verilmesine odaklanan birkaç ürün ortaya çıkmıştır (Kavanagh ve ark., 2018).

4.4.4. Lokal antibiyotik taşıyıcı stratejileri

Piyasada, genel olarak taşıyıcının biyoparçalanabilirlik derecesine göre sınıflandırılmış ve malzeme tipi, antibiyotik tipi ve salım şekline göre değişiklik gösterebilen bir dizi ürün vardır. Sonuçta tüm yaklaşımlar sistemik antibiyotiklere bağımlılığı azaltmayı, hastanede yatış maliyetlerini azaltmayı ve en önemlisi kronik osteomiyelitte sık görülen geç relapsı önlemeyi amaçlar. Biyobozunur olmayan

antibiyotik taşıyıcı sistemler ise akrilik malzeme olan polimetilmetakrilat (PMMA), çimento (Palacos®) veya boncuk (Septopal®) formlarından oluşmaktadır (Kavanagh ve ark., 2018).

Tablo 2: Kollajen bazlı süngerler ve kemik çimentosu/boncuklar dahil olmak üzere, antimikrobiyallerle yüklü ve osteomiyelit tedavisinde kullanılan, ticari olarak temin edilebilen kemik rejeneratif biyomalzemeler (Kavanagh N. ve ark., 2018).

Ürün	Firma	Açıklama	Endikasyonlar
Kollajen bazlı süngerler			
Collatamp G/EG	EUSA Pharma	Gentamisin emdirilmiş emilebilir kollajen implant	Lokal antibiyotik uygulaması ile cerrahi alan enfeksiyonlarını önleme ve tedavi etme
Genta-Coll	Resorba	Gentamisin içeren hemostiptik kolajen sünger	Enfeksiyon riskinin yüksek olduğu yaralarda hemostaz (osteomiyelit dahil)
Septocoll E	Biomet UK Ltd.	2 form gentamisin (gentamisin sülfat [hızlı salınım] ve gentamisin crobefate [uzun süreli salım]) içeren emilebilir at kollajen örtüsü	Potansiyel olarak kontamine/kontamine yaralar; septik cerrahide revizyon operasyonları.
Kemik çimentosu/boncuklar			
Septopal	Biomet UK Ltd.	Gentamisin sülfat yüklü PMMA zincirleri	Cerrahi debridmandan sonra lokal ilaç dağıtımı
Stimulan	Biocomposites	Kalsiyum sülfat (gentamisin, vankomisin ve tobramisin ile karıştırılabilir)	Ölü boşluk ve enfeksiyon yönetimi stratejilerini tamamlar (örneğin, enfekte kaynamama, osteomiyelit ve periprostetik eklem enfeksiyonu)

Palacos	Heraeus Medical	Kemik çimentosu (gentamisin için mevcut)	Ortopedik yerleştirme prosedürleri

Farklı antibiyotikler ile hazırlanabilen lokal antibiyotik taşıyıcı sistemler çeşitli kas-iskelet sistemi enfeksiyonlarının tedavisi için lokal olarak antibiyotik vermek üzere ameliyat sırasında yaygın olarak kullanılmıştır. Özellikle, bu tedavi toksisite ve termal olarak stabil bir antibiyotik gereksinimi nedeniyle sınırlıdır (Bistolfi ve ark., 2011). Ayrıca, PMMA ürünleri enfeksiyonun tekrarlaması riskine yol açarak çıkarılmasını gerektirir. Bu dezavantaj, biyobozunur antimikrobiyal ürünlerin kullanılmasıyla çözülebilmektedir (Kavanagh ve ark., 2018).

Biyolojik olarak parçalanmayan malzemelerin uzaklaştırılması ikinci bir cerrahi girişim gerektirdiği için son yıllarda biyolojik olarak parçalanan malzemelerin kullanımı önem kazanmıştır. Örneğin, kalsiyum sülfat boncukları ve antibiyotikli kollajen süngerleri kullanan biyobozunur taşıyıcı sistemleri son on yıldır kullanılmaktadır. Bu biyobozunur taşıyıcı sistemler, antibiyotiklerin lokal olarak enfeksiyon bölgesine uygulanmasını sağlarken, kemiğin onarımı ve yenilenmesi için bir iskele sağlar. Bu ürünler arasında, Collatamp® G/EG (EUSA Pharma) ve GENTA-COLL® (Resorba) gibi bir dizi antibiyotik ile birleştirilebilen Stimulan® boncuklar bulunur (Kavanagh ve ark., 2018).

Shirtliff ve arkadaşları MRSA'nın neden olduğu deneysel osteomiyelit tedavisinde vankomisin içeren hidroksiapatit çimentosunun etkinliğini göstermiştir. Yapılan çalışmada yüksek vankomisin konsantrasyonları kullanıldığında, daha yüksek başarı oranları sağlanmıştır. Tedavi gruplarında lokal olarak ortalama 106.3 mg / kg vankomisin uygulanmıştır. Bu dozda idrarda vankomisin konsantrasyonu yüksektir. Ancak, serum vankomisin seviyeleri sistemik toksisite için gereken eşiğin altındadır. Dolayısıyla hiçbir yan etki gözlenmeden etkin bir tedavi sağlanabilmiştir (Joosten ve ark., 2005).

Xie ve arkadaşları ise, tavşanlarda osteomiyelitin tedavisi için vankomisin yüklü biyoaktif borat cam kullanmıştır. Bu implantlar, osteomiyeliti ortadan kaldırırken, kemik rejenerasyonunu uyarabilen bu implantlar özellikle yüke dayanımın gerekli olduğu durumlarda başarıyla tedavi sağlayabilmektedir (Xie ve ark., 2009).

4.5. Doku İskeleleri

Fonsiyonel bir doku yenilenmesi için, biyolojik olarak aktif moleküllerin kontrollü bir salınımın sağlanması ile birlikte kullanılan polimerler ve matris mimarisi, verilen her doku için spesifik özellikler taşımalıdır. Doku iskeleleri hem kimyasal hem de topografik olarak yeterli yüzey özelliklerini sunmalıdır, çünkü bu özellikler yüzeye hücre adezyonunu belirleyecektir. Bunun yanı sıra, hücre penetrasyonunu teşvik etmek için yeterli gözeneklilik, ortalama gözenek boyutu ve gözenekler arasında bağlılık göstermeli, matrise oksijen ve besin difüzyonunu sağlamalıdır. Matrisler ayrıca mekanik kuvvetlere dayanacak ve fiziksel bütünlüğü koruyacak uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır, malzemeler biyolojik olarak uyumlu olmalı ve degradasyon ürünleri sitotoksik olmamalıdır (Duarte ve ark., 2015).

Osteomiyelit tedavisinde doku iskelelerinin kullanımı ile otolog ve allojenik kemik greftlerinin dezavantajları ortadan kaldırılarak oluşan ölü bölgeler etkin bir şekilde doldurularak fonksiyonel bir doku yenilenmesi elde edilebilmektedir. Ayrıca enfeksiyonun tedavisi için de gerekli antibiyotiğin kontrollü salımı gerçekleştirilerek oldukça etkili bir tedavi sağlanabilmektedir (Luo ve ark., 2016).

4.5.1. Biyobaskılama yöntemleri

Doku iskelelerinin yapısal özelliklerinin makro, mikro ve nano boyutta dizayn edilmesi, hücresel etkileşimler, gerekli besin ve atık transferi, mekanik stabilite ve fonksiyonel bir doku oluşumu için oldukça önemlidir. Son on yılda, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta devrim yaratan, bilgisayar kontrollü bir tabaka tabaka üretim tekniği olan üç boyutlu (3B) biyobaskılama yöntemi büyük bir önem kazanmıştır (Bracaglia ve ark., 2017; Novosel ve ark., 2011). Doku mühendisliği için yeni bir teknoloji olarak 3B biyobaskı çalışmaları, transplantasyon yapılabilen dokuların rejenerasyonu ve hatta insan kulağı, kemikler, deriler ve burun gibi

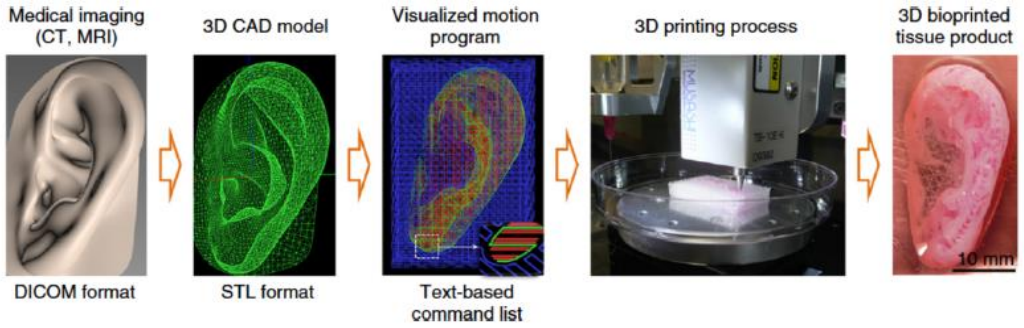
organlar için hasarlı vücut fonksiyonlarının onarılması yönünde önemli bir ilerleme sağlamıştır (Tabriz ve ark., 2015).

3B biyoyazıcı, eklemeli bir üretim teknolojisidir ve sentetik ve doğal polimerlerin, canlı hücrelerin ve büyüme faktörlerinin tek aşamalı bir süreçte katman katman biriktirilmesi yoluyla bilgisayar destekli tasarım (CAD) kullanarak hassas ve tekrarlanabilir 3B mimarilerin oluşturulmasını sağlar (Lee ve Yeong, 2016; Derakhshanfar ve ark., 2018). Biyolojik baskı, geleneksel doku mühendisliği yaklaşımlarına göre otomasyon ve standardizasyon ile çoklu hücre ve biyomalzemelerin hassas bir şekilde hazırlanabilmesini sağlar. Üretim süresi, diğer tekniklere kıyasla nispeten hızlıdır (Murphy ve Atala, 2014; Fayyazbakhsh ve Leu, 2020; Augustine, 2018; He ve ark., 2018).

Bu sistemle kompleks yapılar, yüksek hassasiyetle, herhangi bir kalıba gerek duyulmadan, belirlenen porozite ve ara bağlantılarla, doğrudan ve kesin olarak kolay ve ucuz bir şekilde üretilebilir. Farklı malzeme ve hücreler aynı zamanda ve sıralı olarak aynı baskılama prosesi ile tek seferde hızlı ve hassas bir şekilde hazırlanabilir. Dolayısıyla kompleks doku ve organ modellerini elde etmek için farklı malzeme, hücre çeşitleri ve biyoaktif malzemelerin önceden belirlenen pozisyonda yerleştiği hiyerarşik yapılar kolayca elde edilebilir. Sonuç olarak bu yöntemle, elde edilebilir. (Ozbolat, 2015; Yu ve ark., 2016; Włodarczyk-Biegun ve del Campo, 2017; Park ve ark., 2015; Wenjie Zhang ve ark., 2017; Narayanan ve ark., 2016; Liu ve ark., 2017)

3B biyobaskı, yüksek yapısal karmaşıklığa ve tasarım esnekliğine sahip modüler ve hastaya özgü iskelelerin üretilmesini sağlayan hızlı ve hassas bir yöntemdir. Kompleks doku ve organ modellerini elde etmek için, farklı malzemeler aynı anda ve sıralı olarak aynı baskılama prosesi ile tek seferde hazırlanabilmektedir. Bu teknoloji, bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi yaygın olarak kullanılan tıbbi görüntüleme teknikleriyle alınan doku görüntülerine dayanan yapıların tasarlanmasını ve üretilmesini sağlar (Şekil 9). Bu geleneksel imalat teknikleriyle mümkün değildir. Son zamanlarda 3D baskı, kraniofasiyal implantlar, dental kalıplar, kronlar ve implantlar, protez bölümleri, isteğe bağlı tıbbi ekipman, cerrahi modeller, deri ve kemik gibi doku yenilenmesi için iskeleler, organ baskıları,

ilaç keşfi için doku modelleri dahil olmak üzere geniş bir uygulama yelpazesi bulmuştur (Güvendiren, 2016).



Şekil 9. 3B şekil taklit eden hedef doku veya organın otomatik baskısı için CAD (Bilgisayar destekli üretim) / CAM (bilgisayar destekli tasarım) süreci. Medikal görüntü verilerinden geliştirilen bir 3D CAD modeli, XYZ düzlem hareketleri ve 3D baskı elde etmek için pnömatik basınç için talimatlar içeren görselleştirilmiş hareket programı oluşturur (Kang ve ark., 2016).

Hastaya özel cihazlar hazırlama, yönlendirme ve gözenekliliği kontrol etme ve hem sentetik hem de biyolojik olarak çoklu materyalleri birleştirebilme yeteneği birçok kişinin dikkatini çekmiştir. Sonuç olarak, teknolojideki bu artış, birçok çığır açan tedavilerin ve cihazların yaratılmasına yol açmıştır. Örneğin son çalışmalar, bu teknolojinin yapısal bütünlük ile anatomik olarak şekillendirilmiş ve ölçekli doku yapılarının biyo üretimi için potansiyelini göstermiştir. Tüm bunlar 3B baskı teknolojisindeki ve biyomateryal tasarımdaki son gelişmeler sayesindedir (Güvendiren, 2016).

3B baskı teknolojisi büyük bir potansiyel sunsa da tıpta ortak bir biyo üretim tekniği olarak tanınabilmesi için hala üstesinden gelinmesi gereken önemli konular vardır. En önemli sorunlardan biri 3B yazıcıların sınırlı yetenekleridir. İşleme hızı, baskı hızı ve yazıcı çözünürlüğü geçmiş yıllarda büyük ölçüde artmıştır, ancak çoğu durumda hala optimal seviyelerin gerisinde kalmaktadır. İkinci önemli konu, 3B yazdırılabilir biyomateryallerde çeşitlilik olmamasıdır. Birçok basılabilir malzeme, harici uygulamalar için mükemmel özelliklere sahiptir, ancak implante edilebilir biyomalzemeler hem fizyolojik koşullar hem de vücutla etkileşimler temelli, gelişimi çok daha zorlaştıran spesifik özellikler gerektirir (Güvendiren, 2016). Biyobaskıda aljinat, jelatin, hyalüronik asit (HA), polietilen glikol (PEG), polivinil alkol (PVA) vb. gibi farklı doğal ve sentetik hidrojeller kullanılır. Degradasyon sırasında olası

toksik ürünlerin salınmasına ve düşük biyo-uyumluluğa rağmen, sentetik hidrojeller biyobaskı için tercih edilir, çünkü bunlar kontrollü bir oranda bozulurken kimyasal ve fiziksel özelliklerin hassas bir şekilde ayarlanmasını sağlar (Raphael, 2017).

Canlı hücrelerin ve biyolojik doku iskelelerinin (bioscaffold) 3B baskısı için, mürekkep püskürtmeli baskı, lazer destekli baskı, ekstrüzyon tabanlı baskı ve stereolitografi gibi gibi farklı üretim teknikleri geliştirilmiştir. Bununla birlikte, kemikler gibi klinik olarak sertleşmiş sert dokuların üretilmesi zaten başarılı bir şekilde gösterilmiş olmasına rağmen, yumuşak dokular için biyobaskılı yapı iskeleleri, sınırlı karmaşıklığı olan klinik olarak küçük ölçekli yapılar ile sınırlıdır (Tabriz ve ark., 2015).

4.5.1.1. Stereolitografi

Stereolitografi, katman katman karmaşık mimariler oluşturabilen lazer tabanlı hızlı bir prototipleme tekniğidir (Annabi ve ark., 2014; Skoog ve ark., 2014). SLA aparatı genellikle kürlenmemiş reçine için bir tank, hareketli bir platform, bir UV lazer ve bir ayna sisteminden oluşur (Eltom ve ark., 2019). Bu teknikte, öncelikle bilgisayar destekli tasarım (CAD) dosyaları SLA aparatına aktarılır ve belirlenen bir desen elde etmek için sıvı ışığa duyarlı reçine üzerine UV ışınlanır. Burada bir lazer ışını, polimerin kesin olarak tanımlanmış ve lokalize polimerizasyonunu sağlar. İlk katman, fotopolimerizasyon yoluyla katılaştırıldığında, platform, bir asansör ve polimerizasyon için birinci katman üzerinde bulunan bir sonraki kürlenmemiş reçine katmanını kullanarak belirli bir yükseklikte alçalır. Bu prosedür, istenen 3D yapı üretilinceye kadar tekrar edilir (Skoog ark., 2014; Gupta ve ark., 2012; Goyanes ve ark., 2016).

4.5.1.2. Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcılar

Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcılar, pratikliği ve daha büyük ölçekli 3B yapıları üretme yeteneği nedeniyle biyo-baskı araştırmalarında kullanılan en yaygın yöntemdir. Ekstrüzyon temelli biyo-baskı ilk olarak 2000'li yılların başında Freiburg Malzeme Araştırma Merkezi araştırmacıları tarafından gösterilmiş, ardından EnvisionTec tarafından 3D-Bioplotter® olarak ticarileştirilmiştir.

Ekstrüzyon tabanlı bir yazıcıda, biomürekkep genellikle tek kullanımlık bir plastik şırıngaya yerleştirilir. Biyomürekkebin bir nozül veya açıklıktan sürekli akışla çıkmasını sağlamak için pnömatik veya mekanik kuvvetler kullanılır. Pnömatik sistemler, baskıyı başlatmak için hava basıncını kullanır. Pnömatik sistem valfli veya valfsiz sistemle kontrol edilebilir (Özbolat ve Hospodiuk, 2016). Valfli sistemler, uygulanan basıncı ve darbe frekansını doğru bir şekilde kontrol edebilir ve hassas biomürekkep birikimi sağlayabilir. Ancak valfsiz sistemler, kullanımları daha kolay olduğu için yaygın olarak tercih edilmektedir (Heinrich ve ark., 2019). Mekanik kuvvetle çalışan sistemler, gerekli tahrik kuvvetlerini sağlamak için dikey ve dönme kuvvetleri kullanır ve mekanik dağıtım, piston veya vida bazlı basınçla elde edilebilir. Pistonlu sistemler, nozülden biyomürekkep akışı üzerinde doğrudan kontrole sahiptir. Vidalı sistemler daha yüksek uzaysal kontrole izin verir ve bu nedenle yüksek viskoziteli biyomürekkepler için kullanışlıdır. Pnömatik ve pistonlu sistemlerde, basılan yapıların hücresel canlılığı da oldukça yüksektir. Bununla birlikte, nozülde daha yüksek basınç ve kayma gerilimi oluşturması nedeniyle vidalı sistemler hücre baskısı için yeterli olamamaktadır (Hölzl ve ark., 2016; Malda ve ark., 2013; Heinrich ve ark., 2019; Li ve ark., 2016). Genel olarak, ekstrüzyon biyo yazıcılar basit ve ucuz sistemlerdir. Yüksek viskozitelere (30 ila 6x107 mPas) ve yüksek hücresel yoğunluklara sahip biyomürekkepler bu sistem kullanılarak yazdırılabilir. Ancak ekstrüzyon baskı, lazer destekli ve mürekkep püskürtmeli baskıya göre nispeten daha düşük biyo baskı hızı sağlar (Heinrich ve ark., 2019; Li ve ark., 2016).

4.5.1.3. Mürekkep püskürtmeli Biyoyazıcılar

Mürekkep püskürtmeli yazıcı, geleneksel mürekkep püskürtmeli masaüstü yazıcıların teknolojisini kullanır. Mürekkep püskürtmeli biyoyazıcıda, mürekkep kartuşları bioink kabına, kağıt ise bir platforma veya kültür tabağına geçmiştir. Basit ve nispeten ucuz bir sistemdir. Termal veya piezoelektrik uyarı ile aktive olurlar. (Li ve ark., 2016; Heinrich ve ark., 2019; Hölzl ve ark., 2016). Termal mürekkep püskürtmeli baskıda biomürekkep, nozülden damlacıkları çıkışını sağlamak için gerekli basıncı oluşturmak üzere bir mikro ısıtıcı tarafından ısıtılır. Piezoelektrik mürekkep püskürtmeli baskıda, nozülden damlacıkların çıkışını sağlamak için

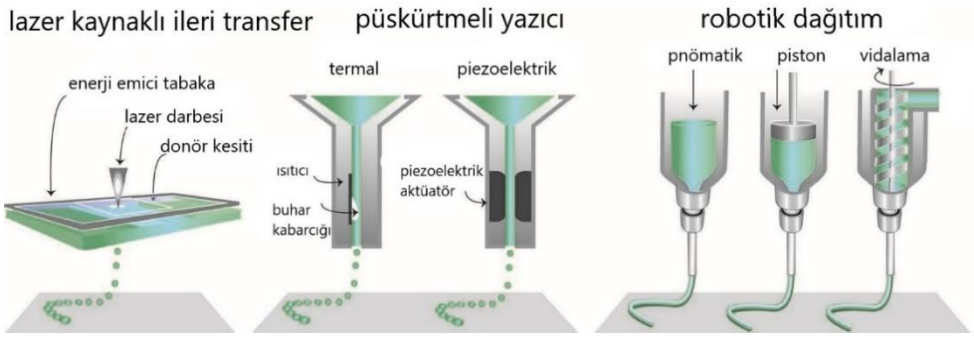
akustik bir dalga elde etmek için mekanik darbe kullanılır (Li ve ark., 2016; Malda ve ark., 2013; Mobaraki ve ark., 2020).

Baskı kafaları, hacim olarak 1-100 piko litrelik damlacıklar oluşturur (damlacık çapları 10-60 m), bu da çok küçük nozul orifis çapları gerektirir. Bu nedenle, yazıcı kafaları, hücre yüklü kolajen gibi viskoz veya lifli biyo-bağlar biyo-baskı yapılırken tıkanmaya meyillidir. Piyasada bulunan çok nozullu mürekkep püskürtmeli baskı kafaları, o zamandan beri çeşitli hücre tiplerini ve diğer bazı biyolojik ürünleri biyo-baskılamak için kullanılmaktadır. (Ji ve ark., 2016; Heinrich ve ark., 2019)

Genel olarak mürekkep püskürtmeli baskı, yüksek çözünürlükte yüksek baskı hızına izin verir. Bununla birlikte, yalnızca düşük viskoziteli (3,5- 12 mPa s-1) biyoinkleri yazdırmayı sağlar (Heinrich ve ark., 2019).

4.5.1.4. Lazer tabanlı biyoyazıcılar

Lazer tabanlı biyoyazıcılar, bir lazer enerji soğurucu tabaka ve ince bir biyoink tabakası ile kaplanmış bir donör slaydı (Şekil 10) kullanır (Hölzl ve ark., 2016). Bu işlem nozul içermediğinden hücreler yüksek kesme geriliminden etkilenmez ve tıkanma sorunu yoktur. Dolayısıyla, bu teknoloji ile geniş bir viskozite aralığı (1-300 mPa s – 1) basılabilir ve yüksek hücresel canlılık elde edilebilir. Ayrıca, bu sistemin çözünürlüğü, biyomürekkep tabakasının kalınlığı ve reolojisi, uygulanan enerji, yüzey gerilimi ve substratın ıslanabilirliği gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (Li ve ark., 2016; Mobaraki ve ark., 2020; Hölzl ve ark., 2016; Mandrycky ve ark., 2016). Ayrıca, bu işlem karmaşık ve pahalıdır (Heinrich ve ark., 2019).



Şekil 10. Hidrojellerin biyomürekkep olarak kullanılmasını içeren seçilmiş biyofabrikasyon yaklaşımları (Malda ve ark, 2013)

3B biyobaskılama yöntemi sadece doku mühendisliğinde değil, hücre bazlı sensörlerin, tümör modellerinin ve ilaç taşıyıcıların hazırlanmasında ve farmakokinetik çalışmalarda kullanılabilmektedir (Ozbolat, 2015; Yu ve ark., 2016; Włodarczyk-Biegun ve del Campo 2017; Park ve ark., 2015; Wenjie Zhang ve ark., 2017; Narayanan ve ark., 2016; Liu ve ark., 2017). Son yıllarda bu yöntem, ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için basit, kesin ve ucuz bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. 3B biyoyazıcılar kullanılarak belirlenen porosite, ve fonksiyonellikte yüzeyler tasarlanabilir. Bu tasarım esnekliği kontrollü salım sistemlerinin araştırılması ve geliştirilmesi için birçok yeni stratejik yaklaşım sunar (Goole ve Amighi 2016; Liu ve ark., 2017).

4.5.2 Biyofabrikasyonda kullanılan malzemeler

Birçok durumda, çevreleyen doku ve hücre iç büyümesini indüklemek ya da kullanılan hücrelerin muhafaza edilmesi, büyümesi ve farklı işlevler eklenmesi için geçici bir iskele olarak hizmet etmek üzere biyouyumlu, biyobozunabilir polimerler kullanılır. Bu nedenle, belirli bir organın ihtiyaçlarını karşılamak için belirli özelliklere sahip olan polimerlerin imal edilmesi için çeşitli işleme teknikleri geliştirilmiştir (Lu ve Mikos, 1996).

Polimer iskeleleri özel uygulamalar için benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmalı ve doku mühendisliği için bazı temel gereksinimleri karşılamalıdır. Bu iskeleler hücreler olmaksızın implante edilebilir ve rejenerasyon, doku indüksiyonu olarak bilinen bir işlem olan çevre dokuların içe büyümesine bağlıdır. Alternatif

olarak hücreler gözenekli bir polimere ekilebilir. Hücre-polimer yapısı daha sonra transplante edilir. Her iki durumda da, iskele için temel bir kriter biyouyumluluktur. Yani polimer iskeleleri ve bunların bozunma ürünleri, olumsuz bir bağışıklık yanıtı veya toksisiteyi başlatmamalıdır (Lu ve Mikos, 1996).

Tıpta kullanılan ilk sentetik polimerler arasında poli (L-laktik asit) (PLLA), poli (glikolik asit) (PGA) ve bunların kopolimerleri poli (DL-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) yer alır. Doku mühendisliği uygulamaları için gerekliliklerin çoğunu karşılarlar ve belirli insan klinik kullanımları için FDA (U.S. Food and Drug Administration) onayı ile biyo-bozunabilir birkaç polimer arasında yer alırlar (Lu ve Mikos, 1996).

Genel olarak, basılabilir biyomateryaller: basılabilir olmalı, biyouyumlu olmalı, uygun mekanik özelliklere sahip olmalı, iyi degradasyon kinetiğine sahip olmalı, güvenli bozunma yan ürünleri oluşturmalı ve doku biyomimikriliği sergilemelidir. Bu gereksinimlerin her biri, hangi yazdırma yönteminin kullanıldığına ve aygıtın öngörülen son uygulamasına bağlı olarak değişir (Güvendiren, 2016).

Biyobaskı için malzeme gereksinimleri karmaşık ve çoğu zaman antagonisttir. Düşük viskozite, düşük sertlik ve düşük çapraz bağlama yoğunlukları; hücre göçü, besin difüzyonu ve yeni doku oluşumunu mümkün kılar. Yüksek viskozite, yüksek akma gerilmesi ve hızlı jelleşme ise; hem baskıların geometrik / boyutsal doğruluğunu hem de baskı sonrası mekanik stabiliteyi sağlar (Raphael, 2017). En önemli zorluk, yüksek düzeyde canlı hücrelerin basılması ve klinik ölçekte hücre yüklü yapıları desteklemek için yeterince güçlü bir iskele üretilmesi koşulları arasında iyi bir dengeyi tutturmanın zorluğu olmuştur. Örneğin hidrojellerin biyolojik ekstrüzyonunu ele aldığımızda; 3 boyutlu hidrojel yapıları oluşturmak için yeterli mekanik sertlik ile iyi bir baskı çözünürlüğü elde etmek için küçük çaplı nozül ve yüksek viskoziteli hidrojel malzemeler tercih edilir. Ancak, yüksek viskoziteli malzemelerin küçük bir nozülden basılması için gerekli olan yüksek ekstrüzyon kuvvetleri, daha yüksek kesme gerilmelerine ve dolayısıyla baskı işlemi sırasında hücre canlılığının azalmasına neden olacaktır. Bu kilit zorluğun üstesinden gelmek için farklı biyobaskı yaklaşımları geliştirilmiştir (Tabriz ve ark., 2015).

Örneğin; Butcher ve arkadaşları, karmaşık 3B yapıları için yeni bir ultraviyole (UV) biyo ekstrüzyon baskı tekniği geliştirmiştir. UV ile kürlenen, düşük viskoziteli PEG hidrojel solüsyonunda yaşayan hücreler in situ UV radyasyonu ile, basılan hidrojel yapı katmanını katılaştırarak, tabaka halinde basılır. Hidrojel, hücreler baskı memesinden ekstrüzyondan sonra çapraz bağlanır. Bu teknik, yüksek viskoziteli hidrojellerin basılmasıyla ilgili kayma gerilmesini önemli ölçüde azaltabilir ve klinik ölçekli bir insan kalp kapakçığının rejenerasyonu için yeterince güçlü UV çapraz bağlı yapılar üretebilir (Tabriz ve ark., 2015).

4.6. Hidrojeller

Hidrojeller, büyük miktarda su tutabilen, suda şişebilen, şekillendirilebilen, çapraz bağlanmış, üç boyutlu polimer ağlardır (Sheehya ve ark., 2015, Güvendiren, 2016).

1936'da DuPont bilim adamları, yakın zamanda sentezlenen metakrilik polimerler hakkında bir makale yayınlamışlardır. Bu makalede poli 2-hidroksietil metakrilat'tan bahsedilmiştir. Kısaca sert, kırılgan, camsı bir yapıda tanımlanan bu polimer, önemsiz olarak kabul edilmiştir ve bu makalenin ardından, 1960'a kadar unutulmuştur. Wichterle ve Lim, Nature'da HEMA monomerinin ve bir çapraz bağlama maddesinin su ve diğer çözücülerin varlığında polimerizasyonunu açıklayan bir makale yayınlamışlardır (Wichterle ve Lim, 1960). Bu çalışmada kırılgan bir polimer yerine yumuşak, suyla şişmiş, elastik, berrak bir jel elde etmişlerdir. Bu yenilik, yumuşak kontakt lens endüstrisine ve bugün bildiğimiz modern biyomedikal hidrojel alanına yol açmıştır (Ratner ve ark., 2004)

Hidrojeller, doku mühendisliği uygulamaları için 2D ve 3D yapı iskeleleri, ilaç taşıyıcı sistemler için taşıyıcı, optikler ve akışkanlar için aktüatör, biyolojik çalışmalar için hücre dışı matris ve ayrıca hücre ve / veya biyomolekül taşınımı da dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmıştır (Sun ve ark., 2012, Güvendiren, 2016). Hidrojeller, ECM bileşenleri gibi hücreler ve / veya biyokimyasal moleküller içerdiklerinde biyomürekkepler olarak adlandırılır (Güvendiren, 2016). Hidrojeller, doğal ekstrasellüler matrikse benzer bileşenlere sahip veya makro moleküler özelliklere sahip olan doğal maddelerden türetilebilir ve

doğal olarak türetilen hidrojellerin, mezenkimal kök hücrelerin (MSC) in vitro kondrojenezini desteklediği gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücre, hücrelerin bağ dokularında bulunan, erişkin haldeki kök hücre tipidir. Dokuların destek bölümü olan stroma hücresinin de temelini oluşturmaktadırlar. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon gibi dokulara farklılaşabilirler (Sheehya ve ark., 2015).

Mevcut çok sayıda hidrojel, polimerik formülasyonlar için çok sayıda seçeneğe sahip olmamızı sağlar. Biyomedikal uygulama için istenen özelliklere sahip bir hidrojel geliştirmek için en iyi yaklaşım, mevcut polimerlerin makromoleküler yapılarını, istenen şişme ve mekanik özelliklerle ilişkilendirmektir (Peppas et al., 2000; Peppas, 2001, Ratner ve ark., 2004).

Hidrojeller, ayarlanabilir özellikleri ve çapraz bağlanma mekanizmaları, degrade olabilmeleri ve fonksiyonelleştirilebilmeleri nedeniyle aktüel ECM mikro çevrelerini taklit etmek için mükemmel "yumuşak malzeme" sistemleri sağlar (Seliktar, 2012). Enjekte edilebilir kayma incelmesi gösteren hidrojeller, tüm hidrojel sistemlerinin bir alt grubudur, ancak araştırma ve klinik biyomedikal uygulamalarda kullanılanların çoğunu oluşturur (Guvendiren, M. ve ark. 2012). Enjekte edilebilir hidrojellerden formüle edilmiş hidrojel mürekkeplerin, az basınç altında akması, hızla jelleşmesi ve biriktikten sonra yeterli bütünlüğün korunması gerekmektedir (Güvendiren, 2016, Stanton ve ark. 2015).

Mürekkep püskürtmeli (inkjet), ışık destekli (light-assisted) ve ekstrüzyon tabanlı (extrusion-based) 3D baskı sistemleri, hidrojel baskı için en uygun yöntemlerdir (Billiet ve ark., 2014; Billiet ve ark., 2012; Pereira, ve ark. 2015; Zhang ve Zhang 2015). Bir hidrojel mürekkebinin tasarlanmasına yönelik klasik yaklaşım, baskıdan hemen sonra bir ağ oluşturan bir polimer çözeltisinin formüle edilmesidir. Hidrojeller, sıcaklık, ışık veya iyon konsantrasyonu gibi bir dış uyaranlara yanıt olarak fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlanabilir. Fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojellerin ana avantajı çapraz bağlanmayı sağlamak için kimyasal ajanların bulunmaması nedeniyle düşük toksisite oluşturmalarıdır. Kimyasal olarak çapraz bağlanmış hidrojeller ise kovalent bağ oluşumu yoluyla hazırlanır ve oluşan hidrojeller mekanik kuvvetlere daha dirençlidir. Ancak, biyomürekkep olarak

kullanılabilecek sınırlı sayıda uygun hidrojel vardır ve özelliklerini ayarlamak zorludur (Güvendiren, 2016; Malda ve ark., 2013).

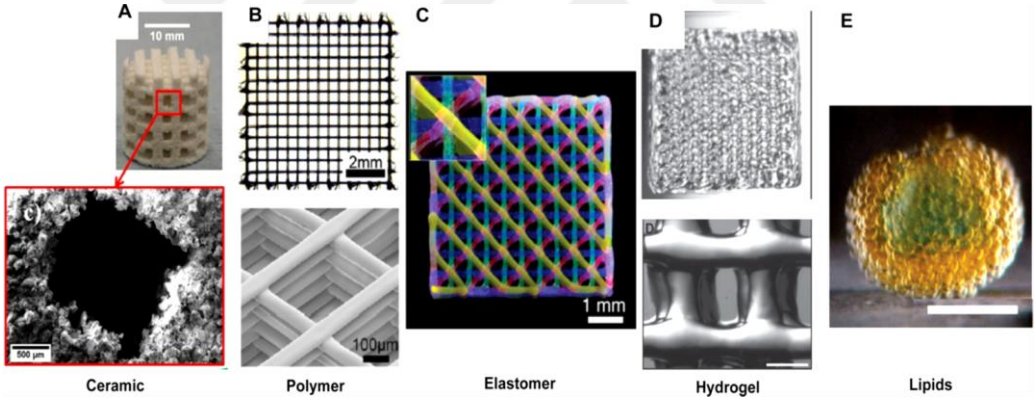
Genel olarak, 3B biyobaskı için yaygın hidrojeller, aljinat, agar, jelatin, selüloz, kollajen, fibrinojen, hyalüronik asit gibi doğal polimerler veya poliakrilamid, poliüretan, polietilen glikol (PEG) gibi sentetik polimerler veya sentetik doğal karışım polimerleridir (Lee ve ark., 2014; Xu ve ark., 2006; Ilkhanizadeh ve ark., 2007; Gao ve ark., 2015; Hockaday ve ark., 2012; Fedorovich ve ark., 2008; Boland ve ark., 2003; Fedorovich ve ark., 2009).

Fizikokimyasal özellikleri ve jelleşme yöntemi kimyasal, fiziksel ve enzimatik mekanizmalarla ayarlanabilir veya termal / pH duyarlılığı ile modüle edilebilir. Örneğin, aljinat çok yönlü bir polisakkarittir ve jelasyon özellikleri, ya jelleştirici ajanlar olarak iki değerlikli katyonların eklenmesiyle ya da aljinat-dialdehitin (ADA) jelatin ile kimyasal modifikasyonu yoluyla indüklenebilir (Boland ve ark., 2007; Lee ve ark., 2015; Hinton ve ark., 2015; Cohen ve ark., 2010). Aljinat ve agar tarafından oluşturulan üçlü ağ hidrojel rapor edilmiştir. Bu sistemde, aljinat zincirlerinin agar çift ağı ile dolaştırımı, agar sarmal zincir demetlerini sınırlandırmış ve son derece sert bir hidrojel oluşturmuştur (Güvendiren, 2016).

Diğer doku mühendisliği biyomateryallerinin yetersizliği göz önünde bulundurulduğunda, polivinil alkol hidrojelleri, kimyasal stabiliteleri, biyouyumluluğu, mekanik özellikleri veya düşük sürtünme katsayısı gibi iyi performans özelliklerine bağlı olarak eklem kıkırdağının yerini alabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca, ışınlama, kimyasal reaksiyon ve erime-donma döngüleri yoluyla elde edilen polivinil alkol hidrojelinin üç boyutlu yapısı, doğal kıkırdakların yüksek orandaki nano-gözenekli yapısına benzemektedir. Bununla birlikte biyoaktivite eksikliği destek hücrelere bağlanmada sorunlara ve polivinil alkol hidrojel üzerinde matrisler halinde gelişime yol açarak uyumsuzluğa neden olur. Bu nedenle doğa kıkırdağa entegre olamaz. Daha yakın zamanlarda, birkaç araştırmacı bozunmuş doku mühendisliği biyomateryalleri ve polivinil alkol hidrojelinin birleşimine odaklanmış, “yarı-bozunabilir iskeleti” üretmiştir ve bunun kondrositlerle, in vitro kültürden sonra eski ve olgunlaşmamış kıkırdak doku

formlarında başarılı bir şekilde bağlandığı bulunmuştur. Dahası, gözlenen yarı saydam malzemenin mekanik özelliği, sağlıklı kıkırdak ile benzerdir (Cao, 2017).

Yüksek şekil uygunluğuna sahip çoklu tabakaların basılacak hidrojel mürekkepleri formüle etmek için yüksek polimer konsantrasyonları gerekir. Bununla birlikte, oldukça yoğun hidrojel yapıları genellikle hücre kapsüllenmesi için zararlıdır, besin ve atık taşınmasını sınırlar ve ağın yeniden modellemesini ve yapının fonksiyonel entegrasyonunu engeller. Bu problemlerin bazılarının üstesinden gelmek için, Li ve ark. DNA hibridizasyonu nedeniyle hızlı çapraz bağlanma gösteren, polipeptid-DNA konjugat ve tamamlayıcı DNA bağlayıcıdan oluşan iki bileşenli bir DNA hidrojel mürekkep sistemi geliştirdi ve ayarlanabilir özellikleri olan hidrojel ile hücre içeren 3 boyutlu yapıları üretebildiler. Villar ve ark. büyüyen ağda damlacıklar halinde çift tabaka oluşturan lipit mono tabakalarını (Şekil 11), yağ içindeki lipit kaplı sulu damlacıkların baskısını yaparak, doku benzeri yapılar geliştirmiştir (Güvendiren, 2016).



Şekil 11. Doğada soldan sağa sert ve yumuşak 3D baskılı yapılar. A, üst, ağırlıkça %50 hidroksilapatit iskelesi. Alt, gözenek ve çevre seramik parçacıklarının SEM görüntüsü. B, Polikaprolakton iskelesi (çok fonksiyonlu mikro sistemlerin solvent-cast* üç boyutlu baskısı.) C, Her biri farklı bir florofor ile boyanan dört PDMS(polidimetilsiloksan) mürekkebinin sırayla biriktirilmesiyle basılan 4-katmanlı örgünün floresan görüntüsü. D, PEG-bazlı hidrojel jelatin (15 mm x 15 mm), alt yapı skalası çubuğu, 500 µm. E, İçi boş küre şekilli lipit damlacık ağının resmi, ölçek çubuğu, 200 mm (Güvendiren M., 2016).

4.6.1. Biyofabrikasyon için hidrojellerin sahip olması gereken özellikler

Biyomürekkep geliştirilmesi, başarılı bir biyobaskılama prosesi için büyük bir önem taşır. Biomürekkep, yüksek yapısal bütünlüğe sahip stabil bir omurga oluşturmalı ve basılı hücrelerin canlılığını ve büyümesini hızlandırmalıdır (Hospodiuk ve ark.,

2017; Guan ve ark., 2017). Genel olarak basılabilirlik, biyomürekkebin reolojik özellikler ve çapraz bağlanma mekanizmaları gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (Malda ve ark., 2013). Özellikle, nozül veya iğne ucundan ekstrüzyon elde etmek ve yüklü hücreler üzerinde yüksek kayma gerilimini önlemek için biyomürekkebin viskozitesinin düşük olması gerekirken, baskı doğruluğu ve baskı sonrası yapının bütünlüğünü sağlamak için ise yüksek olması gerekir. Bu nedenle, baskı uygunluğunu artırmak için baskı sırasında nozül veya orifiste yüksek kayma geriliminde düşük viskozite ve baskı sonrası düşük kayma geriliminde yüksek viskozite sergilediği için kayma incelen biyomürekkepler geliştirilmiştir (Ji ve Guvendiren, 2017; Heinrich ve ark., 2019).

Polimerin çapraz bağlanma mekanizması, basılı materyalin şekli ve hücresel davranışlar üzerinde önemli bir etkisi olan olumlu mekanik stabiliteyi korumak için de çok önemlidir (Guan ve ark., 2017; Heinrich ve ark., 2019). Bugüne kadar, etkili jelleşmeye izin vermek için bioink formülasyonları için çok sayıda kimyasal ve fiziksel çapraz bağlama yöntemi kullanılmıştır. Bununla birlikte, yüksek basılabilirliğe, istenen jelleşmeye ve mekanik özelliklere ve yüksek biyolojik uyumluluğa sahip uygun bir biyo-bağ geliştirmek hâlâ bir zorluktur ve cilt yapılarının oluşumu için yalnızca birkaç basılabilir polimer mevcuttur. Bu nedenle, araştırmacılar, hem kimyasal hem de fiziksel çapraz bağlamadan yararlanmak için çift ağ elde etmek için takviye malzemesi veya kompozit biyomlar kullanarak hibrit malzemeler geliştirmeye odaklanmıştır (Malda ve ark., 2013; Hospodiuk ve ark., 2017; Mobaraki ve ark., 2020).

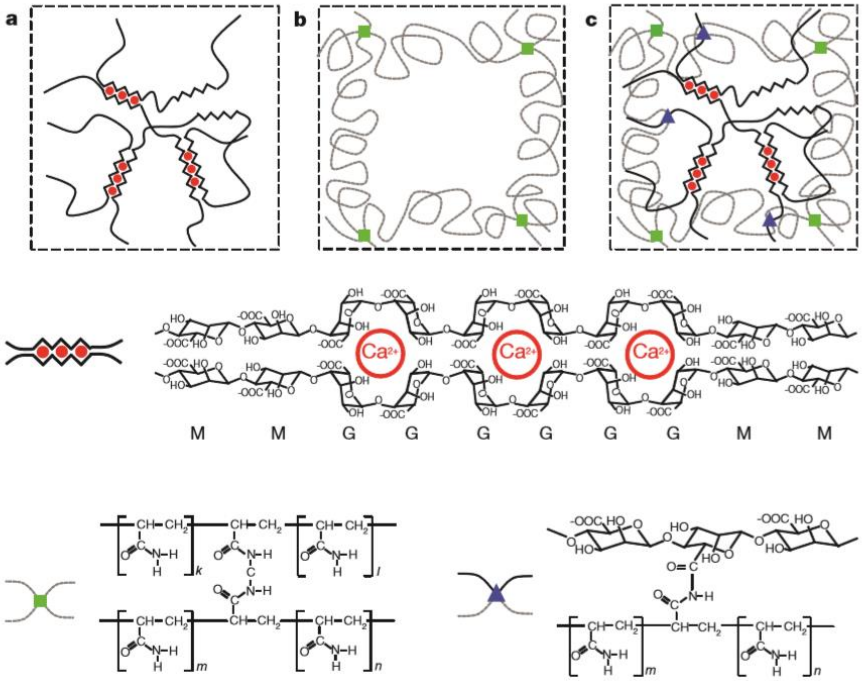
4.6.1.1. Hidrojellerin mekanik özellikleri

Hidrojel uygulamalarının kapsamı genellikle mekanik davranışları ile ciddi şekilde sınırlandırılır. Çoğu hidrojel, yüksek gerilebilirlik sergilemez; örneğin bir aljinat hidrojel, orijinal uzunluğunun yaklaşık 1.2 katı uzandığında kopar. Bazı sentetik elastik hidrojeller 10-20 aralığında gerginliklere ulaşmıştır, ancak bu değerler çentik içeren numunelerde belirgin bir şekilde azalmıştır. Çoğu hidrojel kıkırdak ve doğal kauçuklar ile karşılaştırıldığında (kıkırdak için 1.000 J m^{-2} ve doğal kauçuklar için 10.000 J m^{-2}), yaklaşık 10 J m^{-2}'lik kırılma enerjileri ile kıkırdak ve kauçuğa göre

daha kırılgandır. Hidrojellerin geliştirilmiş mekanik özellikler ile sentezlenmesi için yoğun çaba sarf edilmektedir; Bazı sentetik jeller 100 - 1.000 J m^{-2} kırılma enerjisine ulaşmışlardır. Burada, hidrojellerin, iyonik ve kovalent olarak çapraz bağlanmış ağları oluşturan polimerlerden sentezini rapor ederiz. Bu tür jeller %90 su içermelerine rağmen, başlangıç uzunluklarının 20 katından fazla gerilebilirler ve 9,000 J m^{-2} kırılma enerjisine sahiptirler (Sun ve ark., 2012).

Hidrojel üretimi için çeşitli kimyasal ve fiziksel çapraz bağlama yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Kararlı hidrojeller, güçlü kovalent bağların oluşumu yoluyla gelişmiş mekanik özelliklere sahip kimyasal çapraz bağlama ile hazırlanabilir. Öte yandan fiziksel jelleşme, van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik kuvvetler ve / veya moleküller arası düzenekler gibi kovalent olmayan etkileşimlerin bir sonucudur. Bu nedenle, fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojellerin mekanik mukavemeti, kimyasal olarak çapraz bağlı olanlara kıyasla nispeten düşüktür, bu nedenle kovalent olmayan bağlantılar nedeniyle vücutta kolayca parçalanabilirler. Bununla birlikte, kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojeller, artık polimerizasyon başlatıcılarının ve organik çözücülerin potansiyel sitotoksisitesinden dolayı daha az biyolojik olarak uyumlu olabilir. Hem kimyasal hem de fiziksel çapraz bağlama yöntemlerinin avantajlarını elde etmek için, iki veya daha fazla öncü içeren hibrit hidrojeller, çift aşamalı bir çapraz bağlama yaklaşımı ile üretilir (Guan ve ark., 2017; Wang ve ark., 2015; Hennink ve Van Nostrum, 2012; Bae ve ark., 2013; Colosi ve ark., 2016).

Bağlantısız iyonik çapraz bağlar, yeniden sıkıştırılarak iyileşebilen bir iç hasara neden olur (Şekil 12). Bu jeller, deformasyon ve enerji yayılımı mekanizmalarını keşfetmek ve hidrojel uygulamalarının kapsamını genişletmek için model sistemler olarak incelenebilir (Sun ve ark., 2012).



Şekil 12. Üç tür hidrojel şeması. **A,** bir aljinat jeli içinde, farklı polimer zincirlerindeki G blokları Ca + 2 (kırmızı daireler) boyunca iyonik çapraz bağlar oluşturur. **B,** Bir poliakrilamid jelde, polimerler N, N-metilen bisakrilamid (MBAA; yeşil kareler) boyunca kovalent çapraz bağlar oluştururlar. **C,** Bir aljinat-poliakrilamid hibrid jeli içinde, iki tip polimer ağı birbiri içine geçmekte ve poliakrilamid zincirleri ve aljinat zincirleri üzerindeki karboksil grupları üzerindeki amin grupları arasındaki kovalent çapraz bağlar (mavi üçgenler) ile birleşmektedir (Sun ve ark., 2012).

Bazı sentetik hidrojeller olağanüstü mekanik davranışlar sergiler. Slide-ring içeren hidrojeller kendi uzunluklarının 10 katı kadar uzayabilirler ve bir tetrapoli etilen glikol jel 2,6 MPa'a dayanabilir. Bu jeller elastik olarak deforme olur. Kırılgan ve çentik duyarlılığı olduğu bilinen elastik bir jelin, numuneler çentikler içerdiğinde ya da homojen olmayan deformasyona neden olan diğer özellikler olduğunda, gerilebilirliği ve mukavemeti önemli ölçüde azalır. Enerji yayıcı mekanizmalarla bir jel sert ve çentik duyarlı hale getirilebilir. Örneğin; kovalent bağlarlar ayrı ayrı çaprazlanmış biri uzun diğeri kısa zincirli bir çift-bağlı jel ile 1,000 J m-2'lik bir kırılma enerjisi elde edilir. Jel gerildiğinde kısa zincirli ağ enerjiyi yırtıp dağıtır. Ancak kısa zincirli ağın kopması kalıcı hasara neden olur. İlk yüklemeden sonra jeldeki bu hasar yenilenemez. Böylece, sonraki yüklemelerde kırılma enerjisi çok azalmış olur (Sun ve ark., 2012).

Yenilenebilir enerji dağıtıcı mekanizmaların etkinleştirilmesi için yapılan son birkaç çalışmada, seçilmiş kovalent bağların yerini kovalent olmayan bağlar almıştır. Örneğin, üç bloklu zincirlerin bir kopolimeri olan bir jelde, farklı zincirlerin uç blokları camsı bölgeler oluşturur ve farklı zincirlerin orta blokları iyonik çapraz bağlar oluşturur. Jel gerildiğinde, camsı bölgeler bozulmadan kalır, iyonik çapraz bağlar kopar ve enerjiyi dağıtır. İyonik çapraz bağlar, ilk yüklemeden sonraki zaman aralığında yeniden oluşur. Geri kazanılabilir enerji kaybı hidrofobik yapılar tarafından da gerçekleştirilebilir. Hidrofilik polimer ağında hidrofobik çift katmanlarla yapılan bir jel gerildiğinde çift katmanlar enerjiyi ayrıştırır ve dağıtır, boşaltma sırasında çift katmanlar yeniden toplanır ve yenilenir. Ancak bu konuda yapılan daha önceki çalışmalarda, çift-bağlı jellerininkiyle karşılaştırılabilir ya da ondan daha düşük kırılma enerjisi göstermiştir (Sun ve ark., 2012).

Hidrojeller, kusursuz organ entegrasyonu için yumuşak dokuların mekanik özelliklerine ve esnekliğine çok yakındır. Bununla birlikte, hidrojeller çok yumuşak olduklarında, doku bütünlüğünü korurken kullanımları zorlaşır. Bu zorluğun üstesinden gelmek için hidrojeller, hala yumuşak olan ancak geliştirilmiş mekanik sağlamlığa sahip olan hibritler oluşturmak için daha sert bileşenlerle takviye edilir (Hassanzadeh ve ark., 2013).

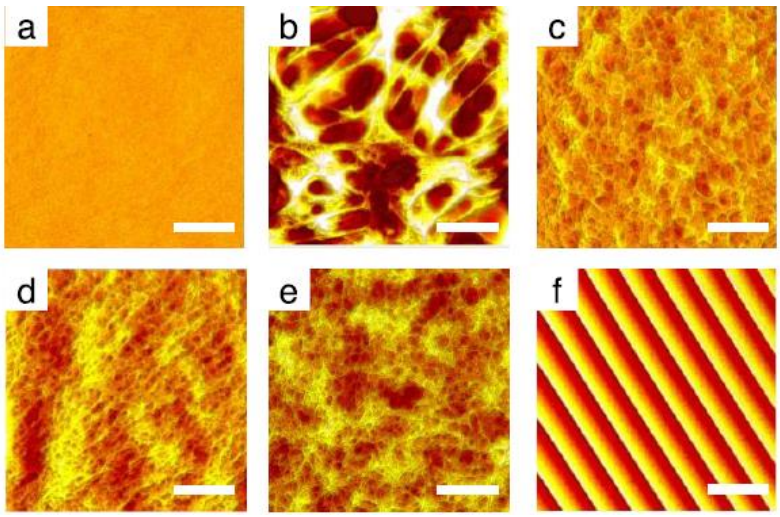
4.6.1.2 Hidrojellerin mekanik özellikleri üzerinde çalışmalar

Jelatin, hücre dışı matrisin en bol bileşenlerinden biri olan hidrolitik olarak bozulmuş bir kolajendir (Hassanzadeh ve ark., 2013). Düşük viskoziteli bir aljinat ve JelMA biyomürekkebi, baskı çözünürlüğünü ve hızını ve böylece kapsüllenmiş hücrelerin canlılığını artırmak için 3D baskı için geliştirilmiştir. Hidrojel yapılarının ilk şablonu, alginatın bir kalsiyum iyon çözeltisine maruz bırakılarak fiziksel çapraz bağlanmasıyla oluşturulmuştur. JelMA'nın kimyasal çapraz bağlanması, UV ışığa maruz bırakılarak gerçekleştirilmiştir (Jia ve ark., 2016; Guan ve ark., 2017). Suda çözünür bir foto başlatıcı kullanılarak oluşturulan foto çaprazlanmış JelMA, doku mühendisliği için kullanılan hidrojellerin içerdiği ilacı ve kardiyak ve vasküler doku mühendisliği uygulamalarında doku kültürü içinde suda çözünür jelatinin stabilitesini arttırır (Hassanzadeh ve ark., 2013).

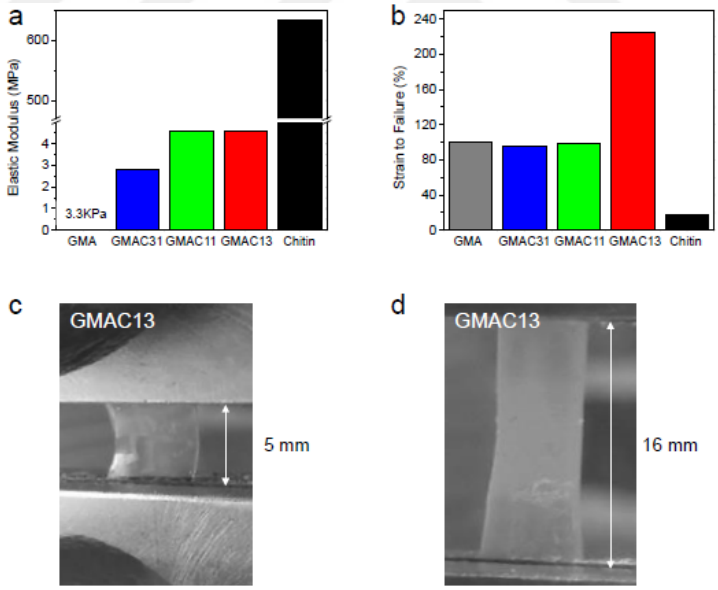
Hidrojeller, ağ yoğunlukları çok yükseldiğinde, azalmış bir difüzyon hızıyla karşı karşıya kaldıklarından, hidrojellerin mekanik özellikleri, çeşitli nanomateryaller eklenerek de modüle edilebilir. Örneğin inorganik nanopartiküller (kalsiyum fosfatlar ve silikatlar gibi), nanokompozit hidrojellerin mekanik mukavemetini ve osteojenik özelliklerini geliştirerek kemik dokusu rejenerasyonu için hidrojellere dahil edilmiştir (Guan ve ark., 2017; Zhao ve ark., 2010; Xavier ve ark., 2015).

Kitin, selüloz sonrası ikinci en bol doğal polisakkarittir. Kitin, kristalli nanofiberler olarak ortaya çıkar ve mantar hücre duvarlarının ana yapısal bileşeni ayrıca eklembacaklıların ve yumuşakça kabuklarının dış iskeletidir. Kitin, 2 GPa'lık esneklik katsayısı ve alüminyum ile kıyaslanabilir 140 MPa'lık nihai çekme mukavemeti ile mekanik olarak sağlamdır. Kitin biyomedikal uygulamaları arasında dikişler ve yara sargıları, doku mühendisliği iskeleleri, teşhis için mikro iğneler ve biyo-uyumlu elektronik cihazlar bulunur (Hassanzadeh ve ark., 2013).

Kitin nanofiber takviyesi kullanım ve bütünlüğün iyileştirilmesini sağlar ve hidrojellerin bozulmaması için gereken sertlik ve gerilmeyi arttırır. JelMA, jelatinin metakrilik anhidrit ile direkt reaksiyonu ile sentezlenen bir jelatin türevidir. Kitin nanofiberler, içinde kendiliğinden toplanır ve değişken kitin nanofiber içerikli GMAC (kitin nanofiberleri ile takviye edilmiş jelatin metakriloil) hibrid filmleri üretir (Şekil 13). GMAC31, GMAC11, GMAC13'teki kitin ve JelMA'nın nispi konsantrasyonunun arttırılması, beklendiği gibi kitin nanofiberlerinin artan bir fraksiyonuna sahip olan filmler vermektedir. (Şekil 3b, c ve d). Bu mikro yapı kontrolü, GMAC hidrojellerinin mekanik özelliklerini ince ayar yapmak için basit bir strateji sunar. 12.15 mikronluk ve 450 nm'lik yüksekliğe sahip mikro modeller, GMAC13 üzerinde çözelti bazlı replika kalıplama kullanılarak imal edilir. GMAC hidrojelleri, kitin nanofiber takviyesi olmayan JelMA muadillerinden daha sağlamdır (Şekil 14) (Hassanzadeh ve ark., 2013).

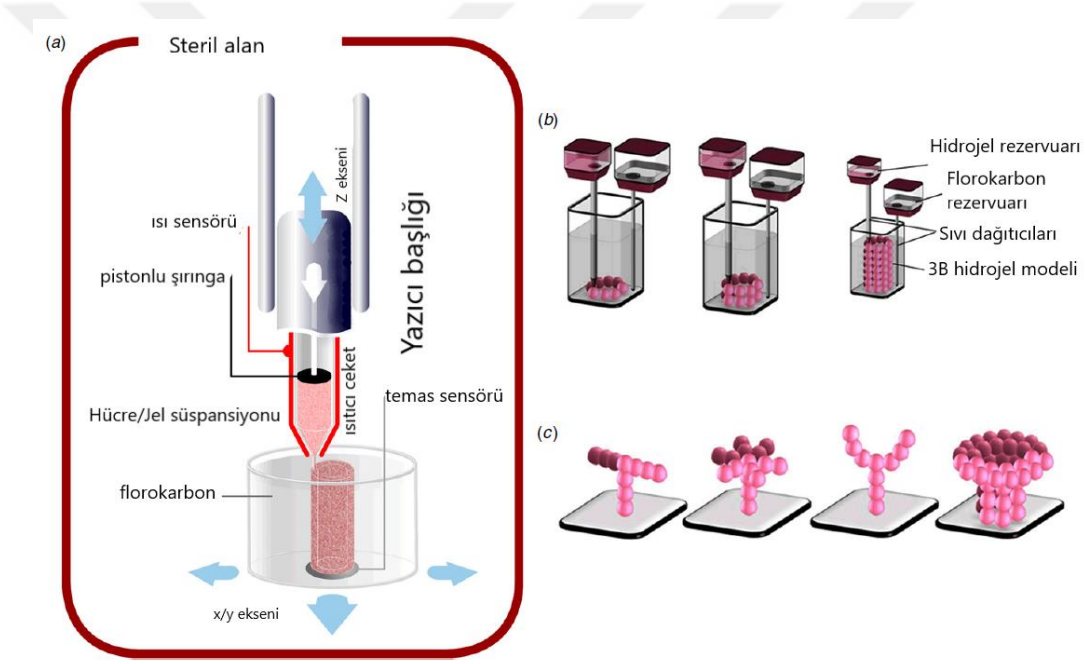


Şekil 13. A-E, JelMA topografik atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüleri, GMAC filmlerin farklı JelMA: kitin ağırlık oranları ve kitin. GMACXY, XY = JelMA: Kitin ağırlık oranına sahip GMAC filmlerdir. **A,** JelMA. **B,** GMAC31. **C,** GMAC11. **D,** GMAC13 ve **E,** Kitin. (ölçek çubukları 500 nm'dir). F, 12.15 mikron ve 450 nm'lik bir yüksekliğe sahip mikro-modelli GMAC13'ün topografik AFM görüntüsü (ölçek çubuğu 20 μm'dir) (Hassanzadeh ve ark., 2013).

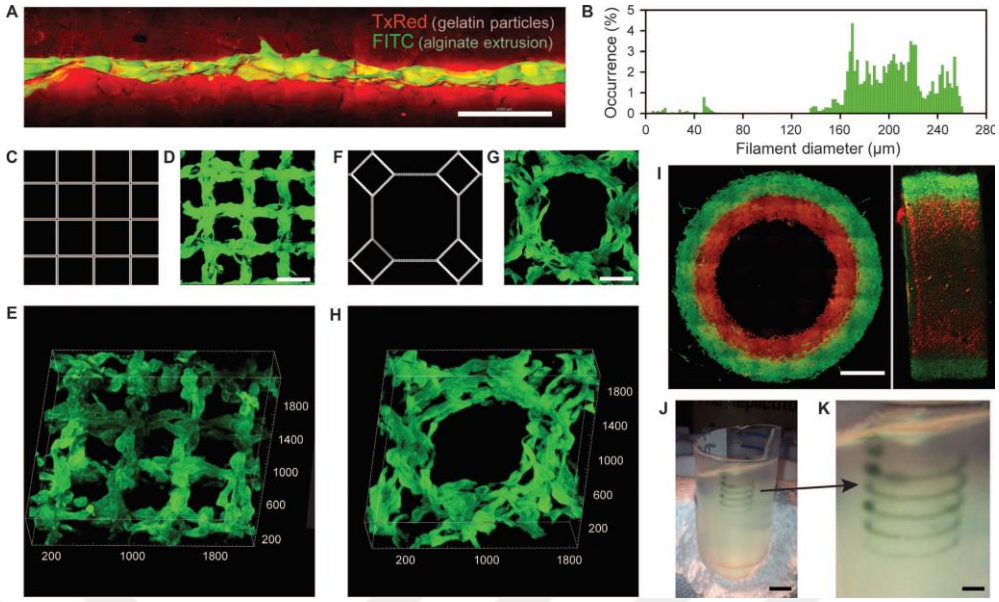


Şekil 14. Gerilme testi analizinden hibrid GMAC hidrojellerinin mekanik özellikleri, **A,** Mühendislik gerilme-gerinim eğrilerinde doğrusal bölgenin eğimlerinden elde edilen elastik modüller. Hidrojellerin farklı JelMA: kitin ağırlık oranları ile karşılaştırılması. Tüm GMAC hidrojelleri için elastik modül, JelMA1 için bildirilenlerden daha yüksektir ve bunlar sadece kitinden daha düşüktür. **B,** Farklı JelMA: kitin ağırlık oranlarına sahip hibrid hidrojellerde başarısızlık için mühendislik gerinimi hasar değerleri. GMAC13, GelMA1'den %100 daha fazla genleşebilir ve tek başına kitinden %200 daha uzayabilir. **C,** Mekanik gerilme test cihazında yük uygulamasından önce başlangıç durumunda GMAC13'ün optik görüntüsü. **D,** GMAC13'ün optik görüntüsü, %224'lük uzatılabilirlik gösterir. 16 mm'lik son uzunluğu gösteren çekme yükü (Hassanzadeh P. ve ark., 2013).

Son olarak, adipoz, kıkırdak ve kalp dokularından hücresizleştirilmiş ekstrasellüler matriks kullanılarak yeni bir dokuya özgü ekstrasellüler matriks bazlı biyomürekkep geliştirilmiştir. Bu biyomürekkepler bir çözelti halinde (%3) hazırlanarak, 15°C'nin altında bir çözelti halinde kalıp ve 30 dakika içinde 37°C'de jelleştirilmiştir. Kendinden destekli yapılar geliştirmek için, hidrojel ile birlikte bir poli-kaprolakton çerçeve basılmıştır. Bu çalışmanın ardından Kang ve ark. biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ile hücre yüklü hidrojelleri (jelatin, fibrinojen ve hyalüronik asitten oluşan) basmak suretiyle klinik olarak ilgili boyutta, vaskülarize yapılar geliştirmiştir (Güvendiren, 2016). Buna benzer bazı biyomateryal prosesleri ve analizleri şekil 15 ve 16'da verilmiştir.



Şekil 15. Bir florokarbon sıvısında batırılmış biyomateryalin prosesi. **A,** yüksek yoğunluklu hidrofobik sıvı, üç boyutlu baskı işlemi sırasında hücre-hidrojel yapılarını mekanik olarak destekler ve daha sonra kolayca çıkarılabilir. **B,** Florokarbonda gerçekleştirilen tabaka-tabaka biriktirme tekniğinin şematik görünüşü. **C,** Batırılmış biyomateryal stratejisini kullanan teorik olarak rastgele yazdırılabilir 3B şekilleri (Duarte Campos ve ark., 2013).



Şekil 16. FRESH (freeform reversible embedding of suspended hydrogels) kullanılarak yapılan hidrojel lifleri ve yapıların analizi. **A,** Jelatin destek banyosu (kırmızı) içine gömülü aljinat lif (yeşil). **B,** jelatin destek banyosu içinde izole aljinat liflerinin çapı 160 ila 260 mm arasındadır. (**C'den E'ye**) 3D baskıda dolgu için yaygın olarak kullanılan standart bir kare kafes modeli, 3D ile basılmış aljinat (yeşil). D, yukarıdan aşağı ve E olarak görüntülenmiştir. F'den H'ye bir sekizgen dolgu deseni, aljinat (yeşil) 3D ile basılır ve G yukarıdan aşağıya ve H olarak görüntülenmiştir. **I,** Kırmızı ve yeşil floresanla etiketli aljinatta, üst ve yanal kesitlerde gösterilen sürekli bir ara yüze sahip, iki maddeli silindir baskısı örneği. **J,** jelatin destek banyosuna gömülü olarak gösterilen bir sarmalın serbest formlu, düzlemsel bir FRESH baskısı örneği. **K,** FRESH'nin gerçek serbest formda baskı yapabildiğini ve standart katman katmanı düzlemsel imalatla sınırlı olmadığını gösteren, sarmalın yakınlaştırılmış bir görünümü. Ölçek çubukları; A, 1 mm. D ve G, 500 mm. I, 2 mm. J, 10 mm ve K, 2,5 mm'dir (Hinton ve ark., 2015).

4.7. Jelatin

Jelatin, kemiğin doğal bileşeni olan kollajenden elde edilen doğal, biyouyumlu ve toksik olmayan bir malzemedir. Doğal kollajene göre daha düşük immünojenite ve daha yüksek biyouyumluluk göstermektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar jelatinin kemik hücre adezyonu, migrasyonu, farklılaşması ve proliferasyonunu desteklediğini de göstermiştir (Echave ve ark., 2017; Shi ve ark., 2017; Pina ve ark., 2015; Kuttappan ve ark., 2016; Nguyen ve Lee, 2014; Martino ve ark., 2015). Jelatin birçok dokunun ana bileşeni olan kollajenin hidroliz ürünüdür ve hücre tutunmasını sağlayan arginin-glisin-aspartik asit dizisi içerir (Yue ve ark., 2015; Liu ve Chan-Park, 2010).

Jelatin metakrilat (JelMA), jelatine metakrilat grupları eklenmesi ile elde edilen, toksik olmayan ve biyoparçalanabilen bir polimerdir. JelMA, UV ışık altında çapraz bağlanabilmesi ve metakrilasyon derecesi ve çapraz bağlanma koşullarının değiştirilmesi ile ayarlanabilir mekanik özellikleri ilaç taşıyıcıların ve doku iskelelerinin hazırlanmasında çeşitli avantajlar sunmaktadır. Ayrıca arginin-glisin-aspartik asit dizisi de içermektedir (Liu ve ark., 2017; Kazemzadeh-Narbat ve ark., 2017).

JelMA'nın, stereolitografi biyobaskı, lazer tabanlı biyobaskı ve ekstrüzyon biyobaskı için biyomürekkep olarak kullanıldığı çalışmalar mevccuttur (Gauvin ve ark., 2012; Wang ve ark., 2016; Bertassoni ve ark., 2014; Ouyang ve ark., 2016). Mikrodamlacıklar ve mikro fiberler gibi biyolojik birleşim için kullanılan yapı taşları da GelMA kullanılarak üretilebilir (Jung ve Oh, 2014; Cheng ve ark., 2016). Bununla birlikte yine başka çalışmalarda, GelMA nispeten düşük Young modülüne sahip olduğundan (Yue ve ark., 2015), polietilen glikol diakrilat, polietilen glikol dimetakrilat ve aljinat gibi diğer hidrojeller veya silikon nanoparçacık ve karbon nanotüp gibi nanomalzemeler, mekanik özelliği geliştirmek için JelMA ile karıştırılmış ve biyofabrikasyon için yüksek biyouyumluluk sağlanmıştır (Wang ve ark., 2015; Kim ve ark., 2014; Colosi ve ark., 2016; Jia ve ark., 2016). Tüm bu özellikleri ve öncesinde yapılan çalışmalar doğrultusunda jelatin metakrilat tez kapsamında taşıyıcı olarak seçilmiştir.

4.8. Sentetik Silika Nanopartikülleri (Laponite)

Sentetik silika nanopartikülleri (Laponite) polimerlerin modülüs, kuvvet ve sertliğini geliştirmesinin yanı sıra kayma ile incelen, enjekte edilebilen nanokompozit hidrojellerin hazırlanmasında başarılı olarak kullanılan inorganik malzemelerdir (Li ve ark., 2016; Avery ve ark., 2016; Gaharwar ve ark., 2014; Gaharwar ve ark., 2013; Viseras ve ark., 2010; Carretero ve Pozo, 2010; Ashby ve Binks, 2000).

Nanosilika, yüksek oranda yüklü, 20-30 nm çapında ve yaklaşık 1 nm kalınlığında disk şeklindeki yapılardır. Yüzey yüklerinin kenarlarda pozitif, alt ve üst yüzeylerde negatif olmak üzere anizotropik dağılımı nedeniyle nanoplateletler sulu ortamda dinamik olarak kendinden oluşan kayma ile incelen (tiksotropik) sistemler

oluşturabilirler (Gaharwar ve ark., 2014; Vazao ve ark., 2014; Liu ve Bhatia, 2015). Sentetik silikalar fizyolojik koşullarda Na^{+},Mg^{2+}, $Si(OH)_4$ ve Li^{+} gibi toksik olmayan son ürünlere parçalanırlar. Ayrıca, insan kök hücresi ve hayvan hücrelerinde yapılan çalışmalarda da biyouyumlu olduğu kanıtlanmıştır (Gaharwar ve ark., 2014; Vazao ve ark., 2014; Ghadiri ve ark., 2013).

Silika nanopartikülleri osteojenik ajan olarak, ilaç taşıyıcı olarak, doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak, katı hemostat olarak, kozmetik kremlerde yardımcı madde olarak ve akış düzenleyici olarak sıklıkla başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Li ve ark., 2016; Avery ve ark., 2016; Gaharwar ve ark., 2014; Gaharwar ve ark., 2013; Viseras ve ark., 2010; Carretero ve Pozo, 2010; Ashby ve Binks, 2000).

Nano silikaların avantajları arasında büyük hacimlerde su tutma ve serbestleştirme yeteneği, kovalent bağlanma için geniş bir aktif yüzey alanının varlığı, düşük toksisite, iyi biyouyumluluk ve ilaçlar, büyüme faktörleri ve temel mineraller için taşıyıcı olarak hareket etme yeteneği yer alır. Silikaların olası sitotoksisitesini araştıran çok sayıda deney, bunların sadece kemik hücreleri için toksik olmadığını değil, aynı zamanda hücre kültürü çalışmaları için de uygun olduklarını göstermiştir. Ek olarak, silikaların nano ölçekli yüzey yapısı, osteoblast bağlanmasını ve çoğalmasını etkili bir şekilde artırabilir (Eivazzadeh-Keihan ve ark., 2020). Silika ile modifiye edilmiş matrislerde mekanik mukavemet ve strese karşı direnç artar, polimer iplikler ve lifler daha esnektir ve gerilime karşı geliştirilmiş bir direnç görülür. Mekanik basınç doğrudan silikalar aracılığıyla iletilir ve bu nedenle tüm iskele boyunca daha iyi dağıtılır. Silikalar, inorganik malzemelerin geliştirilmiş dağılımı nedeniyle matrislerin sertliğini ve gücünü artırabilir ve hibrit yapılarda daha iyi bir organik-inorganik ara yüz elde edilir (Tang ve ark., 2014; Ding ve ark., 2015; Tang ve ark., 2017)

Tüm bunlara ek olarak; nanosilikaların kök hücrelerin osteojenik farklılaşmalarını uyardığı bilinmektedir (Alarçin ve ark., 2018; Gaharwar ve ark., 2013). Dolayısıyla, tez kapsamında nanosilika tüm bu özelliklerinin yanı sıra kemik oluşumunu indüklemesi nedeniyle tercih edilmiştir.

4.9. Hyaluronik Asit (HA)

Hyaluronik asit, insan vücudunda bulunan asidik, sülfatsız bir glikozaminoglikandır. HA, dermisin bağ dokusunda ve vücudun diğer kısımlarında bulunur, hücredışı matrisin viskoelastisitesini koruyarak hücresel yapıyı destekler. Hyaluronik asit içeren hidrojeller, doku mühendisliğinde, doku rejenerasyonunda (örneğin yara iyileşmesi), ilaç taşımasında, kozmetikte ve ortopedide yaygın olarak kullanılır. Özellikle doku mühendisliğinde, hücre canlılığını, tutunmasını, çoğalmasını ve yerleşimini, osteojenik farklılaşmayı, vaskülarizasyonu, konak entegrasyonunu ve yük taşımayı geliştirmek için çok sayıda yapı iskelesi araştırılmıştır, bu da hyaluronik asidin kemik rejenerasyonundaki önemli rolünü ortaya koymaktadır (Martínez-Sanz ve ark., 2011; Silva ve ark., 2018; Tokatlian ve ark., 2012; Juhász ve Marmur, 2015; Amini ve ark., 2012).

Hyaluronik asidin ayrıca, yaralanma bölgelerinde doku iskelesi implantasyonu için iki faydalı özellik olan anti-adhezif ve antimikrobiyal olduğu bildirilmiştir. Hidrofilik doğal bir polimer olarak, Staphylococcus, β-hemolitik Streptococcus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus, Staphylococcus aureus gibi birçok yaygın ortopedik patojen üzerindeki antimikrobiyal etkileri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (Romanò ve ark., 2017; Ardizzoni ve ark., 2011; Carlson ve ark., 2004; Drago ve ark., 2014).

Hyaluronik asit, doku iskelesi malzemesi olarak kilit bir rol üstlenmktedir. Mevcut araştırmalara dayanarak, HA'nın genellikle sentetik bir iskelenin biyolojik özelliklerini iyileştirdiği görülmektedir. Ayrıca, yapı iskelelerinin osteojenik etkilerini daha da arttırmak için HA içeren yapı iskeleleri, osteoindüktif bileşikler veya diğer aracılar için vektör görevi görebilir (Sudheesh Kumar ve ark., 2018; Zhai ve ark., 2020).

4.10. Vankomisin

Streptomyces orientalis tarafından üretilen bir bakterisidal glikopeptid antibiyotik olan vankomisin, 1956 yılında ortaya çıkan penisilinaz üreten stafilokok suşlarını tedavi etmek için kullanılmıştır (Matzke ve ark., 1986). Vankomisin, Gram pozitif bakterilerin neden olduğu hayatı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde kullanılan

“son sıra” antibiyotik sınıflarından biridir. 1950'lerde keşfedilmesine rağmen, genel kullanımı, daha az toksik olduğu düşünülen yarı sentetik penisilinlerin (örn., Metisilin, oksasilin, nafsilin) gelişimi ile önemli ölçüde azalmıştır. Ancak, 1980'lerin başından bu yana MRSA enfeksiyonlarının sayısındaki istikrarlı yükseliş bir kez daha vankomisin kullanımı enfeksiyonların birincil tedavisi olarak ön plana çıkmıştır (Rybak ve ark., 2009; Wijesekara ve ark., 2017).

Vankomisin, Staphylococcus aureus ve diğer Stafilokok türlerine karşı yüksek bir antibakteriyel aktivite göstermektedir (Hachicha et al. 2006, Souli et al. 2001). Metisiline dirençli S. aureus içeren ciddi gram pozitif enfeksiyonların tedavisinde Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın kullanılan antibiyotiklerden biridir (Rybak ve ark., 2009).

Vankomisin, çoğu Clostridia suşuna, hemen hemen bütün Stafilokok aureus suşlarına (β-laktamaz ve metisiline dirençli suşlar üretenler dahil), koagülaz-negatif Stafilokok ve viridans grubu Stafilokok ve Enterokok'a karşı etkili bir ilaçtır. Vankomisin gram negatif bakterilere karşı etkili değildir (Wijesekara ve ark, 2017). Bu antibiyotik, beta-laktam antibiyotiklere karşı diğer bakteriyel direnç mekanizmalarının yanı sıra; MRSA (metisiline dirençli Staphylococcus aureus) ve penisiline dirençli pnömokokal enfeksiyonların ortaya çıkmasıyla daha da önem kazanmıştır (Bruniera, 2015).

Bu ilaç, gastrointestinal sistemden zayıf bir şekilde emildiği için, intravenöz uygulama denenmiştir. Ancak bu yolun, terapötik düzeylerde vankomisin seviyesine ulaşmak için yetersiz olduğu bulunmuştur (Hachicha ve ark., 2006; Souli ve ark., 2001). Vankomisinin mevcut dozaj biçimleri, enjeksiyonlar için 500 mg, 1 g, 5 g ve 10 g şişelerdir. Toz haline getirilmiş vankomisin, steril bir su içinde sulandırılarak hazırlanır, bu da koyu renkli bir çözelti ile sonuçlanır ve uygulandığında %5 dekstroz veya salin ile seyreltilir. Sulandırılmış çözelti oda sıcaklığında veya bir buzdolabında 14 gün boyunca stabildir. Ek olarak, oral uygulama için 125 mg ve 250 mg vankomisin tabletleri mevcuttur (Wijesekara ve ark., 2017).

Vankomisinin önceki zamanlarda kullanımı, infüzyonla ilişkili toksisiteler, nefrotoksisite ve olası ototoksisite dahil olmak üzere bir dizi olumsuz etki ile ilişkilendirilmiştir. Daha fazla araştırmanın üzerine, vankomisinin önceki formülasyonlarındaki safsızlıkların bu advers olayların çoğuna neden olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, daha yeni çalışmalardan elde edilen veriler, vankomisinin konvansiyonel dozajlarda kullanıldığında (örneğin, her 12 saatte bir 1 g [her 12 saatte 15 mg / kg]) eğer nefrotoksik ilaçlar ile birlikte veya çok yüksek dozlarda kullanılmadığı sürece, nefrotoksisite veya ototoksisite potansiyelinin çok küçük olduğunu göstermiştir (Rybak ve ark., 2009).

Vankomisin, genellikle diğer bütün tedaviler başarısız olduğunda kullanılan son çare olarak bilinir. Bununla birlikte, bakteriler vankomisine direnç geliştirmeye başlamış ve diğer antibiyotiklerin kullanımına da öncülük etmiştir (Hammes ve Neuhaus, 1974).

4.10.1. Vankomisinin genel özellikleri

Enjeksiyon için steril su ile sulandırıldığında vankomisin hidroklorür enjeksiyonu, oda sıcaklığında 2 hafta stabildir; üreticiler sulandırılmış enjeksiyonların önemli bir güç kaybı olmadan 2-8 ° C'de 96 saat saklanabileceğini belirtmektedir. %0,9 sodyum klorür enjeksiyonu veya %5 dekstroz enjeksiyonunda belirtildiği gibi sulandırıldığında, ilacın ADD-Vantage® şişelerinde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığında 24 saat boyunca stabildir. %0,9'luk sodyum klorür enjeksiyonu veya %5 dekstroz enjeksiyonunda, 5 mg/ml içeren vankomisin çözeltilerinin, cam veya PVC kaplarda 24 ° C'de saklandığında en az 17 gün, 5 ° C'de veya -10 ° C'de depolandığında cam kaplarda en az 63 gün boyunca stabil oldukları bildirilmektedir. Belirtildiği şekilde enjeksiyon için steril suyla yeniden sulandırıldıktan sonra, %5-30 dekstroz enjeksiyonunda 5 mg / ml konsantrasyona kadar seyreltilmiş vankomisin solüsyonları, 4° C'de 24 saat ve daha sonra da oda sıcaklığında 2 saat saklandığında stabildir (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vancomycin#section=Stability-Shelf-Life, Erişim tarihi: 10 Nisan 2020).

4.10.2. Vankomisinin etki mekanizması

Vankomisin, yapısal olarak glikopeptid olarak sınıflandırılan bir antibiyotiktir. Gram-pozitif bakterilere karşı özellikle etkilidir ve MRSA'nın dirençli suşlarına karşı etkili olduğu bilinmektedir (Hammes ve Neuhaus, 1974).

Vankomisin, hücre duvarı sentezini aerobik ve anaerobik Gram pozitif bakterilere karşı inhibe ederek bakterisidal aktivite sergiler (Wijesekara ve ark., 2017). Bu antimikrobiyal ajanın etki mekanizması, bakteriyel hücre duvarı biyosentezinin inhibisyonu veya daha spesifik olarak, peptidoglikan biyosentezinin inhibisyonu yoluyla gerçekleşir. Bakteriyel hücre duvarı bütün bakterileri saran peptidoglikan içerir (Bruniera, 2015). Hücre duvarının peptidoglikan tabakası, çapraz bağlanmış yapısı nedeniyle katıdır. Peptidoglikan bakteri tabakasının sentezi sırasında, yeni peptidoglikan yapı blokları (yani, N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin monomerleri) zara sokulur. Peptit çapraz bağlarının yeniden düzenlenmesi, transpeptidaz enzimi ile gerçekleşir (Hammes ve Neuhaus, 1974).

Gram-pozitif bakterilerde bu madde daha belirgin bir şekilde bulunur ve hücre zarının dış kısmında büyük ve çözünmez katmanlar oluşturur, bu da birden fazla amino şeker iskeletinden oluşan 40 katmana kadardır: N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik (Bruniera, 2015). Vankomisin, peptidoglikanın yapı bloklarına (yani, N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin monomerleri) bağlanır ve transpeptidazın bu yeni oluşturulan bloklar üzerine etki etmesini önler ve böylece peptidoglikan tabakasının çapraz bağlanmasını önler. Bunu yaparak vankomisin, peptidoglikan katmanını daha az sert ve daha geçirgen hale getirir. Bu, bakterilerin hücresel içeriğinin sızmasına ve sonunda bakterilerin ölmesine neden olur. Transpeptidaz enzimindeki mutasyonlar vankomisine direnci arttırabilir (Hammes ve Neuhaus, 1974).

4.10.3. Vankomisinin farmakolojik özellikleri

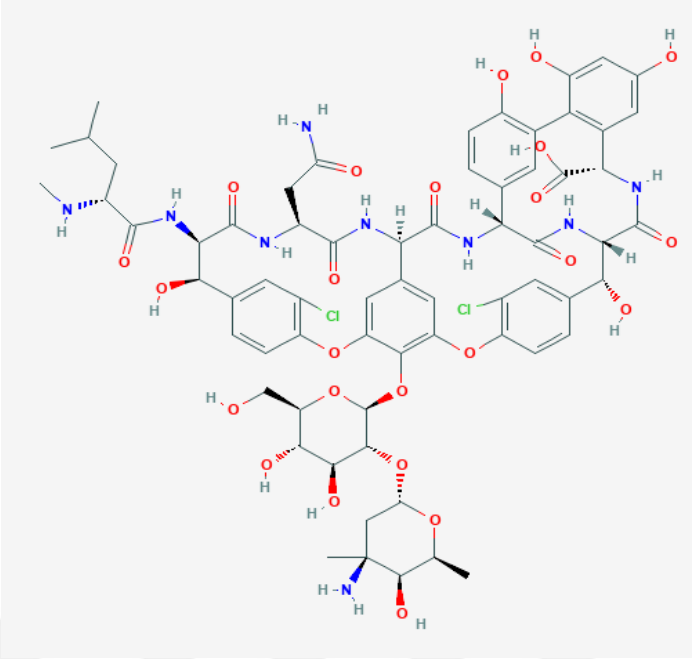
Vankomisin, genellikle sadece diğer antibiyotiklerle yapılan tedaviden sonra kullanılan "son çare ilacı" olarak ayrılan dallanmış bir trisiklik glikosile edilmiş nonribozomal peptittir. Listeria monocytogenes, Streptococcus pneumoniae

(penisiline dirençli suşlar dahil olmak üzere), Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, tür Actinomyces, ve Lactobacillus türlerinde vankomisin in vitro ve klinik enfeksiyon hem de aşağıdaki mikroorganizmaların en suşlarına karşı aktif olduğu gösterilmiştir. Vankomisin ve bir aminoglikosit kombinasyonu, birçok Staphylococcus aureus, Streptococcus bovis, enterococci ve viridans grubu streptokok suşlarına karşı in vitro olarak sinerjistik etki gösterir.

Vankomisin, çoğu organizmaya karşı bakterisidal aktiviteye ve enterokok üzerinde bakteriyostatik etkiye sahiptir. Penisilin ve sefalosporinlerden farklı bir bölgede, vankomisin, hücre duvarı öncüllerinin D-alanil-D-alanin kısmına sıkıca bağlanır ve böylece bakteriyel hücre duvarı sentezine müdahale eder. Bu, hücre duvarını parçalayarak tahrip eden bakteriyel otolisinlerin aktivasyonuna yol açar. Vankomisin ayrıca, bakteriyel sitoplazmik membranların geçirgenliğini de değiştirebilir ve seçici olarak RNA sentezini inhibe edebilir (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vancomycin#section=Pharmacology-and-Biochemistry, Erişim tarihi: 10 Nisan 2020).

4.10.4. Vankomisinin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri

Vankomisin, bakteri hücre duvarı peptidoglikan sentezinde geç bir aşamayı inhibe eden, 1448 Da moleküler ağırlığa sahip büyük bir glikopeptid bileşiğidir (Şekil 17). Vankomisin içinde mevcut olan amino asitler sentezlenir, bir araya getirilir ve vankomisin bir araya getirilmesi için çapraz bağlanır. Vankomisinin üç boyutlu yapısı, sadece bakteri hücre duvarlarında bulunan, oldukça spesifik bir L-alanil-D-alanil-D-alanil konfigürasyonunun peptidleri ile hidrojen bağlanmasına uyan bir yarık içerir; bu nedenle vankomisin, stabil kompleksler oluşturarak seçici olarak toksiktir (Wijesekara ve ark., 2017).



Şekil 17. Vankomisinin kimyasal yapısı (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vancomycin#section=2D-Structure, Erişim tarihi: 10 Nisan 2020)

Vankomisinin aktivitesini etkileyen faktörler doku dağılımı, protein bağlanması, inokülum boyutu ve dirençli organizmalardır. İnsanlarda dağılım hacmi 0,4-1 L / kg'dır. Vankomisinin proteine bağlanması %10 ila %50 arasındadır. Minimum inhibitör konsantrasyonunda 1-8 kat artış, albümin varlığının bir sonucu olarak çeşitli in vitro değerlendirmelerde gösterilmiştir, oysa serum varlığının daha değişken bir etkisi olmuştur. İn vitro bir farmakodinamik modelde, insan hastalarından izole edilen metisiline duyarlı Stafilokoklar ve metisiline dirençli Stafilokok organizmaları için öldürme süresinin, inokulum ebadı yüksek olduğunda (9,5 log10 CFU / g), orta dereceli bir inokuluma kıyasla (5,5 log10 CFU / g) karşılaştırıldığında daha uzun olduğu açıktır (Wijesekara ve ark., 2017).

Vankomisin çoğu vücut boşluğuna nüfuz eder ve penetrasyon mevcut iltihaplanma derecesine bağlıdır. Vankomisinin farklı vücut boşluklarındaki konsantrasyonu farklıdır. İltihaplı beyin omurilik zarları, vankomisinin beyin omurilik sıvısına nüfuz etmesini arttırır, rapor edilen konsantrasyonları 6,4-11,1 mg / L iken, iltihaplı olmayan beyin omurilik zarları insanlarda düşük 0-3,45 mg / L konsantrasyonlarına neden olur. Assitlik, perikardiyal, plevral ve sinovyal sıvılarda vankomisinin

terapötik konsantrasyonları insanlarda 2,5 mg / L'den fazladır (Wijesekara ve ark., 2017).

Vankomisin dozunun %80'inden fazlası ve %50'si, sırasıyla insanlara verildikten sonra 24 saat içinde idrarda (çoğunlukla glomerüler filtrasyon yoluyla) değişmeden salınır, karaciğer dokusunda ve safrada vankomisin konsantrasyonu saptanabilir değerin altındadır. Vankomisin, 30 dakika ila 1 saat arasında bir dağılım fazına sahiptir. İnsanlarda normal kreatinin klirensi olan hastalarda vankomisinin yarı ömrü yaklaşık 6 saattir (Wijesekara ve ark., 2017).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Jelatin (Tip A, Domuz derisinden, 300 bloom), Sigma, Almanya

Laponite® XLG, (Nanosilika), BYK, Amerika Birleşik Devletleri

Hyaluronik asit (HA) – Lifecore, Amerika Birleşik Devletleri

Vankomisin Hidroklorür – Mustafa Nevzat, Türkiye (hediye)

Metakrilik anhidrit, Sigma, Almanya

Irgacure 2959, 2-hidroksi-1-(5-(hidroksietoksi) fenil)-2-metil-1-propanon, Sigma, Almanya

SYLGARD® 185, Sigma, Almanya

Phosphate buffered saline, Thermofisher, Almanya

5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3B Dual Biyoyazıcı- Axolotl Dual biyoyazıcı, Axolotl Biyosistemler, Türkiye

UV, Omnicure S2000, Excelitas Technologies, Amerika Birleşik Devletleri

Radyometre, Omnicure R2000, Kanada

Liyofilizatör, Christ alpha 1-2 LD plus, Almanya

AFM- Ambient AFM/Nanomagnetics Instruments, Türkiye

AFM probu- Nanosensors, PPP-NCLR, İsviçre

Vorteks, IKA MS2, Almanya

Spektrofotometre, Mettler Toledo

12–15 kDa cut-off diyaliz tüpü, Sigma, Almanya

Dijital kumpas- Mitutoyo / CD-15CPX, Almanya

Ultrasonik banyo- Bandelin Sonorex / RK 515, Almanya

Çalkalayıcılı su banyosu, Certomat WR -B.Braun, Almanya

pH metre- Mettler Toledo/Sevenexcellence, Amerika Birleşik Devletleri

Mikropipet- Rainin (10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL), Almanya

Filtre- Chromafil/PET-55/25, Almanya

Etüv- Binder/FD250, Almanya

Erime noktası tayini cihazı-Thermo Scientific-TA9300

Buzdolabı- Bosch, Almanya

5.3. Vankomisin Hidroklorürün Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini

5.3.1. Vankomisin hidroklorürün erime derecesinin tayin edilmesi

Toz halindeki vankomisin hidroklorür bir ucu kapalı kılcal cam boruya doldurularak erime derecesi tayin cihazına yerleştirilmiştir. Etkin maddenin fiziksel değişim göstermeye başladığı, eridiği sıcaklık belirlenmiştir.

5.3.2. Vankomisin hidroklorürün çözünürlüğünün tayin edilmesi

Çözünürlük tayini için 10 ml'lik degaze edilmiş PBS çözeltisinin içerisine kısım kısım vankomisin hidroklorür tartılıp ilave edilerek çözündürülmüştür. Alınan numuneler UV spektrofotometrede okunmuştur. Tartım ve ekleme işlemine okunan absorbans değeri değişmeyene kadar devam edilmiştir.

5.3.3. Vankomisin hidroklorürün fouirer transform infrared (FTIR) spektrumunun incelenmesi

Vankomisin hidroklorürün infrared (IR) spektrumu, 400-4000 cm^{-1} dalga boylarında tarama yapılarak belirlenmiştir.

5.4. Vankomisin Hidroklorürün Kantitatif Tayini

5.4.1. Vankomisin hidroklorürün ultraviyole (UV) spektrumu

Etkin madde miktar tayini ve *in vitro* çözünme hızı çalışmalarında spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Vankomisin hidroklorüre ait UV absorbans değerleri, degaze edilmiş fosfat tamponuna karşı ölçülmüştür. 10 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan stok vankomisin hidroklorür çözeltisinin uygun hacimleri kullanılarak, ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek degaze edilmiş fosfat tamponunda 0,6 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml konsantrasyonlarındaki çözeltileri hazırlanmıştır. Elde edilen 100 µg/ml konsantrasyondaki çözeltinin 190-500 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınarak en yüksek absorbans verdiği dalga boyu saptanmış ve bu dalga boyu tüm tayinlerde kullanılmıştır.

5.4.2. Vankomisin hidroklorürün miktar tayini

6 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan stok vankomisin hidroklorür çözeltisinin uygun hacimleri kullanılarak, ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek degaze edilmiş fosfat tamponunda 0,6 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml konsantrasyonlarındaki çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir çözeltinin UV spektrofotometrede maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu olan 286,6 nm'deki absorbansı ultrasonik banyoda bekletilerek degaze edilmiş fosfat tamponuna karşı okunmuştur. Doğru denklemi ve korelasyon katsayısı en küçük kareler yöntemi ile hesaplanmıştır. Her bir konsantrasyon için 6 paralel olarak çalışılmıştır. Bu verilerle hazırlanmış olan standart eğri etkin madde miktar tayini ve in vitro etkin madde salım çalışmlarında kullanılmıştır.

5.4.3. UV spektrofotometrik yöntem validasyonu

Analitik yöntemin validasyonu, bir test yönteminin belirli koşullar altında kesin ve doğru bir şekilde sürekli olarak beklenen sonucu verdiğinin kanıtlanmasıdır (Guideline). Bu çalışmada kullanılan spektrofotometrik yöntem validasyonu için doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), doğruluk (accuracy) ve stabilite (stability) çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

5.4.3.1. Doğrusallık

Doğrusallık, analitik bir yöntemin belirlenen aralıkta, deney sonuçları ile analizi yapılan maddenin konsantrasyonun direk olarak orantılı olması durumudur. Bu amaçla 10 mg vankomisin PBS içerisinde 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra balon joje içerisinde 100 ml'ye tamamlanan çözeltiden alınan stok çözeltilerden 0,6 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml konsantrasyonda vankomisin olacak şekilde PBS ile seyreltmeler yapılarak 6 farklı çözelti oluşturulmuştur. Çözeltilerin absorbanslarını ölçek için UV spektrofotometresi ile 286,6 nm de okuma yapılmıştır. 6 farklı derişim için 9 paralel deney yapılarak elde edilen veriler tablo haline getirildikten sonra en küçük kareler yöntemi yardımıyla doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edildi.

5.4.3.2. Kesinlik

Kesinlik, analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesini gösteren aynı örnek çözeltiden seyreltilerek hazırlanan serilerin ölçümü sonucu elde edilen verilerin uyumlu olması durumudur. Standart sapma ve relatif standart sapma (% RSD) değerleri ile belirtilir. Kesinlik, yöntemin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik özelliklerini ifade eder. Analitik yöntemin tekrarlanabilir olduğunun söylenebilmesi için RSD değerinin %2' den küçük olması önerilmektedir.

5.4.3.2.A. Tekrar edilebilirlik (Gün içi kesinlik)

Bir analitik yöntemin tekrar edilebilirliği aynı gün içinde, aynı çalışma koşulları altındaki ölçüm değerlerindeki kesinliği ifade etmektedir. Metod 5.4.3.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan 6 farklı konsantrasyonda 3 paralel örnek üzerinde aynı gün içerisinde yapılan çalışmalar sonucunda absorbanslar 286,6 nm'de okutularak mevcut doğru denklemi üzerinde yerleştirildi. Bu verilerile SD ve %RSD hesaplamaları yapıldı.

5.4.3.2.B. Tekrar elde edilebilirlik (Günlerarası kesinlik)

Bir analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğini farklı günlerde aynı yöntemle hazırlanan örnekler arasındaki kesinliği ifade etmektedir. 3 paralel Metod 5.4.3.1.'de anlatıldığı şekilde 3 farklı günde hazırlanarak ve okutularak elde edilen veriler ile mevcut denklem kullanılarak SD ve %RSD hesaplamaları yapıldı.

5.4.3.3. Doğruluk

Doğruluk, analitik yöntemle elde edilen sonuçların gerçek değerlere yakınlığı ile ölçülür. Doğruluğu ölçmek için vankomisin'in düşük (0,1 mg/ml), orta (0,4 mg/ ml) ve yüksek (0,6 mg/ml) konsantrasyonlarındaki çözeltileri 5.4.3.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlandı. UV spektrofotometre ile 286,6 nm'de 6 paralel okundu.

5.4.3.4. Stabilite

Yöntemin stabilitesini belirlemek için 0,6 μg/ml konsantrasyonda pH 7,4 PBS içerisinde vankomisin çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltilerin absorbansları belirlendikten sonra 1 hafta boyunca 37 °C'de bekletilmiş ve belirlenen zaman aralıklarında numuneler alınarak absorbansları tayin edilmiştir.

5.5. Jelatin Metakrilatın Hazırlanması ve Karakterizasyonu

5.5.1. Jelatin metakrilatın hazırlanması

Çalışmanın ilk aşamasında iki farklı oranda metakrile olan iki farklı JelMA sentezlenmiştir. JelMA sentezinin ilk aşamasında, 10 g (%10 a/h) jelatin (tip A, Sigma, 300 bloom) pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 50 ºC'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma tamamlandıktan sonra bu çözeltiye çok yavaş olacak şekilde damla damla metakrilik anhidrit ilave edilmiştir. Bunun için yüksek oranda metakrile olan JelMA'ya 8 µL metakrilik anhidrit eklenmiştir. Eklemenin ardından çözelti 3 saat boyunca 50 ºC'de karıştırılmıştır. Süre tamamlandıktan sonra reaksiyon, çözeltinin 50 ºC'de Dulbecco'nun fosfat tamponu ile 5 kat oranında dilüe edilmesiyle durdurulmuştur. JelMA çözeltisi tuzları ve reaksiyona girmeyen metakrilatı uzaklaştırmak için 10 gün boyunca diyaliz membran ile (12-15 kDa cutoff) diyaliz edilmiştir. Diyaliz tamamlandıktan sonra JelMA diyaliz membrandan alınarak ısıtılır ve içerisine ultra saf su eklenir. Bu çözelti 40ºC'de sabitlenerek 15 dakika bekletilir. Daha sonra çözelti Falcon tüplere doldurulup -80 ºC'de yatay biçimde şoklanır. Liyofilizatör ile kurutulur ve dondurucuda saklanır. JelMA çözeltisi -80ºC'de dondurulduktan sonra liyofilize edilerek beyaz köpük halinde elde edilmiştir. Hazırlanan JelMA, kullanılana kadar -20 ºC'de saklanmıştır (Kazemzadeh-Narbat et al. 2017, Nichol et al. 2010).

5.5.2. Jelatin metakrilatın Fouirer Transform Infrared (FTIR) spektrumunun incelenmesi

JelMA'nın metakilasyon derecesi ve fonksiyonel gruplar FTIR ile de teyit edilmiştir (Sadeghi and Heidari 2011). Bunun için jelatin ve sentezlenen iki farklı jelatin metakrilatın spektrumları 400-4000 cm^{-1}'de taranmıştır.

5.5.3. Jelatin metakrilatın ^{1}H Nükleer Manyetik Rezonans (^{1}H NMR) spektrumunun incelenmesi

1H-NMR analizi için örnekler 40 ºC'de D_2O içerisinde çözündürülmüştür. Spektrum Varian UNITY INOVA cihazı ile alınmıştır.

5.6. Nanosilikanın FTIR spektrumunun incelenmesi

Formülasyonda kullanılacak olan nanosilikanın yapısı FT-IR spektrumu alınarak değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, nanosilikanın spektrumu 400-4000 cm^{-1}'de taranmıştır.

5.7. 3-(Trimetoksisilil)propil metakrilat TMSPMA ile kaplı cam lamların hazırlanması

3B biyoyazım sırasında JelMA'nın tutunabileceği yüzeyler oluşturmak için, cam lamların yüzeyinde serbest metakrilat grupları oluşturulmuştur. Bu kapsamda cam lamların yüzeyi, TMSPMA ile muamele edilmiştir. Bunun için ilk aşamada cam lamlar NaOH içerisinde bekletilmiştir. Sonra, lamlar teker teker %100, %90 ve %70'lik bir seri alkol dizisi ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Devamında 80 ^{0}C'lik etüvde bekletilmiştir ve lamların üzerine TMSPMA eklenerek ve 80 ^{0}C'de 12 saat bekletilmiştir. Son olarak etanolle birkaç kez yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur (Kazemzadeh-Narbat ve ark., 2017).

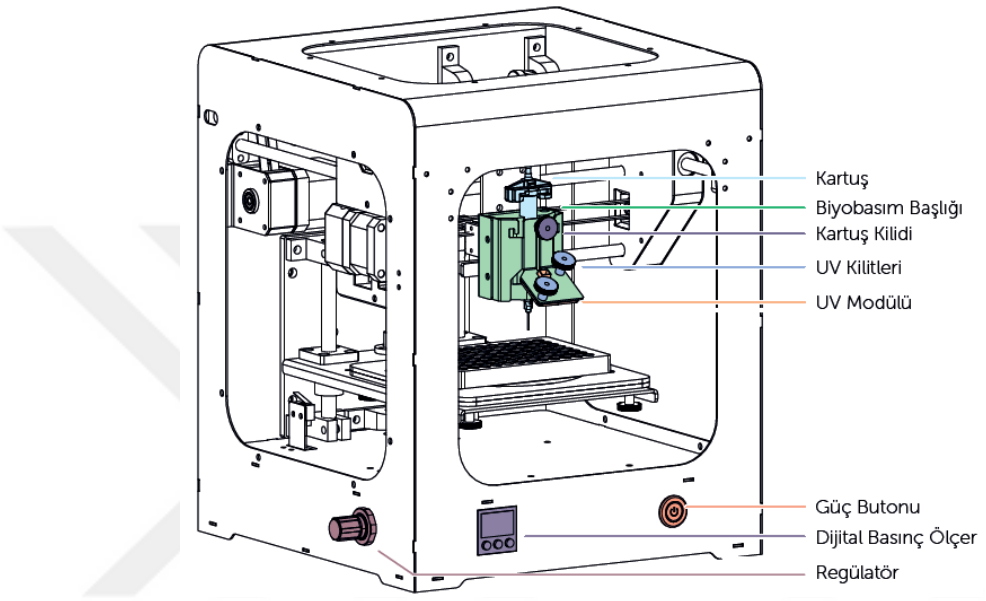
5.8. 3B Biyoyazıcı ile Nanokompozit Doku İskelelerinin Hazırlanması

5.8.1. 3B Nanokompozit hidrojel biyomürekkeplerin hazırlanması

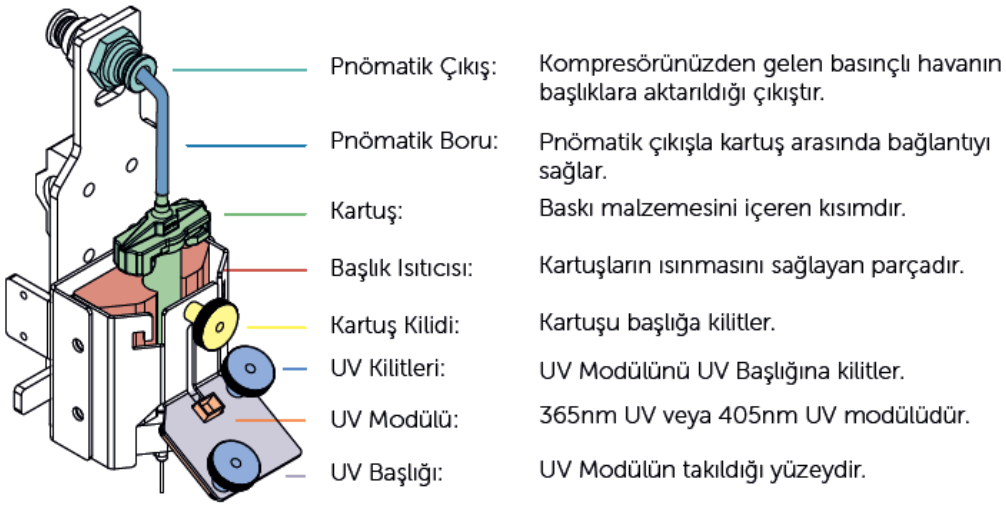
Çalışma kapsamında öncelikle farklı oranlarda nanosilika (% 0, 1, 2 veya 3) distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda 500 rpm'de 30 dakika dispers edilmiştir. Etken madde içeren biyomürekkep karışımlarına bu aşamada 4 mg/ml vankomisin ilave edilmiştir. Devamında farklı oranlarda (%0, 1 ve 2) hyaluronik asit eklenerek 500 rpm'de 30 dakika karıştırılmıştır. Hazırlanan hidrojel homojen olduktan sonra farklı oranlarda JelMA (%8, 10 ve 12) ve %0,5 fotobaşlatıcı eklenerek 60 ^{0}C'de homojenize edilmiştir. Hazırlanan biyomürekkep karışımı kartuş içine alınmıştır. 3B basım sonrası UV ile çapraz bağlanmıştır. Yazılabilen formülasyonlar yazdırım sonrasında hemen 90 sn UV ışımaya (360−580 nm, güç 5,07 W cm^2, ve 8 cm ışık kaynağından uzaklık) maruz bırakılmıştır ve UV bağlanımları gözlemlenmiştir.

5.8.2. Ekstrüzyon destekli biyoyazıcı

Çalışma kapsamında ekstrüzyon tipi biyoyazıcı (Axolotl Dual biyoyazıcı, Axolotl Biyosistemler) kullanılmıştır (Şekil 18 ve Şekil 19). Bu kapsamda, biyomürekkepler tek kullanımlık plastik şırıngalara (kartuş) yerleştirilmiş ve pnömatik piston ile oluşturulan basınç ile biyomürekkep tabaka tabaka basılmıştır.

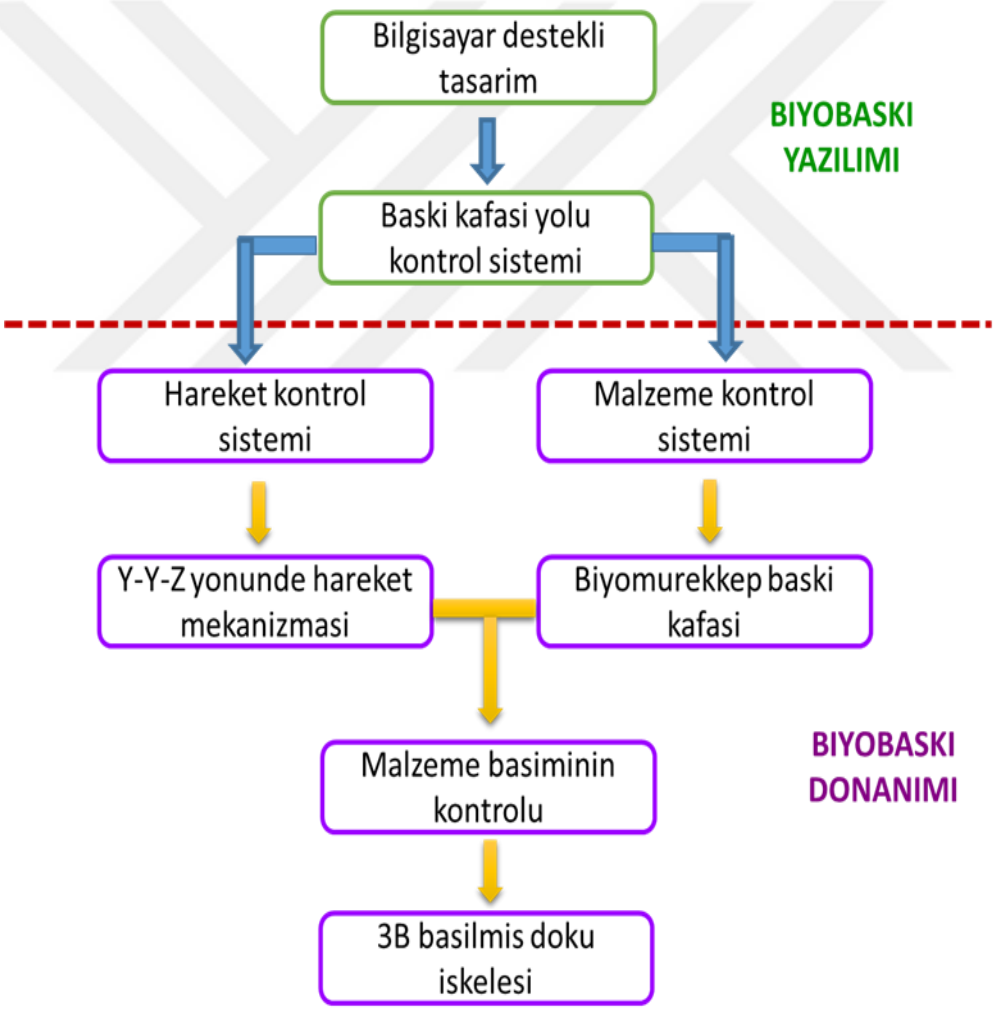


Şekil 18. Axolotl Biyoyazıcıya ait detaylı ürün haritası (Axolotl Manual)



Şekil 19. Axolotl Biyoyazıcıya ait başlık kısmına ait detaylı ürün haritası(Axolotl Manual)

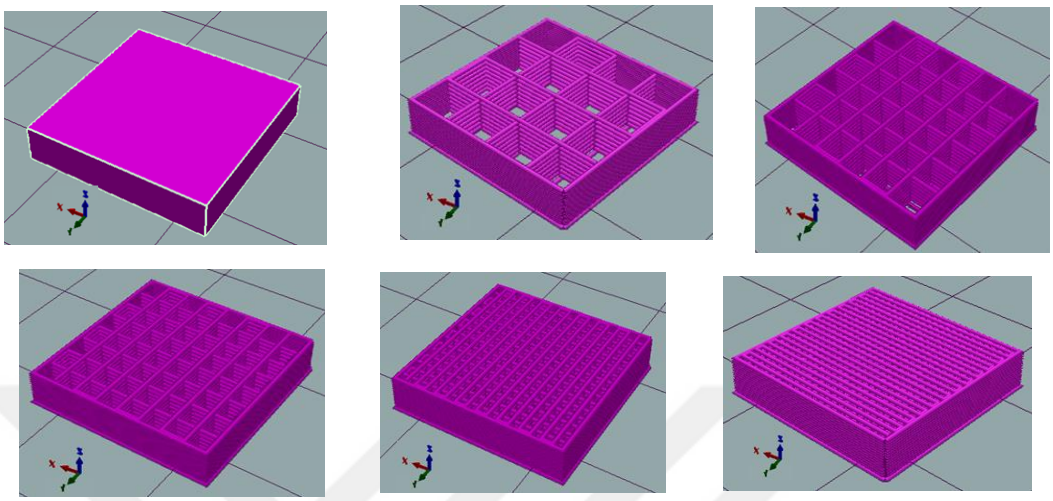
Biyobasım işlemi sırasında ilk olarak kullanılacak model bilgisayar ortamında (G-code) tasarlanmıştır. Model tasarıma uygun şekilde dilimlenmiştir. Devamında optimize edilen biyomürekkepler kartuş içerisine alınmış, biyoyazıcı üzerindeki yuvaya yerleştirilmiş ve iğne ucuna göre kalibrasyon yapılmıştır. Hazırlanan malzemenin akış özellikleri ve iğnenin çapına bağlı olarak basınç, katmanların yüksekliği, kafanın hareket hızı, dilimleme şekli ve yoğunluğu ve işlem sırasında kafa ve tabla sıcaklığı gibi parametreler optimize edilmiştir. Basılan doku iskelesi hızlı bir şekilde UV ile kürlenmiştir.



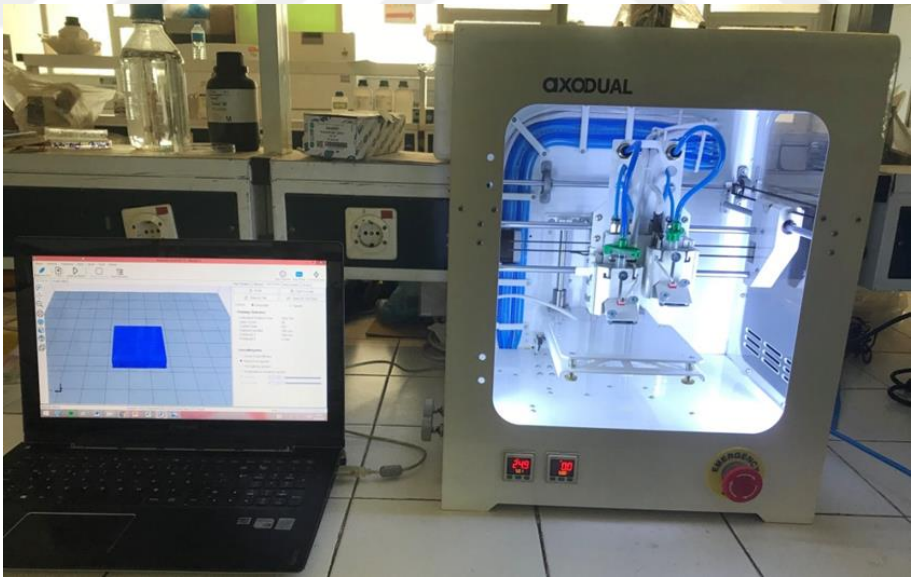
Şekil 20. Biyobasım işleminin adımları (Li ve ark, 2016)

5.8.3. 3B Nanokompozit doku iskelelerinin tasarlanması

Doku iskeleri G-Code formatında tasarlanmıştır.



Şekil 21. Tasarlanan doku iskeleleri

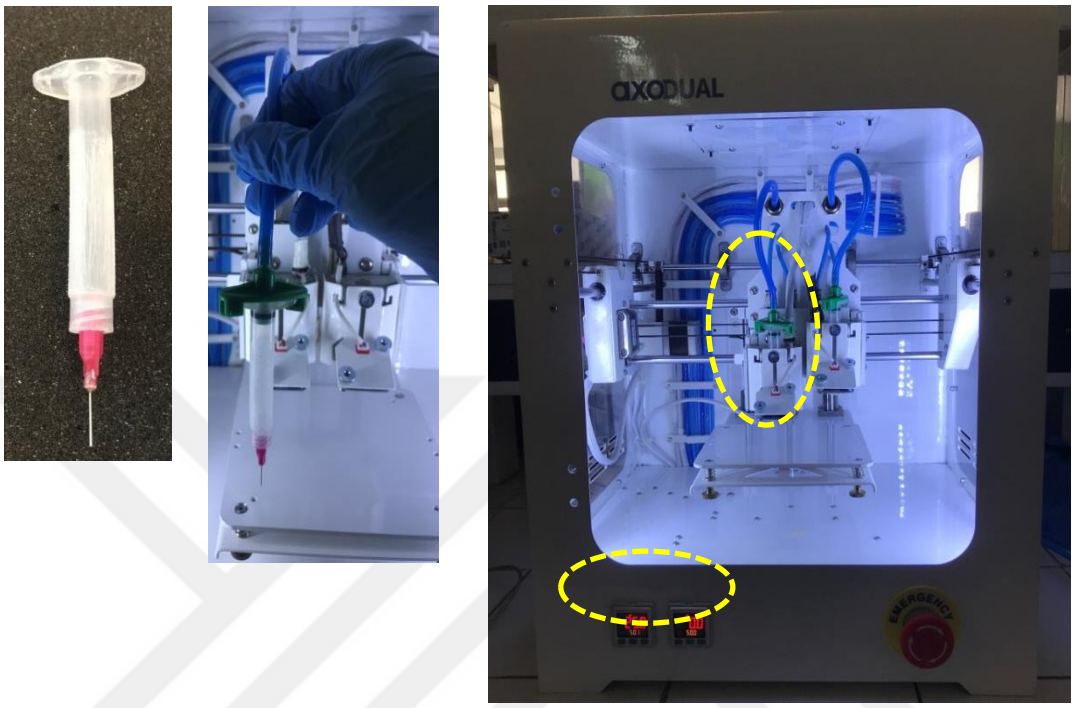


Resim 1. 3D Biyoyazıcı Sistemi

5.8.4. 3B Nanokompozit doku iskelelerinin üretimi

Hazırlanan biyomürekkep karışımı 5 ml'lik kartuş içerisine alınarak 3B yazıcıya yerleştirilmiştir. Tasarlanan G-Code temel alınarak yazıcı tablası üzerine yerleştirilen

TMPPSA kaplı lameller üzerine basılması için iğne ucu temel alınarak üç eksenli merkezleme işlemi yapılmıştır ve basım işlemi gerçekletirilmiştir. Yazım oda sıcakığında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 22. Biyomürekkeplerin kartuş ile biyoyazıcıya yerleştirilmesi. A, belirlenen çaptaki iğne kartuşa sabitlenir ve biyomürekkep kartuş içerisine alınır. B, kartuş pnömotik boruya bağlanır. C, kartuş yazıcı üzerindeki yuvaya yerleştirilerek kilit ile başlığa kilitlenir ve basınç ayarlanır.

5.8.5. Biyobasım optimizasyonu

Bu kapsamda ekstrüde edilebilirlik, malzemeyi belirli bir akış hızında ekstrüde etmek için minimum pnömatik basınç olarak tanımlanmıştır (Gao et al. 2018). Farklı hidrojel formülasyonlarının akış hızını kontrol etmek için basınç, her test için ekstrüzyon filamentlerinin ağırlığı eşit olana kadar ayarlanmıştır. Basım sırasında 25G küt iğne kullanılmıştır. Optimizasyon sırasında basım hızı (0-50 mm/s), basınç (10-45 psi) ve iç yoğunluğu (1-100%) optimize edilmiştir.

5.9. Etkin madde içermeyen nanokompozit doku iskelelerinin karakterizasyonu

5.9.1. Hazırlanan biyomürekkeplerin Reolojik özelliklerinin Karakterizasyonu

Hazırlanan biyomürekkep karışımlarının reolojik davranışları 25 mm yarıçaplı parallel-plaka geometrisi ile Anton Paar MCR 301 reometre kullanılarak incelenmiştir. Test sırasında plakalar arası mesafe 0,3 mm olarak ayarlanmıştır. Frekans süpürme deneyleri, 0,01-100 Hz frekans ve 0,1-100 rad/s kesme hızı aralığında gerçekleştirilmiştir. Testler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Biyobasım sırasında biyomürekkebin kartuşa bağlı olan iğneden homojen bir akış ile çıkması gerekmektedir. Bu kapsamda depolama modülü (G'), kayıp modülü (G") ve viskozite (η) hesaplanmıştır (Petta ve ark., 2018).

5.9.2. Hazırlanan 3B doku iskelelerinin Fouirer Transform Infrared (FTIR) spektrumlarının incelenmesi

Vankomisin içeren ve içermeyen doku iskeleleri hazırlandıktan sonra distile suda 1 saat bekletilmiş ve derin dondurucuda -20 ºC'de 24 saat boyunca bekletilmiştir. Ardından 24 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen örneklerin FT-IR spektrumları 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} arasındaki dalga boyu aralığında belirlenmiştir.

5.9.3. Hazırlanan 3B doku iskelelerinin atomik kuvvet mikroskobu ile yüzey karakterizasyonu

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), çok yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilmesine olanak sağlayan taramalı kuvvet mikroskobudur (Eaton and West, 2010). Bu projede hazırlanan yüzeylerin topografik özellikleri AFM ile dinamik modda (tapping modu) karakterize edilmiştir. Her bir örneğin farklı bölgeleri incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, Ambient AFM™ (Nanomagnetics Instruments) kullanılmıştır ve görüntüler PPP-NCLR AFM probları (rezonans frekansı: 190 kHz, kuvvet sabiti: 48 N/m, Nanosensors) kullanılarak elde edilmiştir. E-tarayıcı hızı ise 0.5-3 Hz arasında

görüntüleme yapılmıştır. Görüntü verileri, NMI Image Analyzer v1.5 (Nanomagnetics Instruments) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

Çalışmada, her örneğin en az 3 farklı bölgesi incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Hidrojel örnekler, distile su ile 3 kez yıkanmıştır ve oda sıcaklığında kuruduktan sonra görüntülenmiştir. Tüm görüntüler 5 µm x 5 µm boyutlarında alınmıştır.

Çalışma kapsamında AFM ile yüzey topografileri incelendikten sonra, AFM topografi görüntüsü verileri kullanılarak kesit (cross-section) ve yüzey pürüzlülüğü (surface roughness) analizleri yapılmıştır.

5.9.4. Nanokompozit doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesi

Hazaırlanan doku iskelelerinin sıkıştırma mukavemetleri belirlenmiştir. Bunun için hazırlanan doku iskeleleri 1 saat boyunca distile su içerisinde bekletilmiştir. Sıkıştırma (compressive) davranışları %80 gerinime (strain) kadar 0,2 mm/dakika gerinim derecesi ile gerçekleştirilmiştir. Mekanik özellikler sıkıştırma modülü ve kopma gerilimi belirlenerek açıklanmıştır. Gerilme-gerinim eğrilerinin %0-10'luk bölümüne karşılık gelen lineer bölümün eğimi sıkıştırma modülü olarak hesaplanmıştır (n=4).

5.9.5. Nanokompozit doku iskelelerinin şişme özelliklerinin değerlendirilmesi

Şişme ananlizi için kullanılacak doku iskeleleri, UV çapraz bağlandıktan sonra fosfat tamponu (pH 7.4) içerisine yerleştirilerek 37ºC'de bekletilmiştir. Doku iskeleleri 1, 3, 6, 9, 12 ve 24 saatlerde PBS içerisinden alınan kurutma kağıdı ile temizlenmiştir ve şişme sonrası ağırlıkları tekrar tartılmıştır. Çalışmaya 24 saat devam edilmiştir (Ti ve ark., 2015).

Doku iskelelerinin % şişme miktarı belirlenirken aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır:

$$\%ŞM = \frac{Wt(e) - Wt(i)}{Wt(i)} \times 100$$

Eşitlikteki %ŞM, doku iskelelerinin % şişme miktarını, Wt(i), doku iskelelerinin kuru haldeki ağırlığını, Wt(e) ise doku iskelelerinin belirli zaman aralıklarında bulunan ağırlığını göstermektedir. Her bir analiz için 3 tekrar yapılmıştır (Sowjanya ve ark., 2013).

5.9.6. Nanokompozit doku iskelelerinin hidrolitik degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesi

Degredasyon çalışması için hazırlanan doku iskeleleri 1 saat distile su içerisinde bekletilmiş ve derin dondurucuda -20 ^{0}C'de 24 saat boyunca bekletilmiştir. Ardından 24 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen doku iskeleleri 10 ml pH 7.4 fosfat tampon çözeltisi içerisine yerleştirilmiş ve 37^0'de 100 rpm'de çalkalıyıcılı su banyosuna yerleştirilmiştir. 12 saat sonra ve 1-3-5-7-10-14-21-28 günlerde ortamdaki PBS uzaklaştırılıp doku iskeleleri tekrar 24 saat boyunca liyofilize edilmiş ve tartılmıştır. Her tartımdan sonra doku iskeleleri tekrar PBS içeren ortama yerleştirilmiştir.

Degredayon oranları, doku iskelelerinin belirtilen zaman aralıkları sonrası kalan kütleleri üzerinden belirlenmiştir. Her bir analiz için 6 tekrar yapılmıştır (Zhang ve ark., 2017).

Doku iskelelerinin % degredasyon oranları aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir:

$$\%\text{Kalan kütle} = \frac{W(i)-W(t)}{W(i)} \times 100$$

Bu eşitlikte W(i), doku iskelelerinin kuru haldeki ilk ağırlığını, Wt ise doku iskelelerinin belirli zaman aralıklarındaki kuru ağırlığını gösterir.

5.9.7. Nanokompozit doku iskelelerine vankomisin HCl yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi

Vankomisin hidroklorürün yükleme etkinliğinin saptanabilmesi için, hazırlanan etkin madde yüklenmiş doku iskeleleri küçük parçalara kesilmiş ve erlen içerisine

alınmıştır. Sonrasında bu erlenlerin üzerine 10 ml distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 1000 rpm'de 37 ºC'de 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Doku iskelelerinin tamamen degrade olduğunun anlaşılmasının ardından, numuneler filtre edilmiş ve UV abdorbansları belirlenmiştir. Etkin madde yükleme etkinliğinin belirlenmesinde kullanılan eşitlik aşağıga verilmiştir:

$$\%\text{Etkin madde yükleme etkinliği} = \frac{\text{Doku iskelesinde bulunan Etkin madde miktarı}}{\text{Teorik olarak eklenen madde miktarı}} \times 100$$

5.9.8. Nanokompozit doku iskelelerinden vankomisin HCl salım özelliklerinin değerlendirilmesi

Doku iskelelerinin *in vitro* salım çalışmalarında; hazırlanan doku iskelelerinin üzerine 5 ml pH 7,4 PBS tamponu ilave edilmiştir. Salım çalışmaları çalkalayıcı su banyosu içerisinde 100 rpm ve 37 °C'de çalışılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında ortamdan salım numuneleri alınarak sink koşulunu sağlamak için her seferinde alınan miktar kadar PBS tamponu ilave edilmiştir. Her bir formülasyon için 3 paralel olacak şekilde hazırlanarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

Doku iskelelerinin ilaç salım profilleri ve ilaç serbestleştirme mekanizmaları, alınan numunelerin UV spektrofotometre ile analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Vankomisin Hidroklorürün Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

6.1.1. Vankomisin hidroklorürün erime derecesinin tayinine ait bulgular

Vankomisin hidroklorürün erime noktası yöntem 5.3.1' de anlatıldığı şekilde tayin edilmiş ve >240°C olarak bulunmuştur.

6.1.2. Vankomisin hidroklorürün çözünürlük tayinine ait bulgular

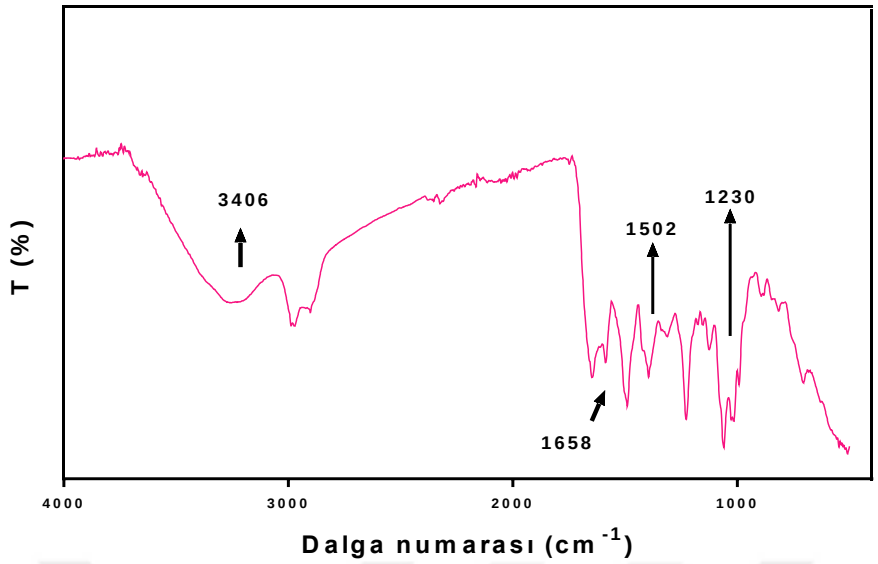
Vankomisin hidroklorürün çözünürlüğü Yöntem 5.3.2'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiştir ve degaze edilmiş pH 7,4 PBS tamponundaki çözünürlüğü 91,412 mg/ml olarak bulunmuştur (n=3). Sonuçlar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Vankomisinin çözünürlük değerleri

Vankomisin hidroklorürın çözünürlüğü (mg/ml)	**SS**	**RSS (%±)**
94,412	2,36	2,531

6.1.3. Vankomisin hidroklorürın FTIR spektrumunun incelenmesi

Vankomisin hidroklorürün infrared spektrumu incelenmesi yöntem 5.3.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 23'te elde edilen infrared spektrumu verilmiştir. Vankomisin hidroklorür spektrumu, hidroksil gerilmesi 3406 cm^{-1}'de, C = O gerilmesi 1658 cm^{-1}'de, C = C gerilmesi 1502 cm^{-1}'de ve fenolik hidroksil grupları 1230 cm^{-1}'de karakteristik pikler göstermiştir. Literatürlerde vankomisin hidroklorür için yer alan karakteristik spektrumlar, elde edilen sonuçlar ile uyumludur (Cerchiara ve ark., 2015; Mohamed ve ark., 2017).

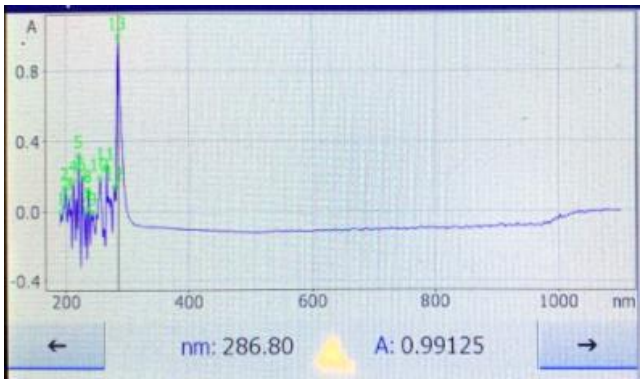


Şekil 23. Vankomisin hidroklorürün infrared spektrumu

6.2. Vankomisin Hidroklorürün Kantitatif Tayini

6.2.1. Ultraviyole (UV) spektrumu

Vankomisin hidroklorürün UV spektrumu Yöntem 5.4.1'de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Degaze edilmiş pH 7,4 PBS çözeltisinde 286,8 nm'de en yüksek absorbans gösterdiği saptanmıştır (Resim 2).



Resim 2. Vankomisin hidroklorürün en yüksek absorbans gösterdiği dalga boyu ve degaze edilmiş pH 7,4 PBS çözeltisinde verdiği UV spektrumu

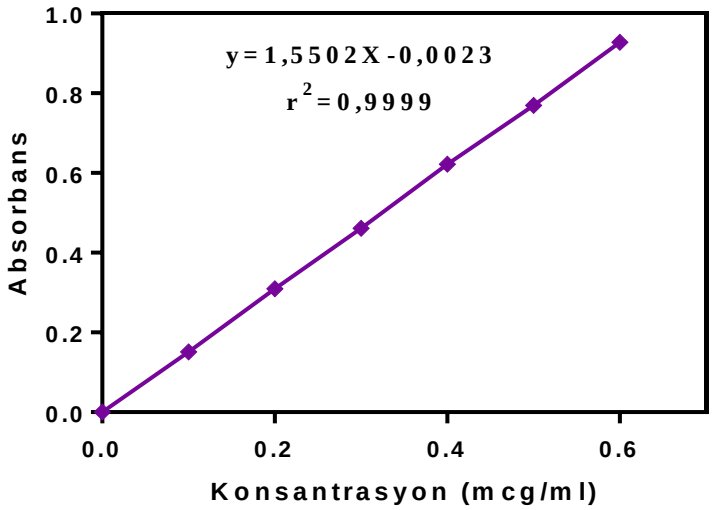
6.2.2. UV spektrofotometrik yöntem validasyonu

6.2.2.1. Doğrusallık

Vankomisin hidroklorürün UV spektrofotmetrik tayin yönteminin doğrusallığı Yöntem 5.4.3.1'de anlatıldığı şekilde saptanmıştır. Vankomisinin standart çözeltisinin verdiği ortalama absorbans, standart sapma (SS) ve relatif standart sapma (% RSD) değerleri ölçülmüştür (Tablo 4). Vankomisin hidroklorürün standart eğrisine ait grafik Şekil 24' te gösterilmiştir.

Tablo 4. Vankomisin hidroklorürün standart eğrisine ait veriler (n=9)

Konsantrasyon (µg/ml)	Absorbans	SS	RSD (%)
0,6	0,927867	0,026227	2,826619
0,5	0,769933	0,018753	2,435667
0,4	0,621833	0,012895	2,073756
0,3	0,461183	0,009777	2,120037
0,2	0,309267	0,006107	1,974586
0,1	0,151283	0,002862	1,891854



Şekil 24. Vankomisin hidroklorürün standart eğri grafiği

6.2.2.2. Kesinlik

6.2.2.2.A. Tekrar edilebilirlik (gün içi kesinlik)

Vankomisin hidroklorürün UV spektrofotmetrik tayin yönteminin tekrar edilebilirliği Yöntem 5.4.3.2.A'da anlatıldığı şekilde saptanmıştır. Yöntem kapsamında aynı gün ardışık seyreltme ile 3 paralel hazırlanarak bulunan absorbans değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Vankomisin hidroklorürın gün içi kesinliğine ait veriler (n=3)

Konsantrasyon (µg/ml)	Absorbans	SS	RSD (%)
0,6	0,919	0,018441	2,006666
0,5	0,765667	0,018073	2,360362
0,4	0,617033	0,011675	1,892141
0,3	0,4639	0,007365	1,587677
0,2	0,309533	0,005975	1,930188
0,1	0,1515	0,003336	2,20176

6.2.2.2.B. Tekrar elde edilebilirlik (Günlerarası kesinlik)

Vankomisin hidroklorürün UV spektrofotmetrik tayin yönteminin tekrar elde edilebilirliği Yöntem 5.4.3.2.B'de anlatıldığı şekilde saptanmıştır. Yöntem kapsamında farklı günlerde ardışık seyreltme ile 3 paralel hazırlanarak bulunan absorbans değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Vankomisin hidroklorürın günler arası kesinliğine ait veriler (n=3)

Konsantrasyon (mg/ml)	Absorbans	SS	RSD (%)
0,6	0,9253	0,018429	1,991674
0,5	0,774867	0,007067	0,912086
0,4	0,6226	0,013841	2,223136
0,3	0,466333	0,012111	2,597004
0,2	0,318333	0,004642	1,458244
0,1	0,153933	0,003321	2,157413

5.2.2.3. Doğruluk

Vankomisin hidroklorürün UV spektrofotmetrik tayin yönteminin doğruluğu Yöntem 5.4.3.3'te anlatıldığı şekilde saptanmıştır. Yöntem kapsamında, düşük, orta ve yüksek konsantrasyondaki çözeltilerin verdiği geri kazanma, standart sapma, absorbans ve relatif standart sapma değerleri Tablo 7-9'da gösterilmiştir.

Tablo 7. Analitik yöntemin doğruluğuna ait veriler (yüksek konsantrasyon)

Konsantrasyon (µg/ml)	Absorbans	Bulunan Konsantrasyon	Geri Kazanılan %
0,6	0,9353	0,603071	100,5119
0,6	0,9331	0,601657	100,2761
0,6	0,9162	0,590789	98,46478
0,6	0,9154	0,590274	98,37903
0,6	0,9347	0,602685	100,4476
0,6	0,9423	0,607573	101,2621
Ortalama	0,9295	0,599341	99,89025
SD	0,010109	0,006501	1,083492
RSD (%)	1,087599	1,084682	1,084682

Tablo 8. Analitik yöntemin doğruluğuna ait veriler (orta konsantrasyon)

Konsantrasyon (mg/ml)	Absorbans	Bulunan Konsantrasyon	Geri Kazanılan %
0,4	0,6132	0,395938	98,9845
0,4	0,6246	0,403269	100,817
0,4	0,6144	0,39671	99,1775
0,4	0,6292	0,406227	101,556
0,4	0,6071	0,392016	98,0039
0,4	0,6263	0,404363	101,090
Ortalama	0,619133	0,399754	99,9384
SD	0,00801	0,005151	1,28780
RSD (%)	1,293799	1,288596	1,28859

Tablo 9. Analitik yöntemin doğruluğuna ait veriler (düşük konsantrasyon)

Konsantrasyon (mg/ml)	Absorbans	Bulunan Konsantrasyon	Geri Kazanılan %
0,1	0,1521	0,099419	99,41866
0,1	0,1547	0,101091	101,0906
0,1	0,1513	0,098904	98,90421
0,1	0,1554	0,101541	101,5408
0,1	0,1473	0,096332	96,33193
0,1	0,1498	0,09794	97,9396
Ortalama	0,1517666	0,099204	99,20431
SD	0,0027674	0,00178	1,779678
RSD (%)	1,8235030	1,793952	1,793952

6.2.2.4. Stabilite

Vankomisin hidroklorürın UV spektrofotmetrik tayin yönteminin stabilitesi Yöntem 5.4.3.4'te anlatıldığı şekilde saptanmıştır. Yöntem kapsamında, çözeltilerin verdiği standart sapma, absorbans ve relatif standart sapma değerleri Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Analitik yöntemin stabilitesine ait bulgular

ZAMAN	Absorbans 1.	Absorbans 2.	Absorbans 3.
Başlangıç	0,9387	0,9156	0,9264
1.Saat	0,9372	0,9158	0,9268
6.Saat	0,9381	0,9143	0,9254
24.saat	0,9369	0,9145	0,9259
1. hafta	0,9402	0,9233	0,9146

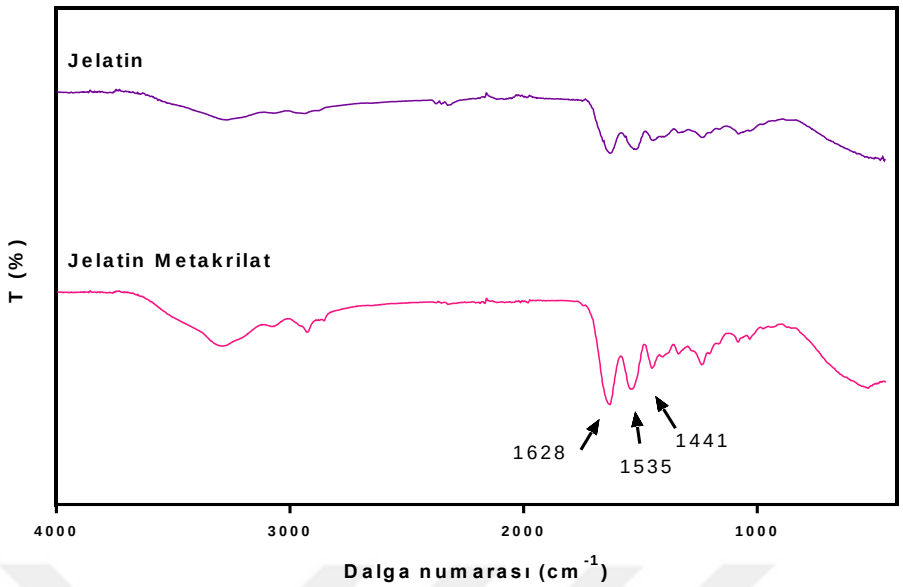
6.3. Jelatin Metakrilatın Hazırlanması Ve Karakterizasyonu

6.3.1. Jelatin metakrilatın hazırlanması

Jelatin metakrilat Yöntem 5.5.1'de anlatıldığı şekilde başarıyla sentezlenmiştir. Hazırlanan jelatin metakrilat çalışmalarda kullanılana kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

6.3.2. Jelatin metakrilatın Fouirer Transform Infrared (FTIR) spektrumunun incelenmesi

JelMA'nın fonksiyonel grupları ve metakilasyon derecesi FTIR spektrumu ile doğrulanmıştır (Sadeghi ve Heidari, 2011). Doğrulama için jelatin ve sentezlenen jelatin metakrilatın FTIR spektrumları Yöntem 5.5.2'de anlatıldığı üzere 400-4000 cm^{-1}'de taranmıştır. Elde edilen FTIR spektrum sonuçları Şekil 25'te gösterilmiştir.

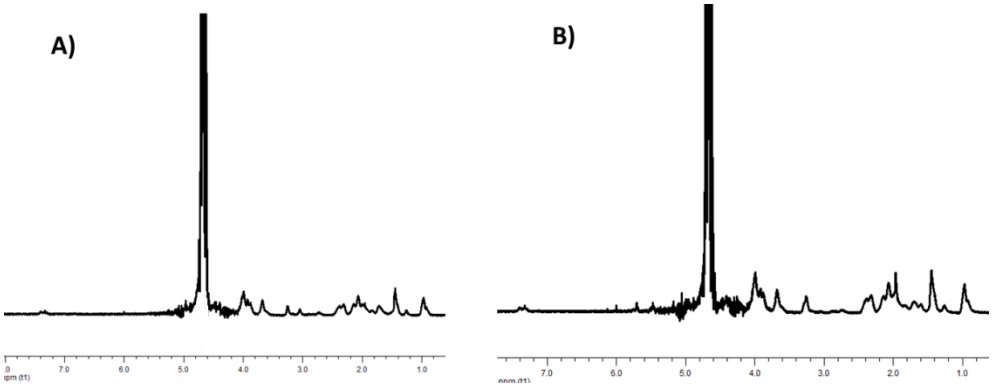


Şekil 25. Jelatin ve JelMA'ya ait FTIR spektrumları

N-H bağlarının vibrasyonunun ve kısmen C-N bağlarının bir sonucu olarak görülen Amid-I piki 1441 cm^{-1}'de görülmüştür. N-H bağları sebebiyle görülen pik ise Amid-II olarak bilinir ve 1522 cm^{-1}'de görülmüştür. C=O bağlarının vibrasyonunu gösteren Amid-III piki 1628 cm^{-1}'de görülmektedir ve bu pikin yeri ve yoğunluğu jelatinin ikincil yapısının bir sonucu olarak oluşmaktadır. O-H ve C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan pikler sırasıyla 3260 cm-1 ve 2915 cm^{-1} bölgelerinde görülmektedir. Bulunan bu sonuçların, daha önce gerçekleştirilen çalışmalarla da uyumlu olduğu görülmüştür (Mamaghani ve ark., 2018; Usal ve ark., 2019). İnceleme sonrası FTIR sonuçları JelMA'nın başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

6.3.4. Jelatin metakrilatın ^{1}H Nükleer Manyetik Rezonans (^{1}H NMR) spektrumunun incelenmesi

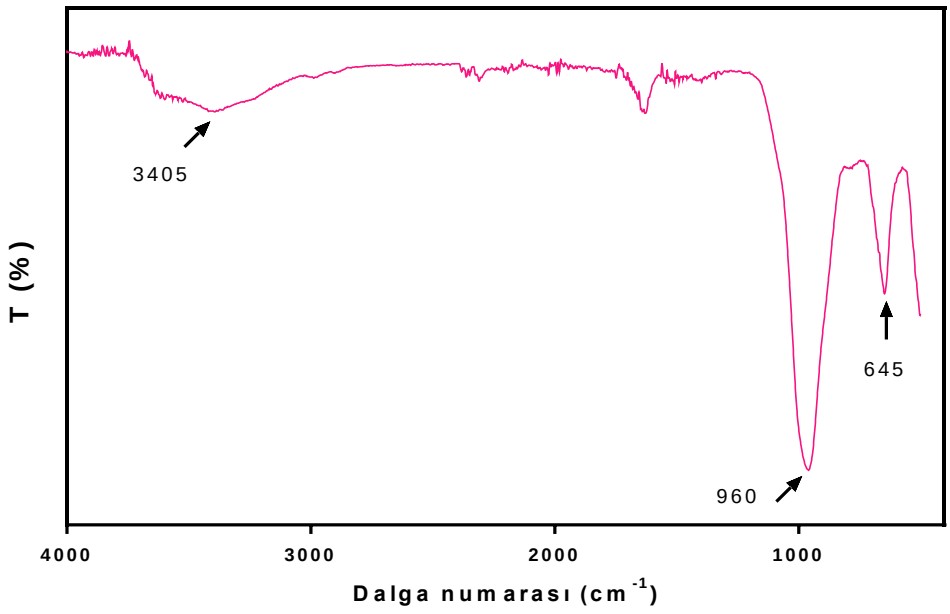
Sentezlenen JelMA'ya ait ^{1}H NMR spektrumları incelendiğinde 5,4 ppm ve 5,7 ppm'de piklerin varlığı belirlenmiştir. Jelatin'e ait spektrum incelendiğinde bu piklerin yer almadığı anlaşılmaktadır. Belirlenen pikler jelatine bağlanan metakrilat gruplarının alkenil çiftli bağından kaynaklanmıştır (Usal ve ark., 2019). Elde edilen bulgular FTIR sonuçlarına uygun olarak JelMA'nın sentezlediğini göstermiştir.



Şekil 26. ^{1}H NMR spektrumları. A, Jelatin. B, JelMA.

6.4. Nanosilikanın FTIR spektrumunun incelenmesi

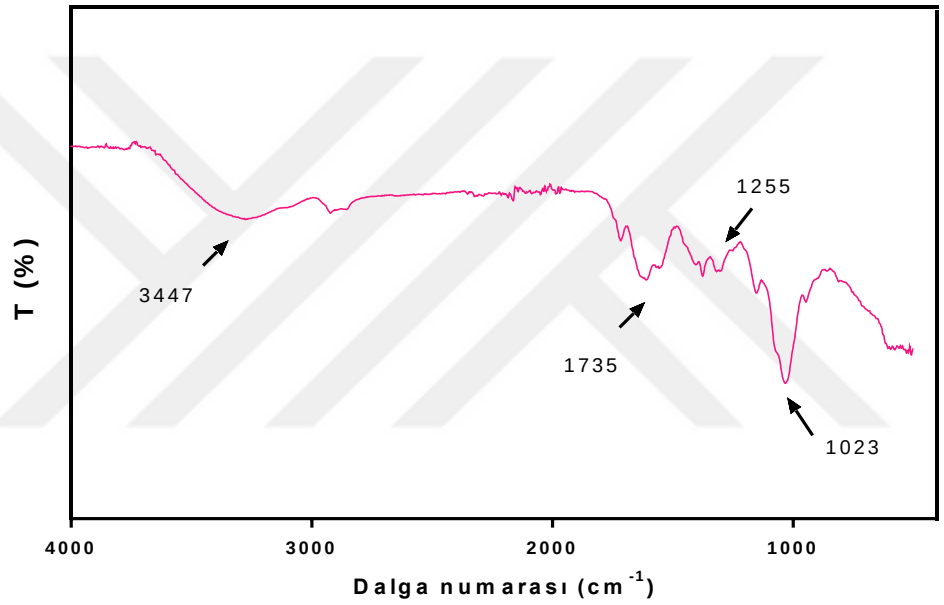
Nanosilikanın FTIR spektrumu Yöntem 5.6'da anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Elde edilen FTIR spektrumu Şekil 27'de verilmiştir. Si-OH, Si-O'daki gerinme ve Si-O-Si'deki esneme dolayısıyla 960 ve 645 cm^{-1}'de iki adet pik görülmüştür. Nanosilika yüzeyindeki hidroksil gruplarının varlığı 3405 cm^{-1}'deki pikler ile kanıtlamıştır. İncelemede elde edilen bulgular literatürde nanosilika için tanımlanmış karakteristik spektrumlar ile uyumludur (Xavier et al. 2015, Sowjanya et al. 2013, Ghadiri et al. 2013).



Şekil 27. Nanosilikanın FTIR spektrumu

6.5. HA'nın FTIR spektrumunun incelenmesi

HA için 3447 cm^{-1}'de bir bandın varlığı OH ve NH gerilme bölgesini; 2925 cm-1'deki bant CH'nin gerilme titreşimini belirtmektedir. Yaklaşık 1638 cm^{-1}'deki bant amid karbonile karşılık gelir ve 1420 cm^{-1}'deki bant COO-; 1023 cm^{-1}'deki absorpsiyon bandı COH bağının gerilmesini gösterir. COOH'nin germe bölgesi ise 1735 ve 1255 cm-1'de gözlenir (Şekil 28). Elde edilen sonuçlar geçmiş çalışmalarla karşılaştırılmış ve sonuçların oldukça benzer olduğu görülmüştür (Oliveira ve ark., 2017).



Şekil 28. HA FTIR spektrumu

6.6. 3-(Trimetoksisilil)propil metakrilat (TMSPMA) ile kaplı cam lamların hazırlanmasına ait bulgular

Yöntem 5.8'de anlatıldığı şekilde TMSPMA ile kaplı cam lamlar hazırlanmıştır. Hazırlanan TMSPMA ile kaplı cam lamlar başarı ile çalışmada kullanılmıştır.

6.7. 3B Biyoyazıcı ile nanokompozit doku iskelelerinin hazırlanmasına ait bulgular

6.7.1. Hidrojel biyomürekkeplerin hazırlanması

Çalışmanın ilk aşamasında etken madde içermeyen biyomürekkepler Yöntem 5.8.1.'de anlatıldığı şekilde hazılanmıştır. Bu kapsamda farklı oranlarda JelMA, HA ve nanosilika içeren biyomürekkepler hazırlanmıştır.

Hazırlanan %8 jelatin metakrilat içeren formülasyonlar UVleme aşamasında çapraz bağlanma konusunda pek başarılı olmadığı gözlenmiştir. Nanosilika oranlarında ise 0 dan %2 ye olumlu bir artış gözlenirken, %3 ve üzeri formülasyonların basımlarının zorlaştığı hatta basılamadığı gözlenmiştir. Formülasyonların yazıcı kartuşlarına aktarılamadan katılaşması gibi sorunlar ortaya çıkmıştır. HA 0'dan %1 oranına kadar formülasyonda pozitif etki gösterirken, bu oranların üzerinde formülasyonun homojenizasyonunu zorlaştırmıştır.

Bu nedenlerle, %10 JelMA içeren formülasyonlar ile çalışmaya devam etme kararı alınmıştır. Seçilen JelMA konsantrasyonuna nanosilika ve HA oranlarının etkisini gözlemleyebilmek için optimal konstantrasyonlar belirlenerek bu konsantrasyonlar üzerinden çalışmalar devam ettirilmiştir.

6.7.2. Ekstrüzyon destekli biyoyazıcı ile basım optimizasyonuna ait bulgular

Geliştirilen tüm formülasyonlar standart bir kare şeklinde (1,5 cm x 1,5 cm), farklı iç dolgu yüzdeleri ile (%15, %20 ve %25) ızgara içeren yapılar basılmıştır. En az 5 kat basılabilen yapılar basılabilir olarak değerlendirilmiştir. Malzemenin basım sonrası stabilitesini değerlendirmek için 1 cm x 1 cm ebatında içi boş kare şeklinde yapılar basılmıştır. Basım sırasında belirgin hasarlar olmayan yapular basılabilir olarak değerlendirilmiştir. Belirtilen yapıların basım parametreleri Tablo 11 ve Tablo 12'de sunulmuştur.

Tablo 11. Temel basım parametleri

Parametreler	
Nozul çapı	21-25 G
Basım hızı (mm/s)	5-10 mm/s
Basım basıncı (psi)	15-40 psi

Tablo 12. Formülasyonlara göre basım parametleri

Formülasyon	**Basınç**	**Basım parametreleri**
6J-2NS-1HA	15±1.5 psi	Nozul çapı: 25G Basım hızı: 10 mm/s Nozul sıcaklığı: 25 ºC Basım tablasının sıcaklığı: 25 ºC
6J-3NS-1HA	19±2 psi	
6J-2NS-2HA	17.5±2 psi	
6J-3NS-2HA	21±2 psi	
8J-2NS-1HA	17.5±2 psi	
8J-3NS-1HA	24±3 psi	
10J-1NS-1HA	20±2.5 psi	
10J-2NS-1HA	25± 2.5 psi	
10J-3NS-1HA	32.5± 5psi	
12J-1NS-1HA	25± 5psi	
12J-2NS-1HA	35± 5psi	
14J-0NS-1HA	30± 5psi	
14J-1NS-1HA	35± 10 psi	

Farklı polimer oranlarına ait basım sonuçları Tablo 13, Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16 ve Tablo 17'de sunulmuştur.

Tablo 13. %6 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

NS oranı	HA oranı		
	%0	%1	%2
%0			
%1			
%2			
%3			
Basılamaz Basılabilir			

Tablo 14. %8 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

NS oranı	HA oranı		
	%0	%1	%2
%0			
%1			
%2			
%3			
Basılamaz Basılabilir			

Tablo 15. %10 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

NS oranı	HA oranı		
	%0	%1	%2
%0			
%1			
%2			
%3			

Basılamaz Basılabilir

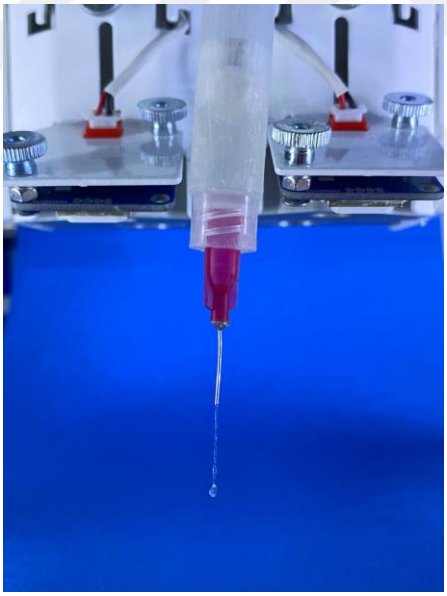
Tablo 16. %12 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

NS oranı	HA oranı		
	%0	%1	%2
%0			
%1			
%2			
%3			

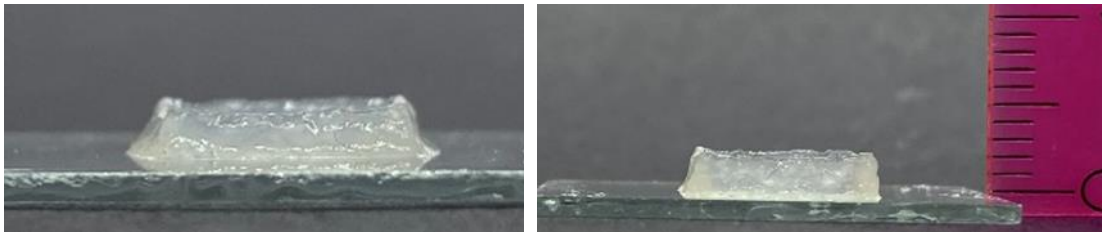
Basılamaz Basılabilir

Tablo 17. %14 JelMA içeren formülasyonların basım sonuçları

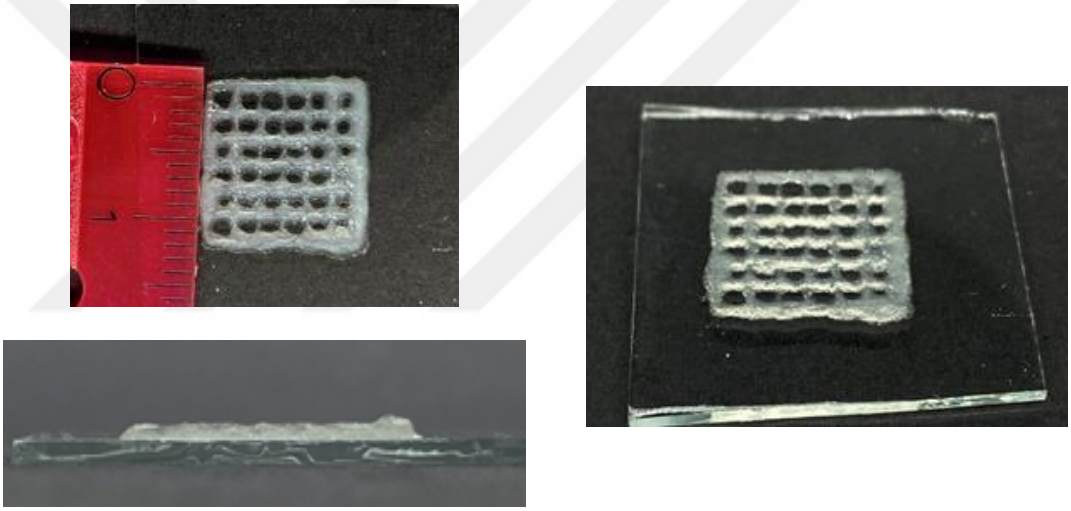
NS oranı	HA oranı		
	%0	%1	%2
%0			
%1			
%2			
%3			
Basılamaz Basılabilir			



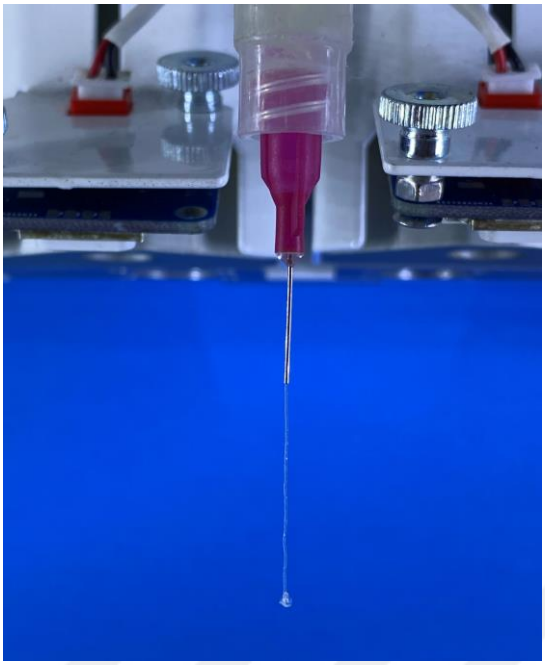
Resim 3. G10-NS1-HA1 kartuştan flament akışı (Basınç: 20±2,5 psi; Nozul çapı: 25G)



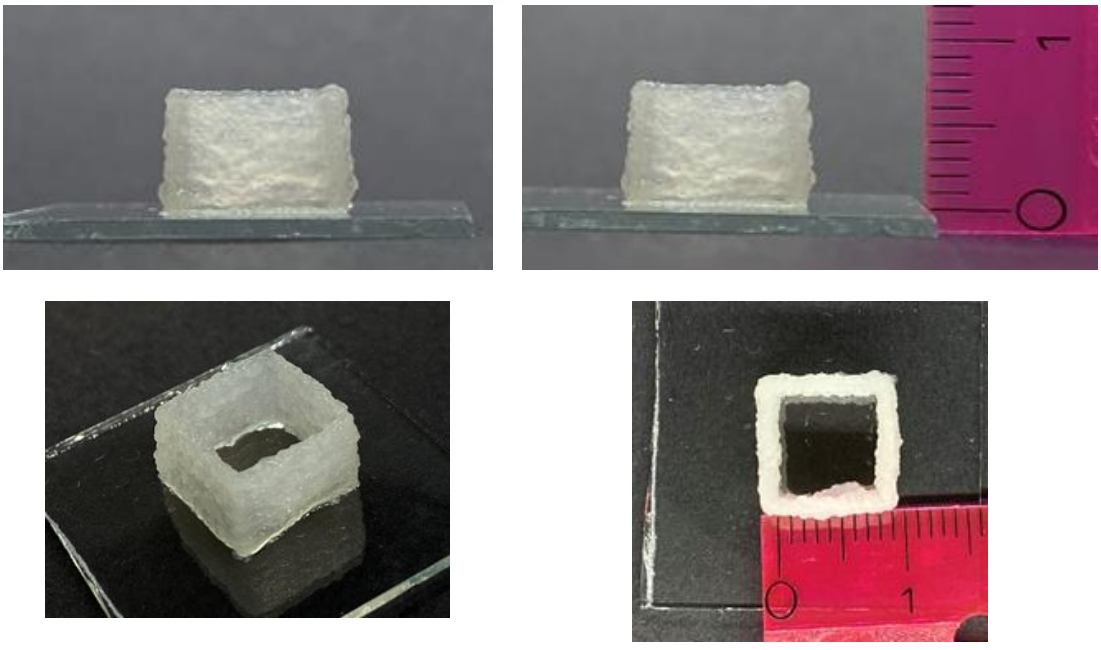
Resim 4. G10-NS1-HA1 fotoğrafları (Basınç: 20±2,5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:20 kat; İç dolgu: %20)



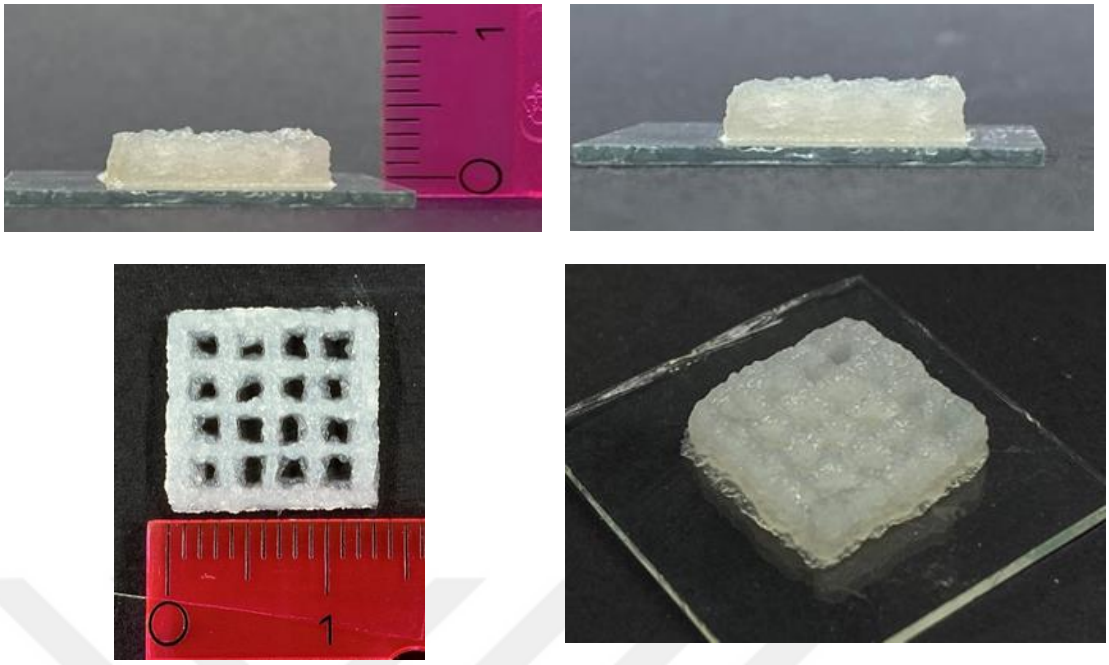
Resim 5. G10-NS1-HA1 ızgara fotoğrafları (Basınç: 20±2,5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:6 kat; İç dolgu: %20)



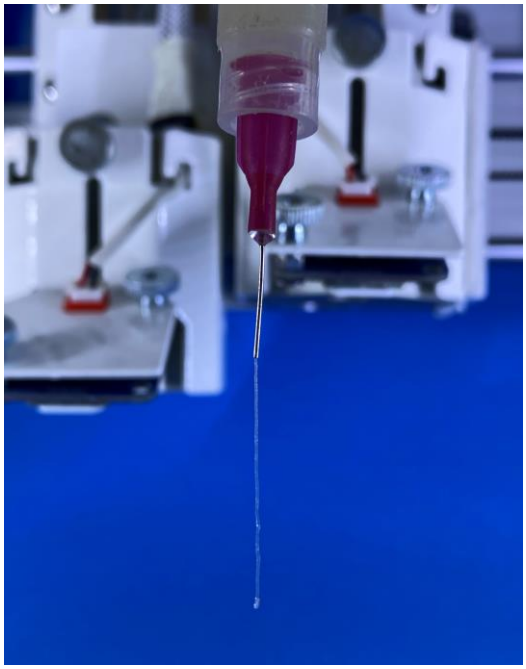
Resim 6. G10-NS2-HA1 kartuştan flament akışı (Basınç: 25±2,5 psi; Nozul çapı: 25G)



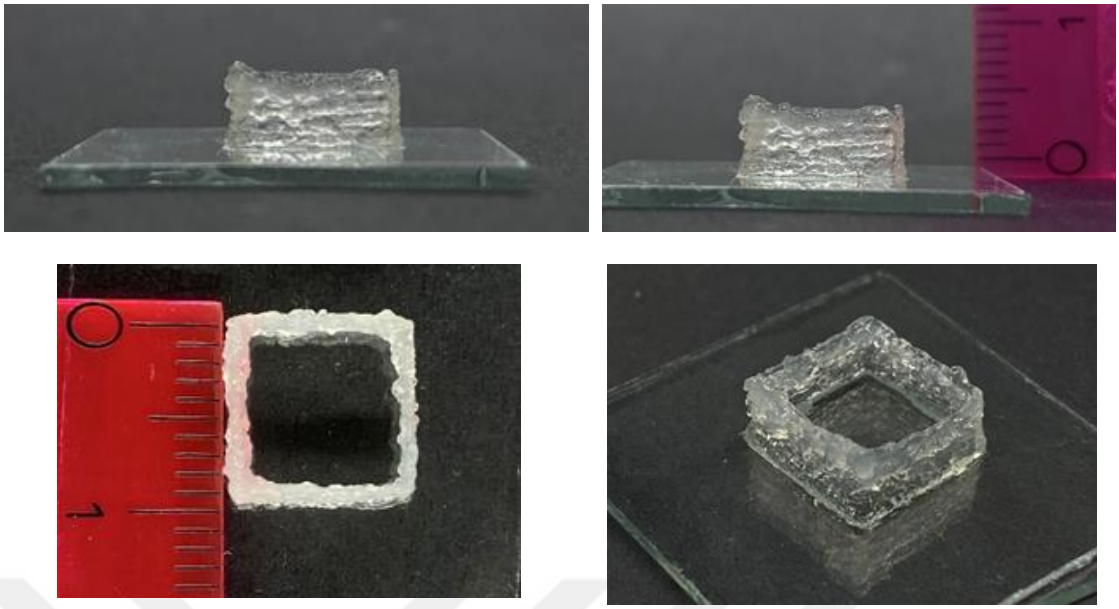
Resim 7. G10-NS2-HA1 fotoğrafları (Basınç: 25±2,5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:70 kat; İç dolgu: %0)



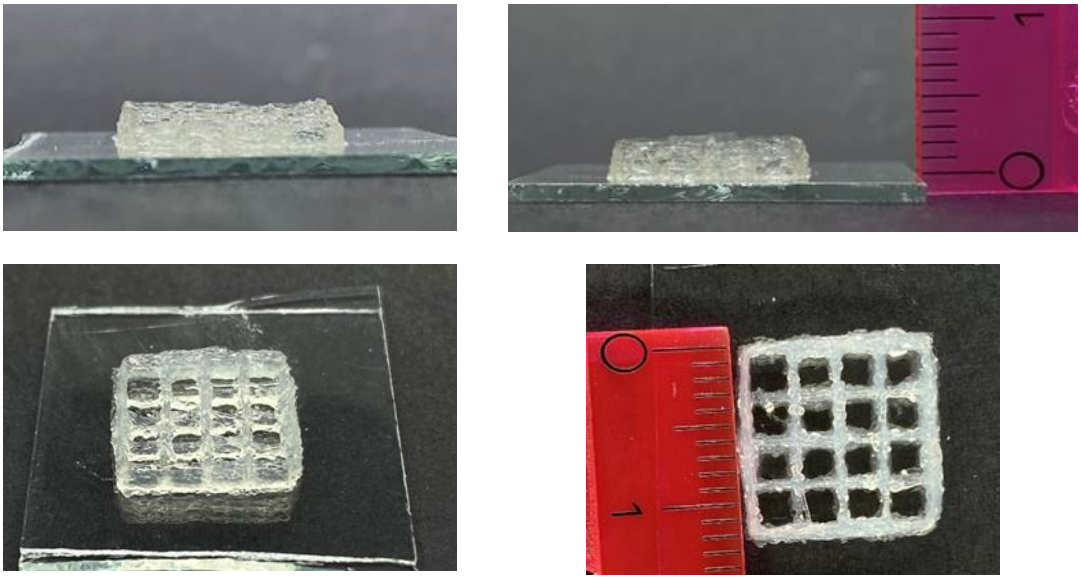
Resim 8. G10-NS2-HA1 ızgara fotoğrafları (Basınç: 25±2,5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:25 kat; İç dolgu: %20)



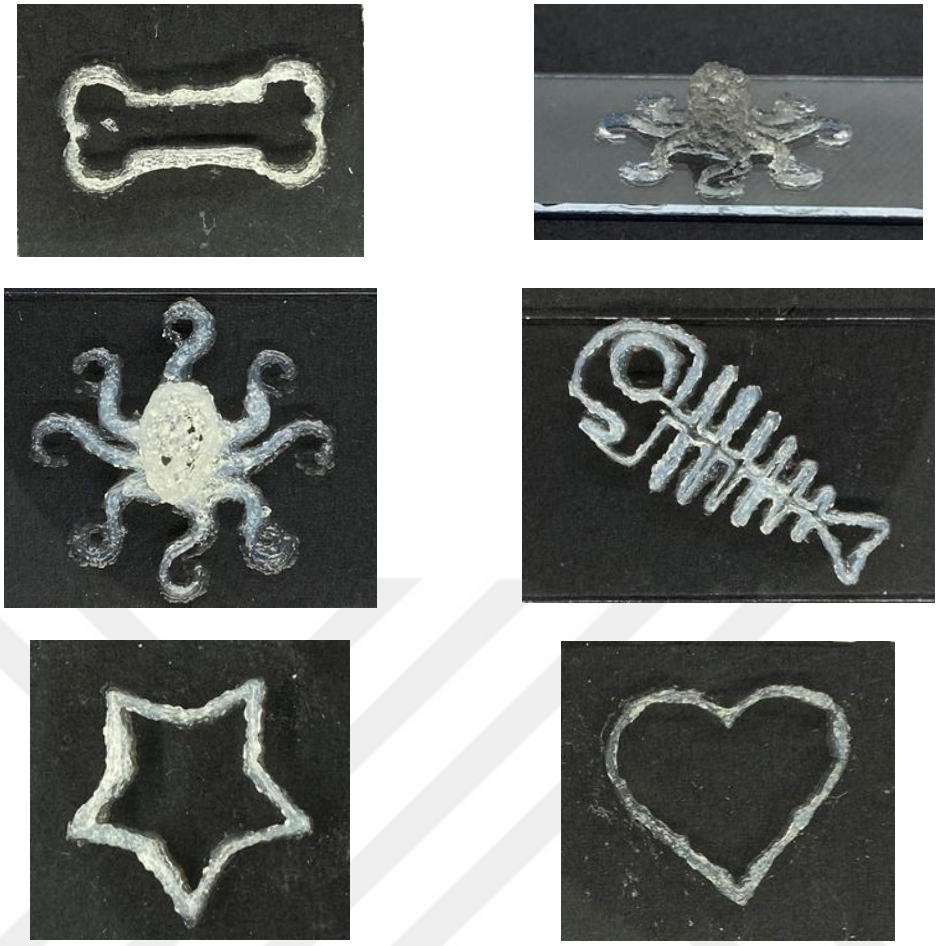
Resim 9. G10-NS3-HA1 kartuştan flament akışı (Basınç: 32,5 ± 5 psi; Nozul çapı: 25G)



Resim 10. G10-NS3-HA1 fotoğrafları (Basınç: 32,5 ± 5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:50 kat; İç dolgu: %0)



Resim 11. G10-NS3-HA1 ızgara fotoğrafları (Basınç: 32,5 ± 5 psi; Nozul çapı: 25G; Tabaka sayısı:15 kat; İç dolgu: %20)

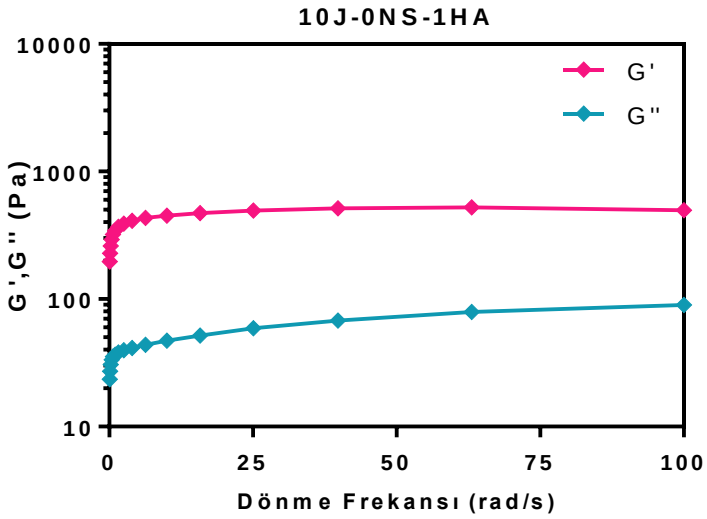


Resim 12. G10-NS3-HA1 denenen farklı tasarımların fotoğrafları

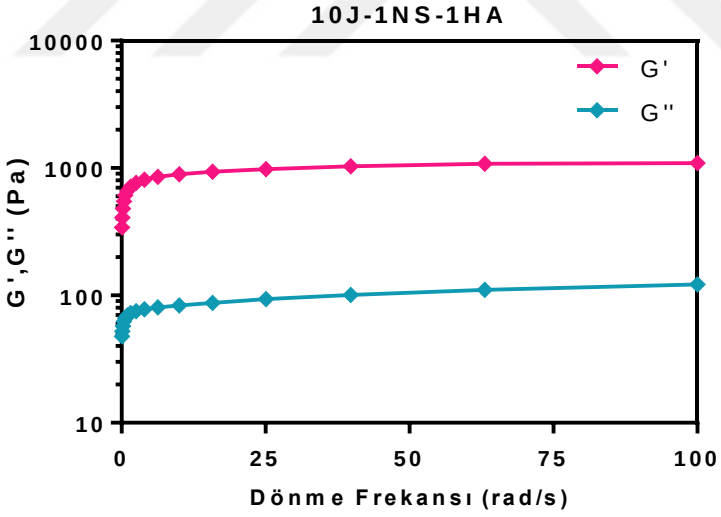
6.7.3. Hazırlanan nanokompozit doku iskelelerinin karakterizasyonuna ait bulgular

6.7.3.1. Hazırlanan biyomürekkeplerin reolojik özelliklerinin karakterizasyonuna ait bulgular

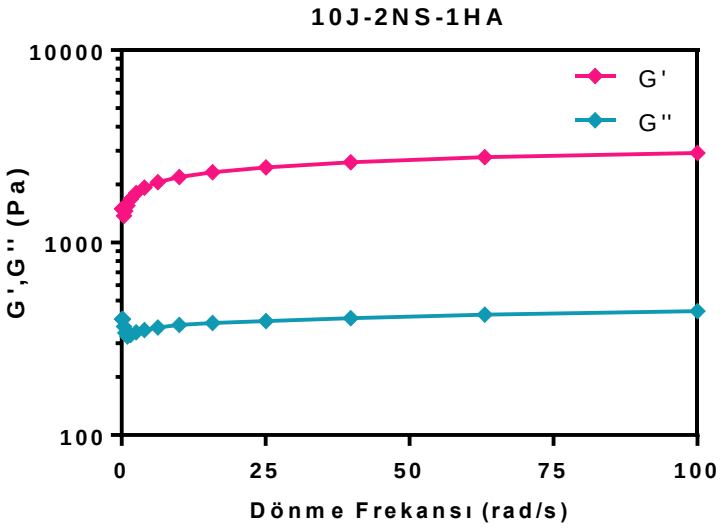
Optimizasyon çalışmaları sırasında, %10 JelMA içeren formülasyonlar optimum basılabilirlik göstermiştir. Bu nedenle farklı NS ve HA oranlarının etkilerini göstermek için %10 JelMA, %0, %1, %2 NS ve %0, %1, %2 HA içeren formülasyonların reolojik özellikleri belirlenmiştir. Bu kapsamda dönme frekansına karşı depolama (G') ve kayıp modülleri (G'') belirlenmiştir.



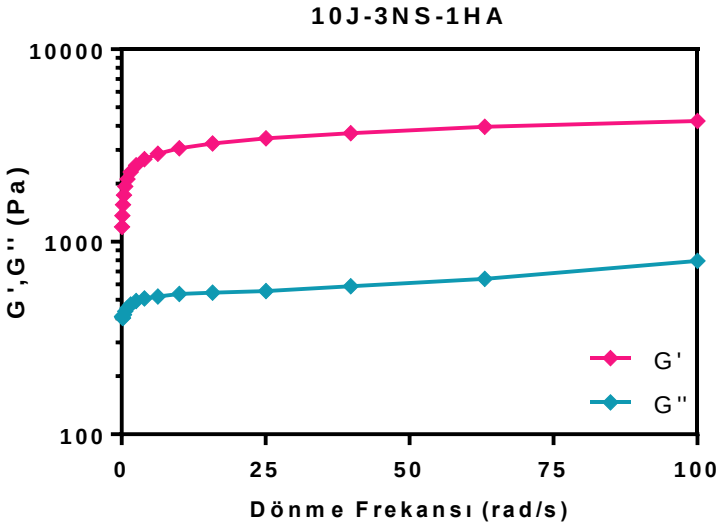
Şekil 29. 10J-0NS-1HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')



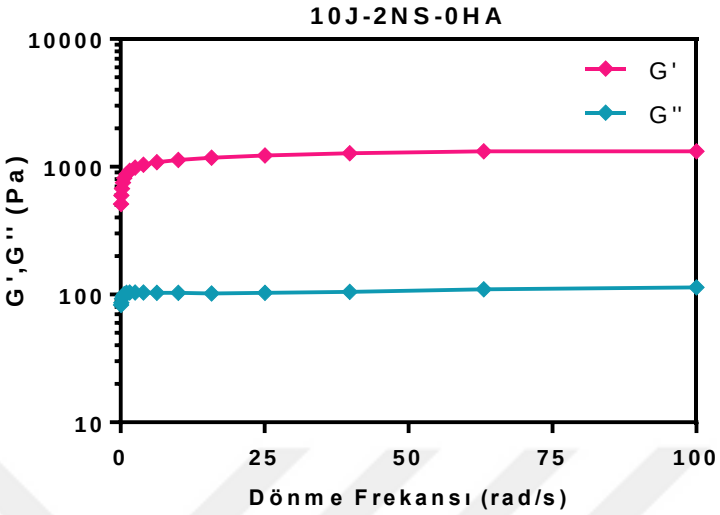
Şekil 30. 10J-1NS-1HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')



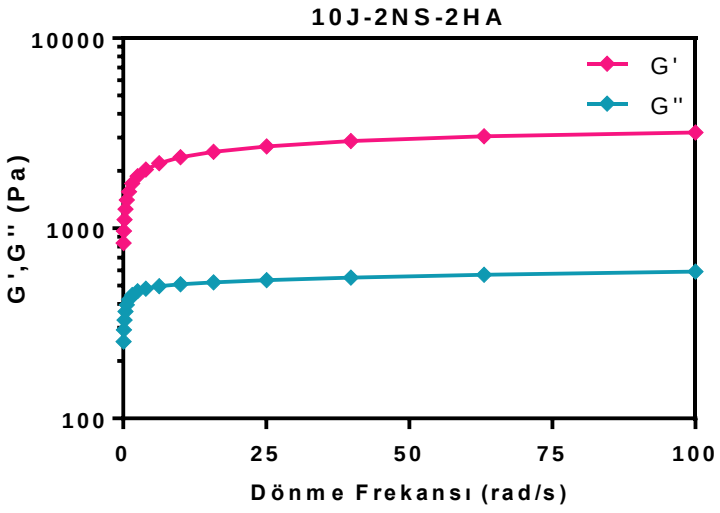
Şekil 31. 10J-2NS-1HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')



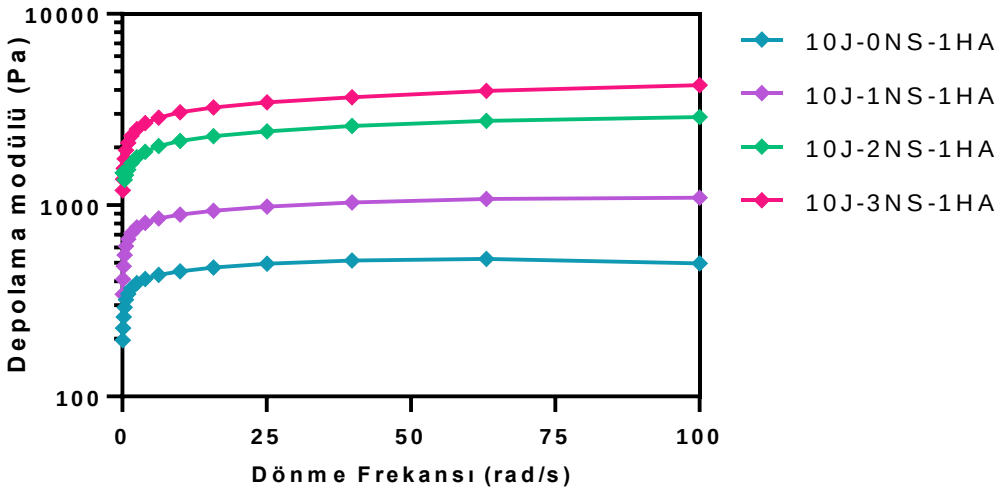
Şekil 32. 10J-3NS-1HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')



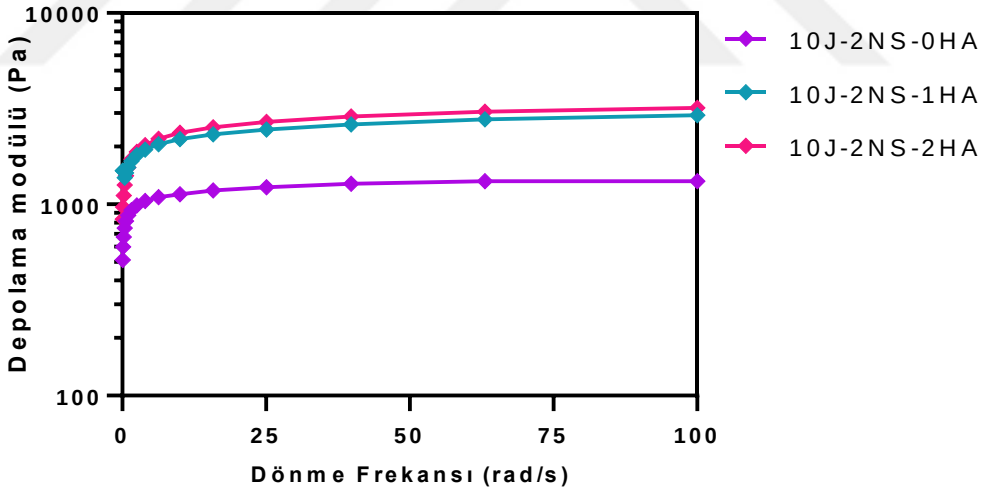
Şekil 33. 10J-2NS-0HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')



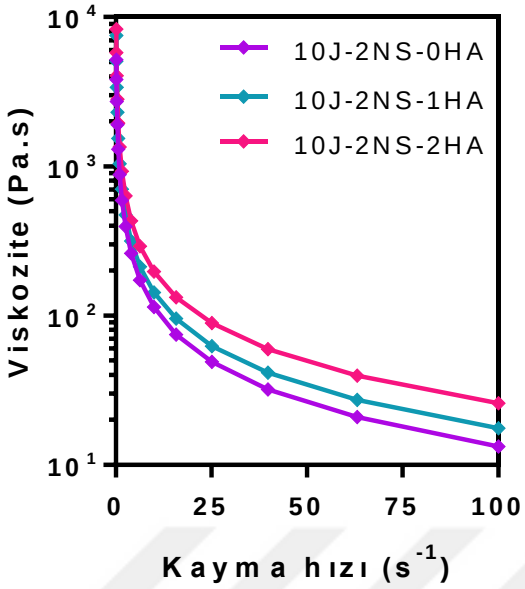
Şekil 34. 10J-2NS-2HA'nın depolama (G') ve kayıp modülleri (G'')



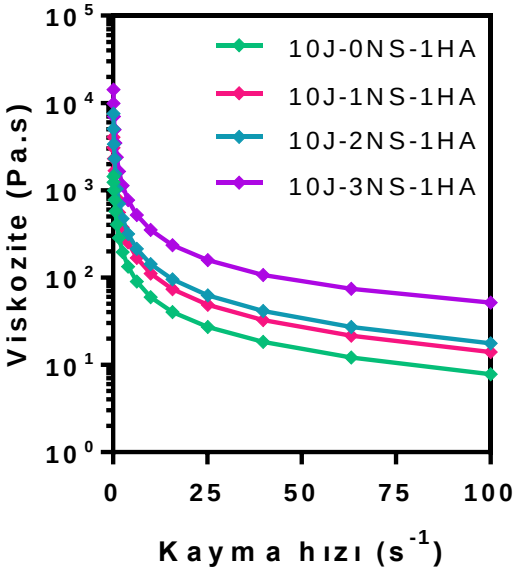
Şekil 35. 10JelMA ve 1HA içeren formülasyonların depolama (G') modülleri



Şekil 36. 10JelMA ve 2NS içeren formülasyonların depolama (G') modülleri



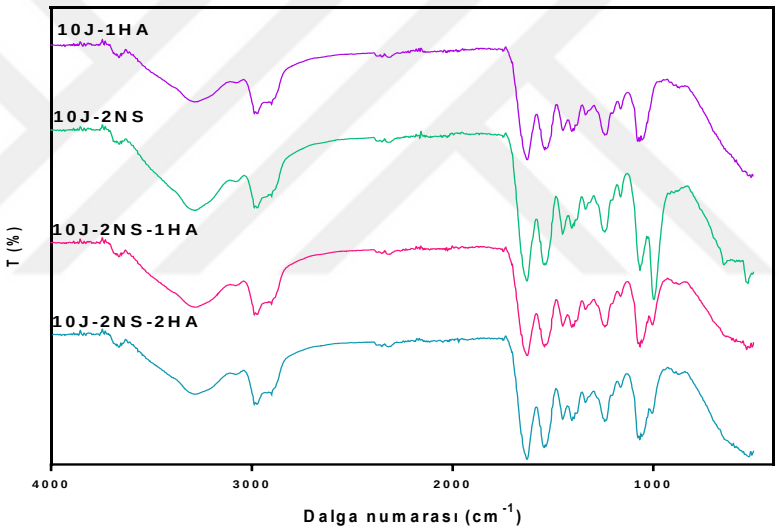
Şekil 37. 10JelMA ve 2NS içeren formülasyonların kayma hızı ve viskozite grafikleri



Şekil 38. 10JelMA ve 1HA içeren formülasyonların kayma hızı ve viskozite grafikleri

6.7.3.2. Hazırlanan 3B doku iskelelerinin Fouirer Transform Infrared (FTIR) spektrumlarının incelenmesine ait bulgular

Doku iskelelerinin FTIR spektrumları Yöntem 5.9.2.'de belirtilen şekilde incelenmiştir. JelMA'dan gelen amin ve nanosilikadan gelen Si-OH pikleri spektrumlarda gözlemlenmiştir. HA için 1420 cm^{-1}'deki bant COO-; 1023 cm^{-1}'deki absorpsiyon bandı COH bağının gerilmeleri gözlemlenmiştir. COOH'nin germe bölgesi ise 1735 ve 1255 cm^{-1}'de gözlenir (Şekil 39). Elde edilen sonuçlar geçmiş çalışmalarla karşılaştırılmış ve sonuçların oldukça benzer olduğu görülmüştür (Oliveira ve ark., 2017; Xavier ve ark., 2015).

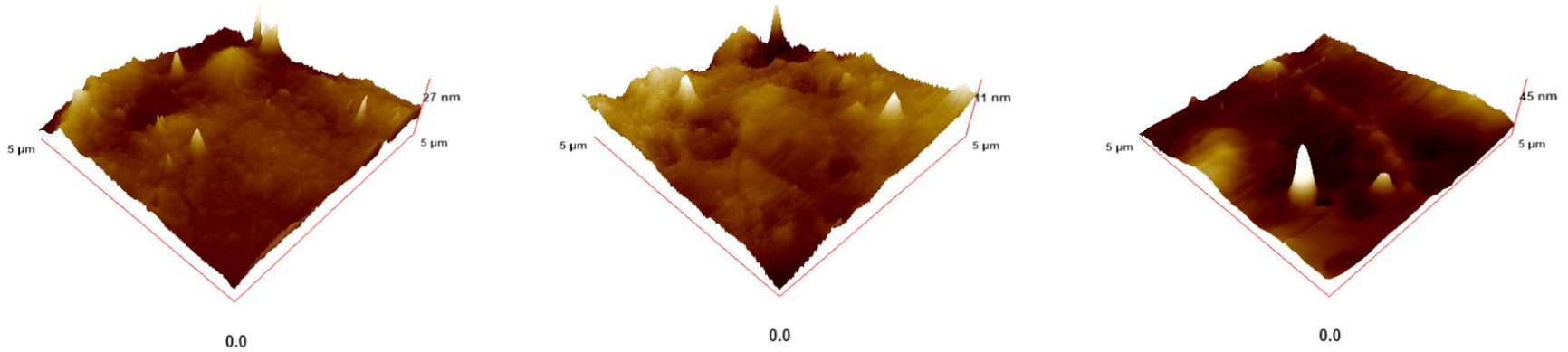


Şekil 39. Hazırlanan formülasyonların IR spektrumları

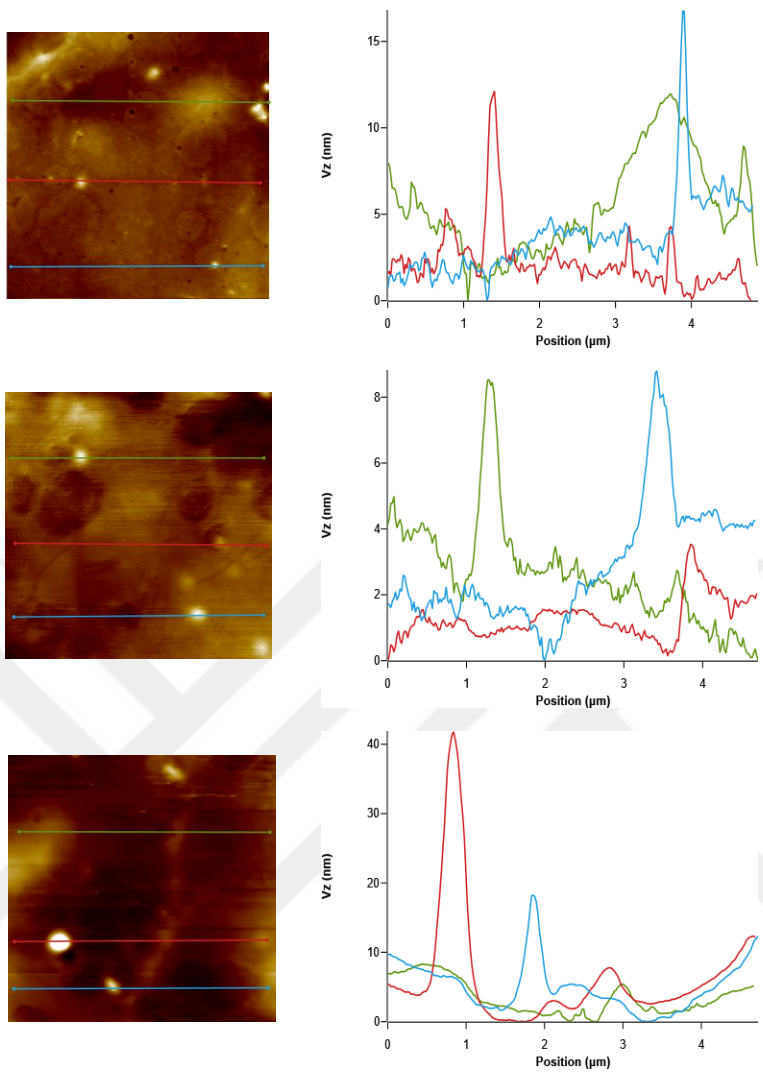
6.7.3.3. Hazırlanan 3B doku iskelelerinin atomik kuvvet mikroskobu ile yüzey karakterizasyonuna ait bulgular

6.7.3.3.A. Nanosilika içermeyen örnekler (10J-0NS-1HA)

Nanosilika içermeyen örneklere ait yüzey topografisi ve kesit analizi verileri aşağıda sunulmuştur.



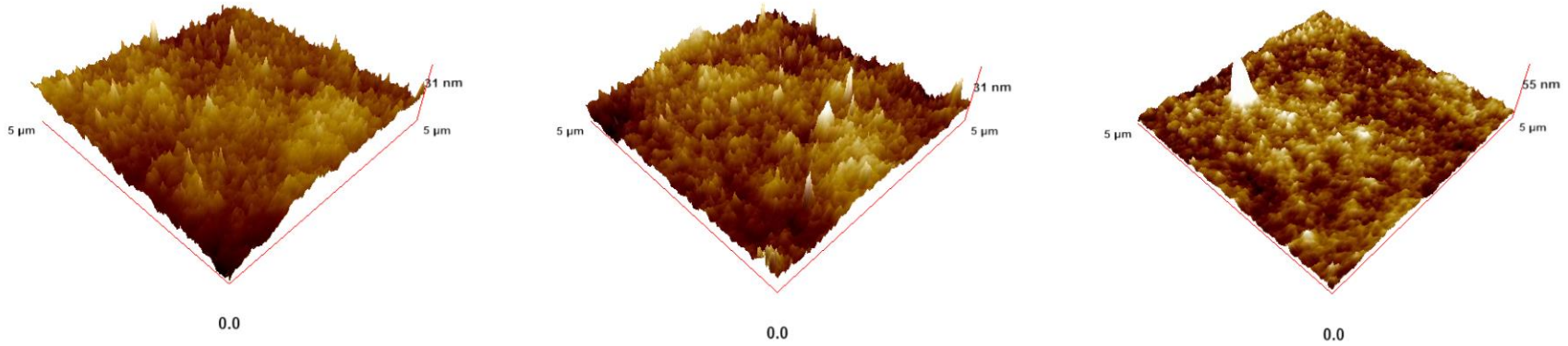
Şekil 40. Nanosilika içermeyen örneklerin 3 farklı alandan elde edilen AFM görüntüsü. 5 µm x 5 µm tarama.



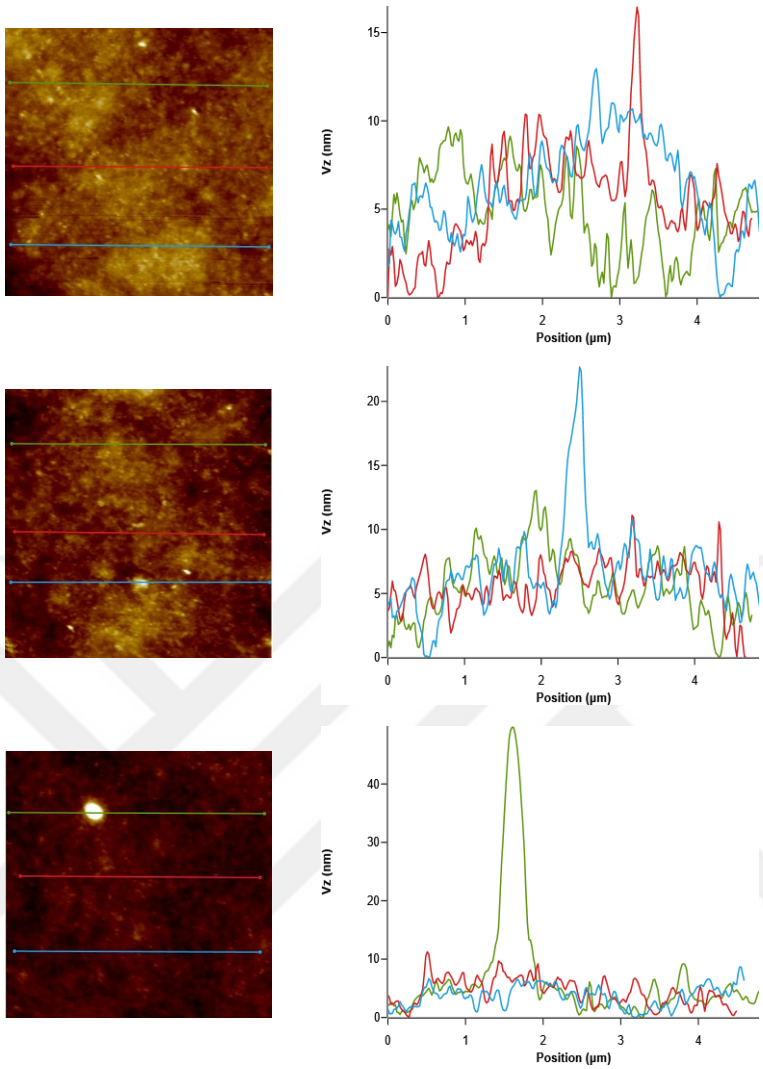
Şekil 41. Nanosilika içermeyen örneklerin kesit analizi verileri. Kesit analizi, 3 farklı AFM topografi görüntüsü verileri kullanılarak 3 farklı bölgeden elde edilmiştir.

6.7.3.3.B. %1 oranında nanosilika içeren örnekler (10J-1NS-1HA)

%1 oranında nanosilika içeren örneklere ait yüzey topografisi ve kesit analizi verileri aşağıda sunulmuştur.



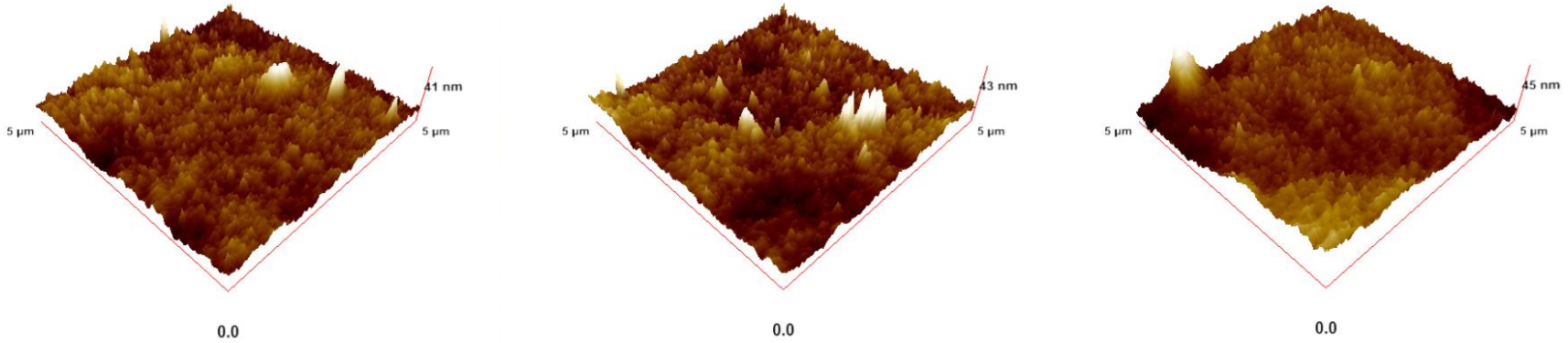
Şekil 22. %1 oranında nanosilika içeren örneklerin 3 farklı alandan elde edilen AFM görüntüsü. 5 µm x 5 µm tarama.



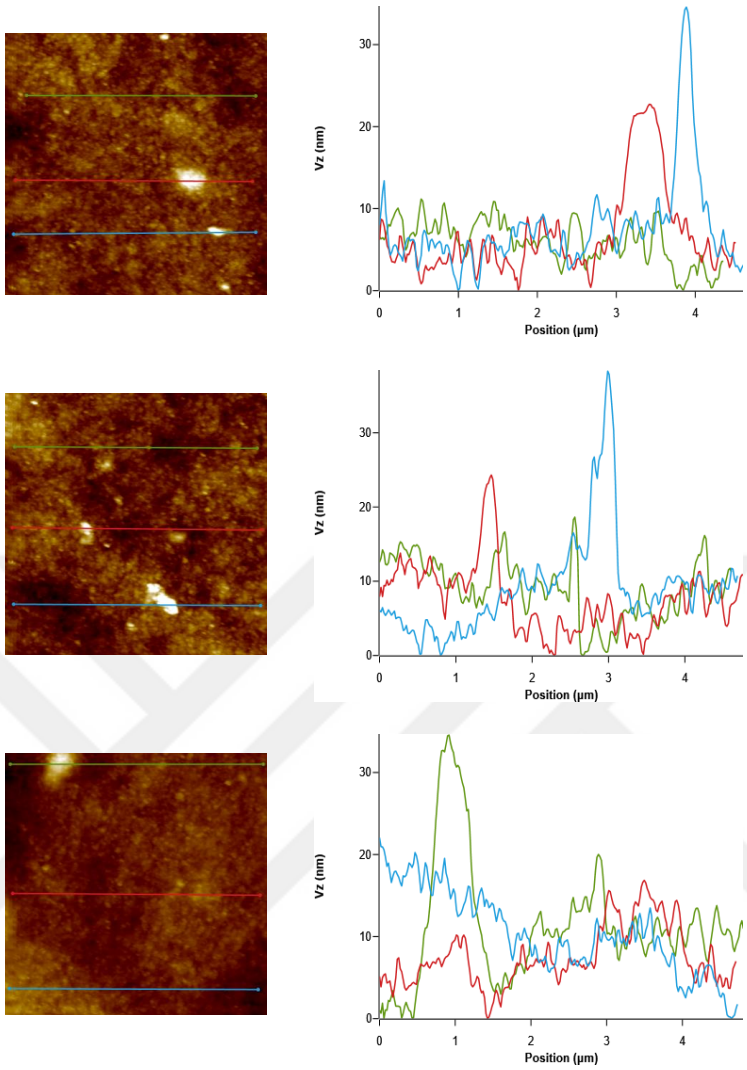
Şekil 43. %1 oranında nanosilika içeren örneklerin kesit analizi verileri. Kesit analizi, 3 farklı AFM topografi görüntüsü verileri kullanılarak 3 farklı bölgeden elde edilmiştir.

6.7.3.3.C. %2 oranında nanosilika içeren örnekler (10J-2NS-1HA)

%2 oranında nanosilika içeren örneklere ait yüzey topografisi ve kesit analizi verileri aşağıda sunulmuştur.



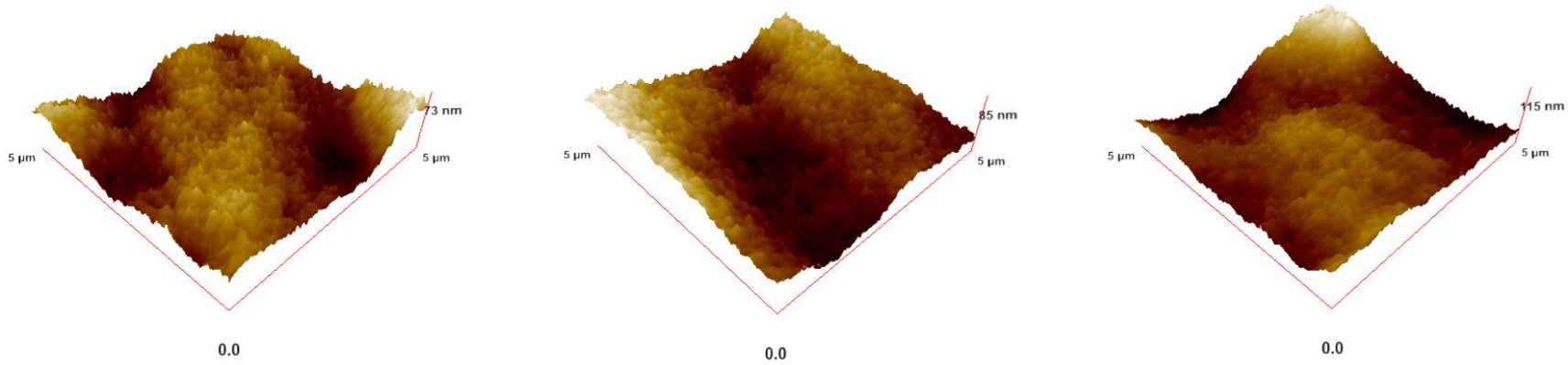
Şekil 44. %2 oranında nanosilika içeren örneklerin 3 farklı alandan elde edilen AFM görüntüsü. 5 µm x 5 µm tarama.



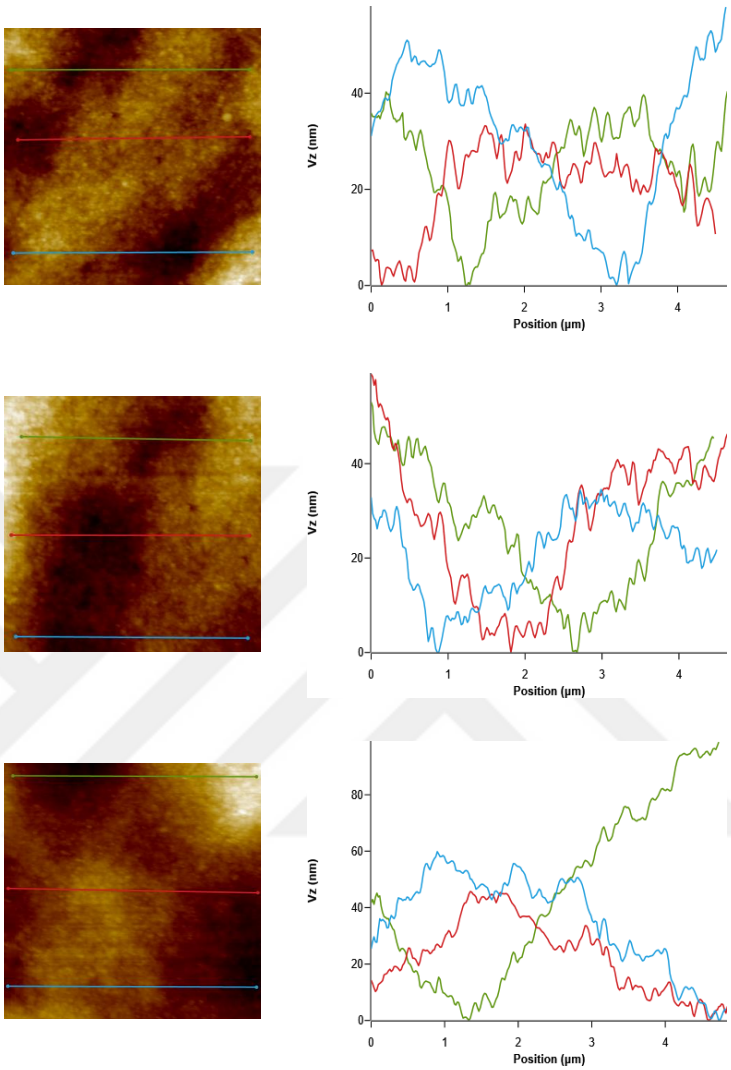
Şekil 45. %3 oranında nanosilika içeren örneklerin kesit analizi verileri. Kesit analizi, 3 farklı AFM topografi görüntüsü verileri kullanılarak 3 farklı bölgeden elde edilmiştir.

6.7.3.3.D. %3 oranında nanosilika içeren örnekler (10J-3NS-1HA)

%3 oranında nanosilika içeren örneklere ait yüzey topografisi ve kesit analizi verileri aşağıda sunulmuştur.



Şekil 46. %3 oranında nanosilika içeren örneklerin 3 farklı alandan elde edilen AFM görüntüsü. 5 µm x 5 µm tarama.



Şekil 47. %3 oranında nanosilika içeren örneklerin kesit analizi verileri. Kesit analizi, 3 farklı AFM topografi görüntüsü verileri kullanılarak 3 farklı bölgeden elde edilmiştir.

6.7.3.3. E. Yüzey Pürüzlülüğü

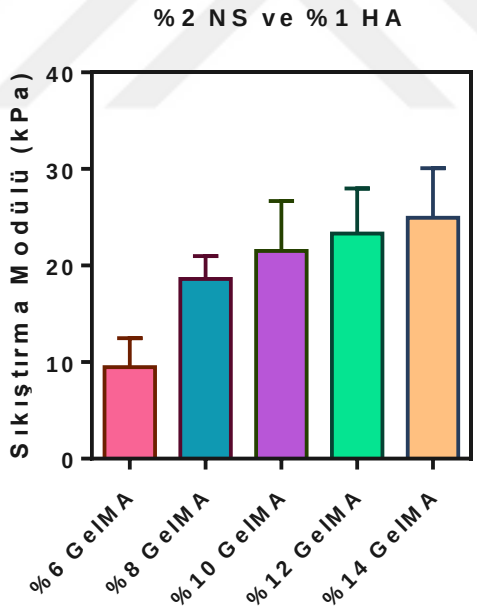
%0, 1, 2 ve 3 NS içeren (%10 JelMA ve %1 HA) içeren doku iskelelerine ait yüzey pürüzlülüğü değerleri Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18. Örneklerinin yüzey pürüzlülüğü değerleri

Yüzey pürüzlülüğü (nm)	
10J-0NS-1HA	1,48 ± 0,3
10J-1NS-1HA	2,18 ± 0,2
10J-2NS-1HA	2,48 ± 0,3
10J-3NS-1HA	11,78 ± 2,2

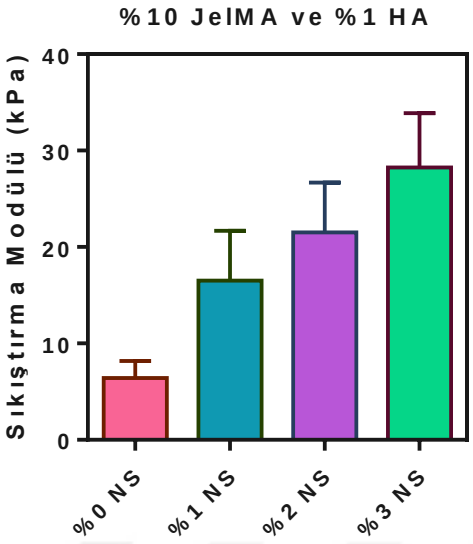
6.7.3.4. Hazırlanan 3B doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesine ait bulgular

Doku iskelelerinin mekanik özellikleri Yöntem 5.9.4.'te anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Yöntem kapsamında öncelikle farklı oranlarda JelMA ile hazırlanan nanokompozit doku iskelelerinin sıkıştırma modülleri hesaplanmıştır.



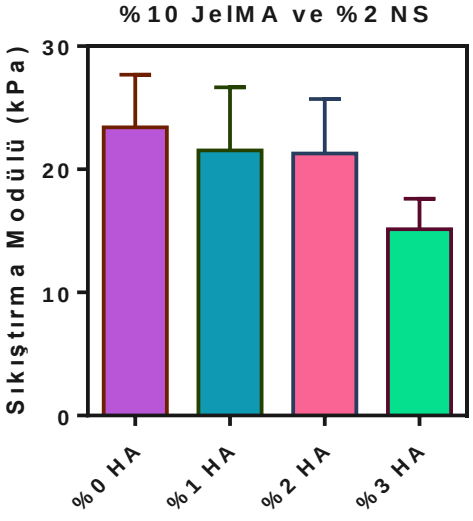
Şekil 48. %2 NS ve %1 HA ile hazırlanan formülasyonların sıkıştırma modülleri

JelMA oranının artmasıyla sıkıştırma modülleri yükselmiştir. Bu sebeple yüksek oranda JelMA ile hazırlanan formülasyonların kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 49. %10 JelMA ve %1 HA ile hazırlanan formülasyonların sıkıştırma modülleri

NS oranının artmasıyla sıkıştırma modülleri yükselmiştir. Fakat %2'nin üzerinde yazdırma üstünde negatif etkisi gözlendiği için %3 NS altındaki formülasyonların kullanılmasına karar verilmiştir.

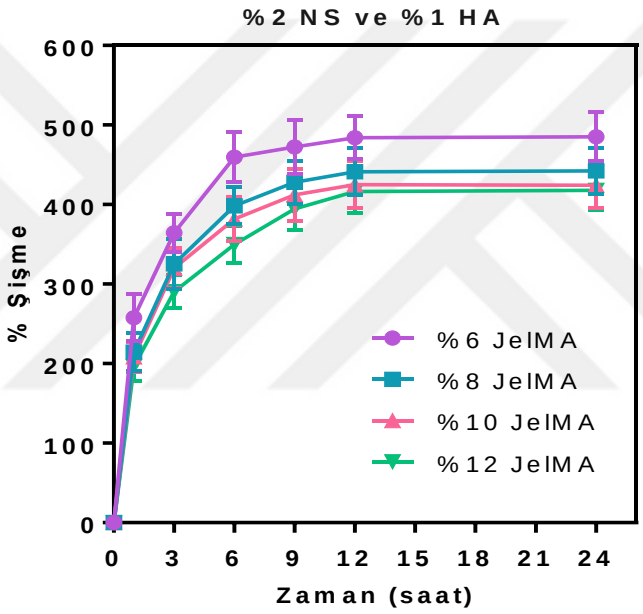


Şekil 50. %10 NS ve %2 NS ile hazırlanan formülasyonların sıkıştırma modülleri

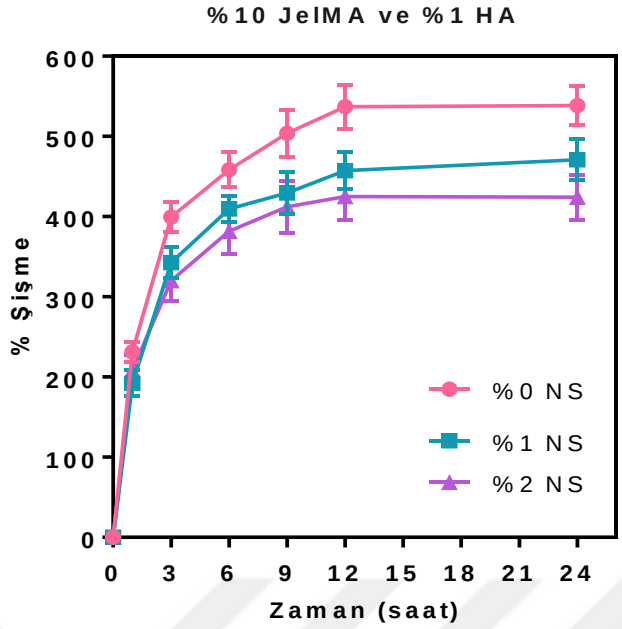
HA oranının artmasıyla sıkıştırma modülleri düşmüştür. %2'nin üzerinde formülasyon üzerinde negatif etkisi gözlendiği için %3 HA altındaki formülasyonların kullanılmasına karar verilmiştir.

6.7.3.5. Hazırlanan 3B doku iskelelerinin şişme özelliklerinin değerlendirilmesine ait bulgular

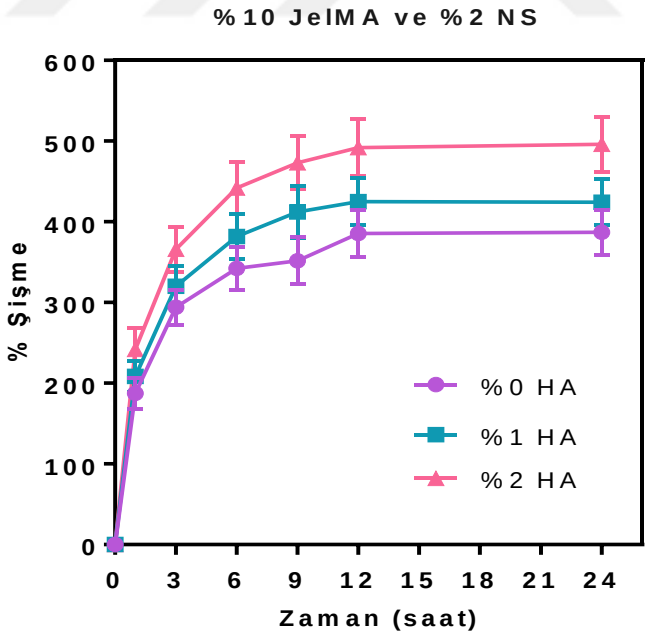
Doku iskelelerinin şişme yüzde değişimleri Yöntem 5.9.5.'te anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Şekil 51, 52 ve 53' de gösterilmiştir.



Şekil 51. %1 HA, %2 NS ve farklı oranlarda JelMA formülasyonlarının şişme oranları



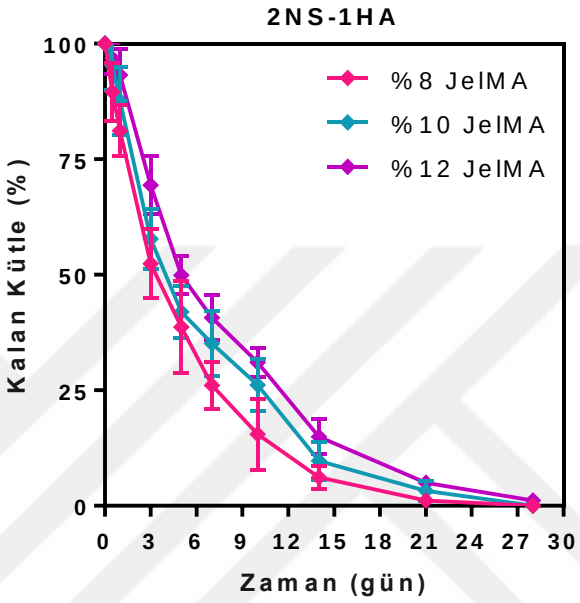
Şekil 52. %10 JelMA, %1 HA ve farklı oranlarda NS formülasyonlarının şişme oranları



Şekil 53. %10 JelMA, %2 NS ve farklı oranlarda HA formülasyonlarının şişme oranları

6.7.3.6. Hazırlanan 3B doku iskelelerinin hidrolitik degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesine ait bulgular

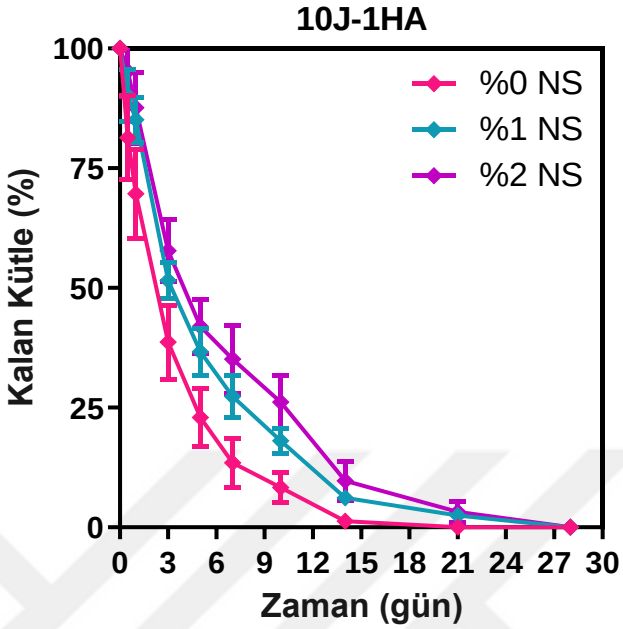
Hazırlanan doku iskelelerinin hidrolitik degradasyon yüzde değişimleri Bölüm 5.9.6.'da anlatıldığı şekilde hesaplanarak Şekil 54,55 ve 56'da gösterilmiştir.



Şekil 54. %1 HA, %2 NS ve farklı oranlarda JelMA formülasyonlarının degredasyon oranları

Tablo 19. %1 HA, %2 NS ve farklıoranlarda JelMA formülasyonlarının 1., 7., 14. Ve 28. gün sonlarında kalan kütle yüzdeleri

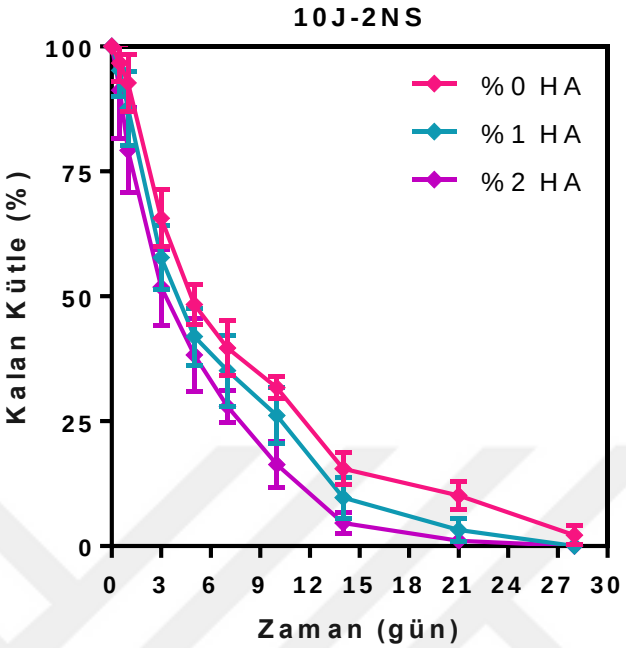
	Kalan Kütle (%)		
	%8 JelMA	**%10 JelMA**	**%12 JelMA**
1. gün	**81.15**	**87.61**	**93.81**
7. gün	**26.11**	**35.16**	**40.73**
14. gün	**6.14**	**9.68**	**14.94**
28. gün	**0**	**0**	**1.12**



Şekil 55. %10 JelMA, %1 HA ve farklı oranlarda NS formülasyonlarının degredasyon oranları

Tablo 20. %10 JelMA, %1 HA ve farklı oranlarda NS formülasyonlarının 1., 7., 14. Ve 28. gün sonlarında kalan kütle yüzdeleri

	Kalan Kütle (%)		
	%0 NS	**%1 NS**	**%2 NS**
1. gün	**69.678**	**85.127**	**87.61**
7. gün	**13.47**	**27.341**	**35.16**
14. gün	**1.27**	**6.16**	**9.68**
28. gün	**0**	**0**	**0**



Şekil 56. %10 JelMA, %2 NS ve farklı oranlarda HA formülasyonlarının degredasyon oranları

Tablo 21. %10 JelMA, %2 NS ve farklı oranlarda HA formülasyonlarının 1., 7., 14. Ve 28. gün sonlarında kalan kütle yüzdeleri

	Kalan Kütle (%)		
	%0 HA	**%1 HA**	**%2 HA**
1. gün	**92.716**	**87.61**	**79.235**
7. gün	**39.657**	**35.16**	**27.947**
14. gün	**15.467**	**9.68**	**4.614**
28. gün	**2.16**	**0**	**0**

6.7.4. Hazırlanan 3B Doku iskelelerine vankomisin hidroklorür yükleme etkinliğinin değerlendirilmesine ait bulgular

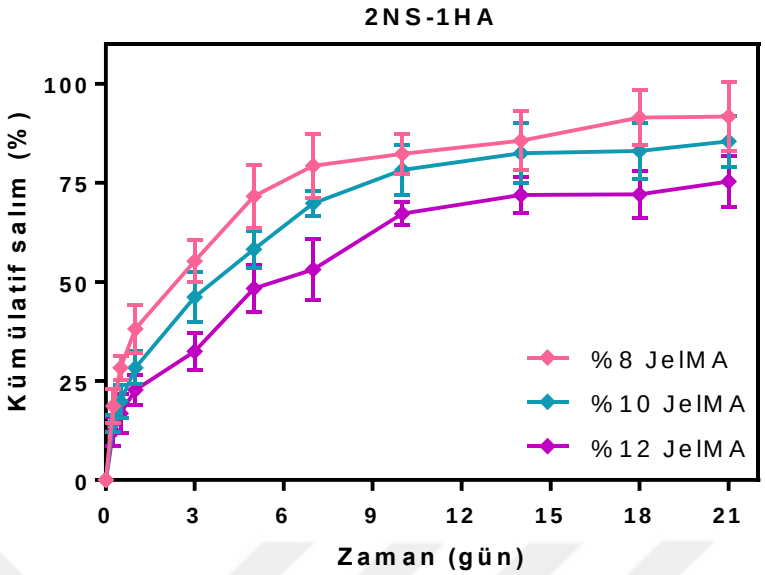
Etkin madde yükleme etkinliği Yöntem 5.9.7.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Tablo 22'de gösterilmiştir. Etkin madde yükleme etkinliklerinin tüm doku iskeleleri için %95'in üzerinde olduğu görülmüştür.

Tablo 22. 3B Doku iskelelerine etkin madde yükleme etkinlikleri

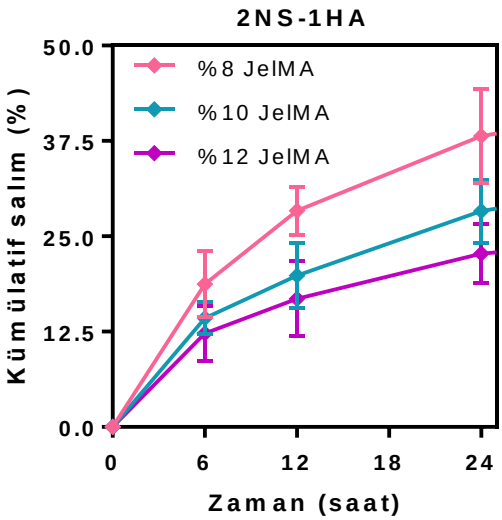
Formülasyon	Vankomisin miktarı (%)	SS
8J-2NS-1HA	97,265	4,233
10J-0NS-1HA	100,874	3,862
10J-1NS-1HA	96,273	2,947
10J-2NS-0HA	97,691	4,531
10J-2NS-1HA	95,868	4,955
10J-2NS-2HA	98,012	3,877
12J-2NS-1HA	95,166	4,759

6.7.5. Hazırlanan 3B doku iskelelerinden vankomisin hidroklorür salım özelliklerinin değerlendirilmesine ait bulgular

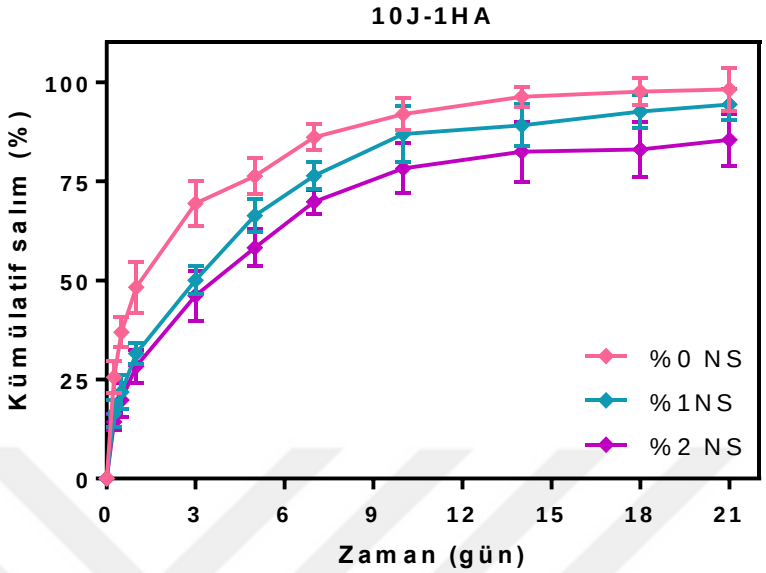
Salım özellikleri bölüm 5.9.8.'de belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 23'de ve Şekil 57-62'de gösterilmiştir.



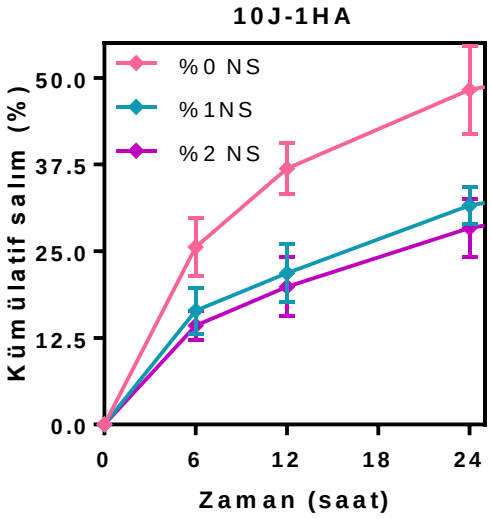
Şekil 57. %2 NS, %1 HA ve farklı oranlarda JelMA formülasyonlarının kümülatif salım oranları



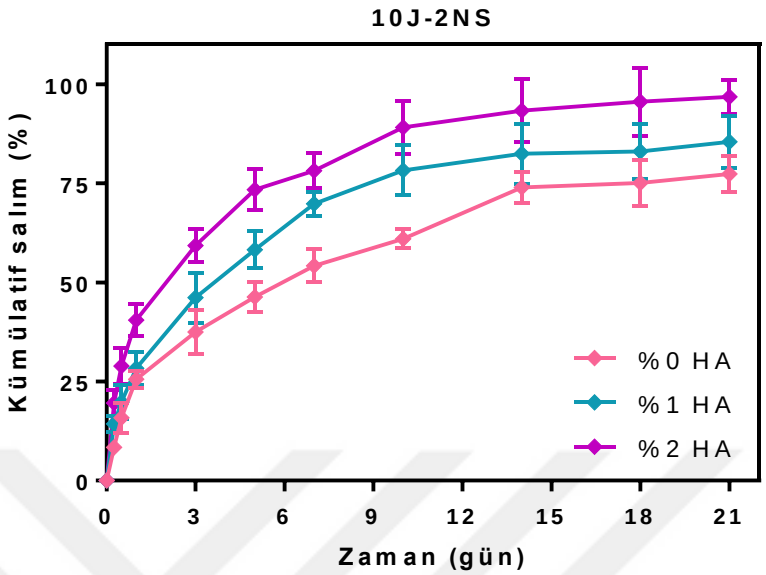
Şekil 58. %2 NS, %1 HA ve farklıoranlarda JelMA formülasyonlarının kümülatif salım oranları



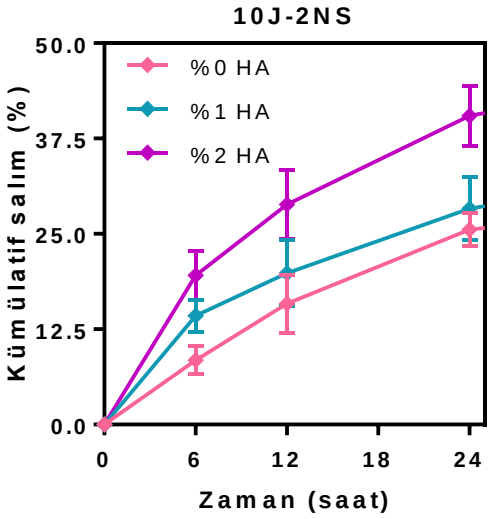
Şekil 59. %10 JelMA, %1 HA ve farklıoranlarda NS formülasyonlarının kümülatif salım oranları



Şekil 60. %10 JelMA, %1 HA ve farklıoranlarda NS formülasyonlarının kümülatif salım oranları



Şekil 61. %10 JelMA, %2 NS ve farklıoranlarda HA formülasyonlarının kümülatif salım oranları



Şekil 62. %10 JelMA, %2 NS ve farklıoranlarda HA formülasyonlarının kümülatif salım oranları

Tablo 23. Formülasyonların salım kinetikleri

	Sıfırıncı derece	**Birinci derece**	**Korsmeyer-Peppas**	**Higuchi**	**Hixson-Crowell**
	r^2	**r^2**	**r^2**	**r^2**	**r^2**
10J-0NS-1HA	0,7836	0,9204	0,9948	0,9733	0,8809
10J-1NS-1HA	0,861	0,9308	0,9688	0,9957	0,9099
10J-2NS-0HA	0,8824	0,9495	0,9497	0,9878	0,9297
10J-2NS-1HA	0,8613	0,937	0,9739	0,9876	0,9148
10J-2NS-2HA	0,8183	0,916	0,9848	0,9842	0,8869
8J-2NS-1HA	0,8009	0,8949	0,9899	0,9786	0,8661
12J-2NS-1HA	0,8872	0,9278	0,9423	0,9811	0,9163

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik steril bir organ sistemidir, ancak bakteriler sağlıklı kemiğe doğrudan yayılma, hematojen yayılma veya birleşik bir enfeksiyon odağından ulaşabilir. Patojenik bakterilerin sağlıklı kemiğe invazyonu, önemli morbidite ve mortalite ile ilişkili olan osteomiyelite yol açar (Jin ve ark., 2013). Osteomiyelit veya kemik iltihabı, en yaygın olarak invaziv bakteriyel enfeksiyondan kaynaklanır (Putnam ve ark., 2019). Osteomiyelitten, aralarında Staphylococcus aureus'un (S. aureus) ana etken olduğu çok çeşitli bakteri türleri izole edilmiştir (Jin ve ark., 2013). Kemik, sürekli olarak osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından dönüşüme uğradığından, istilacı bakteriyel patojenler için benzersiz bir alandır (Birt ve ar., 2017; Berendt ve Byren, 2004; Haas ve McAndrew, 1996; Lew ve Waldvogel, 2004; Putnam ve ark., 2019). Kemiğin yeniden şekillenmesinin kinetiği, lokal ve sistemik inflamasyona yanıt olarak büyük ölçüde değişebilir (Birt ve ar., 2017; Berendt ve Byren, 2004; Haas ve McAndrew, 1996; Lew ve Waldvogel, 2004; Putnam ve ark., 2019). Osteomiyelit tedavisi, antimikrobiyal tedaviyi, ortaya çıkan ölü boşluğun yönetimi ile debridmanı ve kemiğin stabilizasyonunu içerir (Carek ve ark., 2001; Dhanoa ve ark., 2012; Jin ve ark., 2013). Ölü alan yönetiminde altın standart otolog kemik greftlerinin kullanımıdır, ancak cesitli sinirlamalari vardir (Kavanagh ve ark., 2018; Oryan ve ark., 2014; Roberts ve Rosenbaum, 2012). Sistemik antibiyotik tedavisi standart stratejinin önemli bir parçası olmasına rağmen, lokal enfeksiyon bölgesine zayıf penetrasyon ve zayıf kan ulaşımı nedeniyle istenen miktarda tedavi sağlanamayabilir (Anagnostakos ve ark., 2009). Ek olarak; yüksek doz ve uzun süreli sistemik antibiyotik tedavisi, ciddi yan etkilerle ilişkilidir ve uzun süreli antibiyotik kullanımı, ilaç direncinin artmasını teşvik edebilir (Barrett ve ark., 2014). Lokal antibiyotik tedavisi, bu dezavantajlar için en çok açıklanan stratejilerden biridir. Lokal antibiyotik uygulama sistemleri için parçalanabilen veya parçalanamayan malzemelerden oluşan antibiyotik yüklü kemik boşluğu dolgu maddeleri kullanılarak serumdaki antibiyotik konsantrasyonunu azaltilabilir ve lokal enfeksiyon bölgesinde yüksek konsantrasyonda antibiyotik sunulabilir (El-Husseiny ve ark., 2011; Gauland, 2011; Harle ve Ritzerfeld, 1979; Luo ve ark., 2016). Ölü dokuların uzaklaştırılması

dolayısıyla ortaya çıkan boşlukların yerine, antibiyotik salımı sağlayan doku iskelelerinin implantasyonu mümkün olan en iyi tedaviyi sağlayacaktır (Anagnostakos ve ark., 2009; Luo ve ark., 2016).

Bu tez kapsamında, osteomiyelit tedavisi için 3B biyobasım teknolojisi ile ölü boşlukların şekline göre üretilen ve bu boşlukları doldurarak yeni kemik oluşumu destekleyen ve antibiyotik serbestleşmesini sağlayan nanokompozit doku iskelelerinin hazırlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla vankomisin içeren 3B JelMA-NS-HA nanokompozit doku iskeleleri tasarlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle JelMA-NS-HA biyomürekkeplerin 3B ekstrüksiyon tipi biyobasım için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada belirlenen biyomürekkeplere vankomisin yüklenerek mekanik, yüzey topografisi, şişme, degredasyon ve ilaç serbestleştirme özellikleri incelenmiştir.

3B biyobaskı, bilgisayar destekli tasarım ile önceden belirlenmiş yapıda hücre yüklü biyomalzemelerin (biyomürekkep) katman katman birikimi ile 3B yapılar oluşturmak için ortaya çıkan güncel bir yaklaşımdır. Bu teknik, doku iskelelerinin mimarisi üzerinde doğrudan ve kesin kontrol sağlar (Ashammakhi ve ark., 2019; Singh ve ark., 2020). Biyobaskı için ekstrüzyon biyobaskı, baskı modalitesi, çeşitli biyomürekkepler için kullanımı ve nispeten düşük maliyeti ile öne çıkmaktadır (Liu ve ark., 2017; Mazzocchi ve ark. 2018). Biyobasım süreci ve hücresel tepki, biyomürekkep özelliklerine güçlü bir şekilde bağlıdır. Bu nedenle, hem başarılı bir baskı hem de biyolojik ihtiyaçlar için uygun biyomürekkep içeriğinin belirlenmesi büyük bir önem taşımaktadır. Biyomürekkep kesintisiz olarak yazdırılabilir ve hızlı bir şekilde çapraz bağlanabilir olmalıdır. Burada özellikle biyomürekkep optimizasyonu anahtar parametreyi oluşturmaktadır.

JelMA, maliyet etkinliği, sentezlenme ve foto çapraz bağlama kolaylığı, ayrıca hücre tutunması ve çoğalmasına izin veren büyük biyouyumluluğu nedeniyle biyofabrikasyon için yaygın olarak kullanılan doğal bir hidrojel olması nedeniyle tercih edilmiştir (Yue ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017).

Nanosilika partikülleri anizotropik yapisi ile sulu ortamda dinamik olarak kendinden oluşan kayma ile incelen sistemler oluşturabilirler (Vazao ve ark,. 2014; Ghadiri ve

ark., 2013; Liu ve Bhatia 2015). Kayma incelme davranışı biyobasım sırasında oluşan basınç ile malzemenin incelerek basımı ve basım sonrası malzemenin kalınlaşarak şeklini koruyabilmesi için büyük bir önem taşımaktadır (Eivazzadeh-Keihan ve ark., 2020). Ayrica, nanosilikaların kök hücrelerin osteojenik farklılaşmalarını uyardığı bilinmektedir (Alarçin ve ark., 2018; Gaharwar ve ark., 2013). Dolayısıyla, tez kapsamında nanosilika kayma ile incelme özelliği ile basımı kolaylaştırması, negatif yükü nedeniyle pozitif yüklü JelMA ile elektrostatik etkileşim oluşturarak fiziksel çapraz bağlanma sağlaması, malzemenin mekanik, degredasyon ve ilaç serbestleştirme özelliklerini desteklemesi ve kemik oluşumunu indüklemesi nedeniyle tercih edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında seçilen hyaluronik asit, dermisin bağ dokusunda ve vücudun diğer kısımlarında bulunur, hücredışı matrisin viskoelastisitesini koruyarak hücresel yapıyı destekler. HA farklı çalışmalarda hücre canlılığını, tutunmasını, çoğalmasını ve yerleşimini, osteojenik farklılaşmayı, vaskülarizasyonu, konak entegrasyonunu ve yük taşımayı geliştirmek için araştırılmıştır, bu da hyaluronik asidin kemik rejenerasyonundaki önemli rolünü ortaya koymaktadır (Martínez-Sanz ve ark., 2011; Silva ve ark., 2018; Tokatlian ve ark., 2012; Juhász ve Marmur, 2015; Amini ve ark., 2012). HA, yaralanma bölgelerinde doku iskelesi implantasyonu için iki faydalı özellik olan anti-adhezif ve antimikrobiyal olduğu bildirilmiştir. Hidrofilik doğal bir polimer olarak, birçok yaygın ortopedik patojen üzerindeki antimikrobiyal etkileri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (Romanò ve ark., 2017; Ardizzoni ve ark., 2011; Carlson ve ark., 2004; Drago ve ark., 2014). Sonuç olarak, HA hücresel özelliklerinin güçlü olması, kemiğin doğal bileşeni olması nedeniyle osteojenik farklılaşmayı uyarması ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı tercih edilmiştir.

Geniş spektrumlu bir glikopeptid antibiyotik olan vankomisin (VCM), özellikle metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) bakterisi ile enfekte hastalarda osteomiyelit tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Renno ve ark., 2013). Vankomisin, metisiline dirençli S. aureus dahil olmak üzere gram-pozitif diplokoksiorganizmalara karşı bilinen etkinliği ve klinik alanda kemik enfeksiyonunun tedavisinde kanıtlanmış etkinliği (Adams ve ark., 2009) nedeniyle

tercih edilmiştir. Ayrıca tedavide IV olarak uzun süreli uygulanması ve sistemik yan etkilerin gözlenmesi gibi nedenlerin bu çalışma ile giderilmesinin amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında, seçilen etken maddenin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle vankomisin hidroklorürün erime derecesi tayini ve FTIR analizi yapılmıştır (Tablo 3, şekil 23).

Vankomisin hidroklorürün fizikokimyasal özelliklerinin tespitinden sonra, çözünürlük, miktar tayini ve *in vitro* salım çalışmalarında kullanılmak üzere UV spektrofotometrik analitik yöntem geliştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle vankomisin hidroklorürün degaze edilmiş PBS (pH 7,4) içerisinde çözeltisi hazırlanmıştır ve en yüksek absorbansı 286,8 nm'de verdiği görülmüştür ve bu değerin literatürle de uyumluluğu belirlenmiştir (Resim 2). Analiz yönteminin güvenilirliğinin kanıtlanabilmesi için ise UV spektrofotometrik yöntemin validasyonu yapılmıştır. Bu doğrultuda yöntemin doğrusallığı, kesinliği, doğruluğu ve stabilitesi araştırılmıştır.

UV spektrofotometrik yöntem validasyonu uygulaması ile doğrusallık çalışmaları 0,6 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Sonuçta hazırlanan kalibrasyon eğrisinin determinasyon katsayısı (R^2) 0,9999 olarak belirlenmesi yönetmin doğrusallığını teyit etmemizi sağlamıştır (Şekil 24).

UV spektrofotometrik yöntemin kesinliğini kanıtlamak için tekrar edilebilirlik (gün içi kesinlik) ve tekrar elde edilebilirlik (günler arası kesinlik) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında, RSD değerlerinin en fazla yaklaşık 2,59 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde yöntemin kesinliği de ispatlanmıştır (Tablo 5,6).

UV spektrofotometrik yöntemin doğruluğu 0,6 mg/ml (yüksek), 0,4 mg/ml (orta) ve 0,1 mg/ml (düşük) olmak üzere üç farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda bulunan relatif standart sapmanın en yüksek değerinin yaklaşık 1,79 olmasıyla geri kazanılan yüzdenin istenilen sınırlar içinde

olduğu belirlenmiş ve yöntemin doğruluğu bu doğrultuda kanıtlanmıştır (Tablo 7,8,9).

UV spektrofotometrik yöntemin stabilitesi, hazırlanan doku iskelelerinden olan salım profilleri göz önüne alınarak 37°C'de 7 gün boyunca incelenmiştir. Bulunan sonuçlarda vankomisin hidroklorürün 0,6 mg/ml (yüksek), 0,4 mg/ml (orta) ve 0,1 mg/ml (düşük) olmak üzere üç farklı konsantrasyondaki test çözeltilerinin 37°C'de 7 gün boyunca stabil olduğu gözlenmiştir (Tablo 10).

Tüm UV spektrofotometrik yöntemin validasyon çalışmaları ile oluşturulan analiz yöntemine ait sonuçların ICH kriterlerine uygun olduğu gözlenmiştir. Bu doğrultuda analiz yönteminin sonraki çözünürlük, miktar tayini ve *in-vitro* salım çalışmalarında kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Vankomisin hidroklorürün çözünürlüğü çalışmalarında pH 7,4 PBS kullanılacağı için, çözünürlük çalışmaları için pH 7,4 PBS kullanılmıştır. Vankomisin hidroklorürün bu ortamda çözünürlük değeri 94,412±2,531 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu değerin vankomisin hidroklorürün üreticiden alınan analiz sertifikası ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Formülasyon öncesinde, çalışma kapsamında kullanılacak JelMA sentezlenmesi basamağı gerçekleşmiştir. Sentezlenen JelMA'nın fonksiyonel grupları FTIR ile belirlenmişir. JelMA, jelatinin metakrilat ile fonksiyonelleştirilmesi oluşan bir proteindir. Bu nedenle proteine özgü tekrarlayan amid pikleri spektrumda görülmektedir. JelMA'da yer alan farklı amid pikleri peptit bağlarının farklı vibrasyonel durumlarını göstermektedir. Bulunan bu sonuçların, daha önce gerçekleştirilen çalışmalarla da uyumlu olduğu görülmüştür (Mamaghani, 2018; Usal ve ark., 2019). İnceleme sonrası FTIR sonuçları JelMA'nın başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir (Şekil 25).

Aynı zamanda Jelatin metakrilatın oluşumunu gözlemlemek adına jelatin ve jelatin metaktilatın 1H Nükleer Manyetik Rezonans (1H NMR) spektrumunun incelenmesi de gerçekleştirilmiştir. Jelatinin spekturumunda görülmeyen metakrilat gruplarının alkenil çiftli bağlarının pikleri JelMA ya ait spektrumda (Şekil 26) gözlenmiştir (Usal

ve ark., 2019). Elde edilen bulgular FTIR sonuçlarına uygun olarak JelMA'nın sentezlediğini göstermiştir.

Formülasyonun diğer bileşenleri olan nanosilika ve HA için FTIR çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 27,28). Bu çalışmalar kapsamında Nanosilika ve HA için literatürlerde tanımlanmış karakteristik spektrumlar ile uyumlu olduklarını göstermiştir (Xavier ve ark., 2015; Sowjanya ve ark., 2013; Ghadiri ve ark., 2013, Oliveira ve ark., 2017).

Formülasyon çalışmalarına başlamadan önce 3-(Trimetoksisilil)Propil Metakrilat (TMSPMA) ile kaplı cam lamlar hazırlanmıştır. Bu aşamada cam lamların yüzeyi, TMSPMA ile muamele edilerek yüzeyde serbest metakrilat grupları oluşturulmuş ve JelMA'nın tutunması için yüzeyler elde edilmiştir. Biyobaskılama işlemi TMSPMA kaplı cam lamların üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Formülasyon çalışmalarının ilk aşamasında öncelikle etken madde içermeyen JelMA, nanosilika ve HA doku iskeleleri hazırlanmıştır. Bu yöntem için literatür ve patent taramalarının sonucunda tespit edilen genel polimer ve yardımcı madde oranlarından yola çıkarak pek çok oran ile üretim yapılmış ve 3B biyoyazıcı ile basılabilir, optimum mekanik dayanıklılık ve salım özelliklerini sağlayan formülasyonlar araştırma boyunca analiz edilip değerlendirilmiştir.

Doğruluk ve kayma gerilimi arasındaki yazdırma parametrelerini optimize etmek, değişkenler arasındaki ilişkilerin anlaşılmasını gerektirmektedir. Baskı doğruluğu, basılı çizgilerinin geometrisinin doğrudan bir sonucudur ve deneysel olarak elde edilir. Bununla birlikte kayma gerilimi ilişkileri, hidrojelin, ince bir başlıktan ekstrüde edilmesinin akışkan mekaniği ile ilişkilidir ve baskı işlemi sırasında düşük kayma gerilimine sahip olmak istenen bir sonuçtur (Murphy S.V., ve Atala A., 2014).

Akışkanlar mekaniğinden, düz bir silindirden akan bir akışkandaki kayma gerilmesinin basınca bağlı olduğunu bilmekteyiz. Bu nedenle basınçtaki bir artış, kayma gerilmesinde artışa neden olur. Öte yandan, başlık çapındaki bir artış hız gradyanını azaltır ve dolayısıyla kayma stresini azaltır. Bu ilişkiler, Tablo 1'de sunulmuştur (Webb B., ve Doyle B. J. 2017).

Tablo 1. Baskı üzerinde baskı parametrelerinin yaklaşık etkisi

	Doğruluk (%)	**Kesme Gerilmesi (kPa)**
Yazdırma hızını arttırma	Artırır	-
Basıncı arttırma	Azaltır	Artırır
Nozül çapını arttırma	Azaltır	Azaltır

Ekstrüzyon destekli biyoyazıcı ile basım optimizasyonu çalışmaları sırasında ilk olarak basım parametreleri optimize edilmiştir. Bu esnada optimal basım parametreleri 25G nozul çapı, 10 mm/s basım hızı ve 25 ºC sıcaklık (basım kafası ve basım tablasının sıcaklığı) olarak belirlenmiştir. Bu parametreler doğrultusunda basılan formülasyonların farklı basınç değerleri ise kayda alınmıştır (Tablo 14). En az 5 kat ızgara yapısında basılabilen biyomürekkepler basılabilir olarak değerlendirilmiştir. Basılabilirlik çalışmaları kapsamında farklı JelMA konsantrasyonları, nanosilika ve HA oranlarının etkisini gözlemleyebilmek için optimal konstantrasyonlar belirlenerek bu konsantrasyonlar üzerinden çalışmalar devam ettirilmiştir (Tablo 12).

Basılabilirlik çalışmaları kapsamında öncelikle farklı JelMA konsantrasyonu içeren formülasyonların basılabilirliği değerlendirilmiştir. Bu kapsamda %6 JelMA içeren formülasyonlar sadece %3 NS ve %1-2 HA içermesi durumunda 5 kat ızgara yapısında basılabilmiştir. Ancak daha yüksek katlarda yapının ağırlığı nedeniyle çökme yapmıştır. Diğer konsantrasyonlar ise 2 kat basım sonrası yapısal bütünlüğünü kaybetmiştir. Artan JelMA konsantrasyonları daha sağlam bir yapı ile sonuçlanmıştır. Örneğin %8 JelMA içeren yapılar incelendiğinde, %1 NS ve % 2 HA içeren yapıların 5 kat ızgara yapısında basılabildiği belirlenmiştir. Ancak %8JelMA içeren formülasyon % NS içermesi durmunda %1'in üzerinde HA içerdiği durumda yüksek viskozite nedeniyle iğnede tıkanıklığa neden olmuş ve basılamamıştır (Tablo 13,14).

%10 JelMA içeren formülasyon ise en geniş biyofabrikasyon penceresini oluşturmuştur. Bu JelMA konsantrasyonunda, %2 HA içermesi durumunda NS

içermeyen formülasyonlar bile basılabilmiştir. Ancak, %3 NS ve % 2 HA içeren formülasyon yüksek viskozite nedeniyle iğnenin tıkanması nedeniyle basılamamıştır (Tablo 15).

%12 JelMA içeren formülasyon ise %1 NS içermesi durumunda tüm HA konsantrasyonları için basılabilmiştir. Ancak %3 NS içeren formülasyonlar yüksek viskozite nedeniyle iğnenin tıkanmasına sebep olmuş ve basılamamıştır. %14 JelMA içeren formülasyonlar ise %2 ve %3 NS içermesi durumunda basılamamıştır. %1 NS içeren formülasyon ise %0 ve %2 HA konsantrasyonunda basılabilmiştir (Tablo 16).

Sonuç olarak farklı JelMA konsantrasyonlarının basılabilirlik çalışmaları değerlendirildiğinde, JelMA konsantrasyonunun yükselmesi ile termal jelleşmenin çok daha güçlü ve hızlı gerçekleşmesi nedeniyle basımın kolaylaştığı anlaşılmaktadır. Ancak konsantrasyonun yükselmesi ile (özellikle %12 ve %14'e çıkması ile) viskozitedeki artış basım sırasında iğnede tıkanıklıklara neden olmuştur. Bu kapsamda termal jelasyon baskı sırasında ekstrüde edilen filamenti stabilize etmektedir. Bu nedenle yetersiz jelleşme yapıların "erimesine" neden olurken, çok fazla jelleşme katmanlar arası yapışmayı azaltmkata veya tıkanmaya neden olmaktadır.

Farklı JelMA konsantrasyonlarının değerlendirilmesi sonucunda biyofabrikasyon penceresinin daha geniş olduğu ve daha stabil ve muntazam yapılar oluşturan %10 JelMA konsantrasyonu optimum konsantrasyon olarak seçilmiştir. Bu kapsamda %10 JelMA içeren yapıların basımı farklı NS konsantrayonları için değerlendirilmiştir. NS kayma ile incelen davranış göstermesi nedeniyle özellikle enjektabl hidrojellerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında da NS'nın kayma ile incelme davranışı, ekstrüzyon sırasında incelerek düzgün olarak basımını sağlamış, ekstrüzyon sonrası basıncın ortadan kalkması ile ise hızla kalınlaşarak yapısal bütünlüğü güçlendirmesini sağlamıştır. Bu kapsamda %10 JelMA ve %1 HA içeren formülasyonlar incelendiğinde NS içermeyen formülasyonlar her ne kadar basılabilse de basım sonrası yapı bütünlüğünü koruyamamıştır. Bu formülasyona %1 NS ilavesi daha düzgün bir yapı sağlamış ve 5 kat muntazam bir ızgara basımı sağlanabilmiştir. Ancak içi boş yüksek yapıların basımında belirli bir yükseklik sonrası yapının kendi ağırlığını taşıyamaması

nedeniyle çökmeler olmuştur. %2 NS ilavesi ise oldukça muntazam ve stabil bir yapının basımı ile sonuçlanmıştır. Ayrıca içi boş kare yapısının basımında oldukça yüksek katmanlara kadar basım sağlanabilmiştir. %3 NS ilavesi ise daha pürüzlü bir yapıyla sonuçlanmış ve göreceli olarak daha yüksek basınçlarda basılabilmiştir. Ayrıca %3 NS içeren formülasyon %2 HA içermesi durumunda basılamamıştır (Resim 3-11).

Basılabilirlik çalışmalarında %0, 1 ve 2 HA konsantrasyonları çalışılmıştır. HA konsantrasyonunun basılabilirliği olumlu etkilediği anlaşılmaktadır. Örneğin %10 JelMA içeren formülasyona %0 ve %1 HA içermesi durumunda basılamazken %2 HA ilavesi ile muntazam bir şekilde basılabilmiştir. Benzer olarak %10 JelMA ve %1 NS içeren formülasyon %0 HA içermesi durumunda basılamazken %1 veya %2 HA içermesi durumunda basılabilmiştir.

Sonuç olarak optimizasyon çalışmaları sırasında %10 JelMA, %2 NS ve %1 HA içeren formülasyon optimum basılabilirlik sağlamıştır. Ancak farklı JelMA, nanosilika ve HA oranlarının etkisini gözlemleyebilmek için optimal konstantrasyonlar belirlenerek bu konsantrasyonlar üzerinden çalışmalar devam ettirilmiştir.

Biyomürekkeplerin basım özelliklerinin değerlendirilmesi için biyomürekkeplerin reolojik özellikleri büyük bir önem taşımaktadır. Çalışma kapsamında biyomalzemelerin kayma hızına bağlı viskozitesini ve depolama modülünü (G') ve kayıp modülünü (G") karakterize etmek için reoloji ölçümleri yapılmıştır (Şekil 29-36).

Biyomalzemelerin akış davranışı, viskozite ve kayma hızı arasındaki ilişki ile açıklanabilmektedir. Geliştirilen malzemelerin yüksek viskoziteli olması biyobasım sonrası yapısal stabiliteyi korumak için önem taşımaktadır. Ancak viskozitenin basım sırasında ekstrüksiyonun sağlanabilmesi için ise düşük viskozite sağlanmalıdır. Ayrıca, ekstrüzyon sırasında uygulanan kayma kuvvetleri hücresel canlılığı azaltabilir. Bu nedenle, biyobasım için tiksotropik malzemelerin kullanımı önemli bir yaklaşımdır. Bu kapsamda tasarlanan tüm formülasyonların kayma ile incelme

özelliği gösterdikleri ve bu nedenle ekstrüksiyon ile biyobasıma uygun oldukları belirlenmiştir (Şekil 37,38).

Malzemelerin tiksotropik özelliklerinin teyit edilmesinden sonra, malzemenin LVE bölgesinin altında olan %1 kesme gerilmesinde ve 0.01-100 Hz arasında frekans taraması gerçekleştirilmiştir. Dönme frekansına karşı depolama modülü (G') ve kayıp modülü (G") belirlenmiştir. G' ve G" parametrelri ekstrüde edilebilirlik ve baskı sonrası şekil doğruluğu ile ilişkilendirilmektedir. G', biyomürekkebin elastik davranışının, G" ise bioink bileşiminin viskoz fraksiyonunun veya dağılan enerjisinin bir göstergesidir. Başarılı bir basımda, biyomürekkep, yapısal bütünlüğe sahip düzenli filamentlerin oluşumu için elastik, ekstrüzyon sırasında iğneden akış için ise viskoz bir yapıya sahip olmalıdır (Deo ve ark., 2020).

Biyomürekkeplerin frekans taraması, sırasında %0, 1, 2 ve 3 NS oranı için (%10 JelMA ve %1 HA) G' değerleri 423,923, 844,654, 2090 ve 2906,923 Pa olarak belirlenmiştir. Depolama modülünün NS oranına bağlı olarak anlamlı olarak yükseldiği belirlenmiştir. %0, 1 ve 2 HA oranı için (%10 JelMA ve %2 NS) G' değerleri 1073, 2090 ve 2214,615 Pa olarak belirlenmiştir. Hidrojellerin G'>G" özelliği göstermesi ekstrüde edilebilmeleri ve yüksek hücre canlılığı için önem taşıdığı bilinmektedir (Aguado ve ark., 2012). Bu kapsamda, frekans taraması sonucu elde edilen sonuçlar, tüm frekanslarda G' değerlerinin G″ değerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar başarılı bir basım için umut vadetmektedir.

Formülasyonlarda nanosilika varlığının yüzey topografisinin nasıl değiştiğini değerlendirmek amacıyla nanosilika içermeyen ve farklı konsantrasyonlarda nanosilika içeren örnekler hazırlanmıştır.

JelMA ve HA'dan oluşan ve nanosilika içermeyen örneklerin (10J-0NS-1HA) yüzey özellikleri incelendiğinde, örnek yüzeyinin oldukça düz olduğu saptanmıştır. Bunun nedeninin pozitif yüklü JelMA ile negatif yüklü HA'nın elektrostatik etkileşimi olduğu düşünülmektedir (Yasayan, 2020). Literatürde, kompleks oluşumu ile yapılan çalışmalarda düz ve pürüzsüz yüzeyler güçlü bir etkileşimle kompleks oluşumunun göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Maciel ve ark., 2015).

Nanosilika içeren yüzeyler karşılaştırıldığında, farklı oranlarda nanosilika eklenmesinden sonra, yüzeylerin genel olarak benzer topografik özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Nanosilika ilavesi sonrası tüm yüzeyde nanometre boyutlarında yerel çıkıntıların oluştuğu gözlenmektedir. Nanosilika oranı artmasına paralel olarak yüzeyde bu nano-çıkıntılara ilave olarak dalgalanmalar da görünmeye başlanmıştır. Bu dalgalanma, %2 ve %3 oranında NS içeren formülasyonda görülmüştür. Bu spesifik topografi %3 NS içeren örnekte oldukça belirgindir; hem topografi hem de kesit analizleri bunu göstermektedir. Artan nanosilika oranı ile yüzey topografisindeki bu değişimler, literatür ile uyumlu bulunmuştur (Gojzewski ve ark., 2017; Akhayere ve ark., 2019; Amiri ve ark., 2012).

AFM görüntülerinden hareketle ölçülen yüzey pürüzlülük değerleri, nanosilika içermeyen yüzeyler için 1,48 nm, %1 NS yüzeyler için 2,18 nm, %2 NS yüzeyler için 2,48 nm, %3 NS yüzeyler için 11,78 nm olarak hesaplanmıştır (Tablo 18). %1 ve %2 oranında nanosilika ilavesinden sonra yüzey pürüzlülüğü bir miktar artmıştır; yüzey pürüzlülüğünün çok artmamasının nedeni olarak pozitif yüklü GelMA ile negatif yüklü NS'nin elektrostatik etkileşimi olduğu düşünülmektedir. Örneklerin düşük pürüzlülük değerlerine sahip olması, örneklerin yüksek oranda kompleksleşme gösterdiği olarak yorumlanmıştır (Şekil 40-47).

%3 oranında NS içeren formülasyonlarda, yüzey pürüzlülüğü yüksek miktarda arttoğı saptanmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda nanosilika ile JelMA'nın etkileşimlerinin değiştiği düşünülmektedir; literatürde akrikat türevi polimerler ile nanosilikanın polimerizasyon büzüşmesine (polymerisation shrinkage) neden olduğu belirtilmiştir (Gojzewski ve ark., 2017). Çalışılan formülasyonda da konsantrasyona bağlı olarak meydana gelebilecek etkileşimler ileri çalışmalarla araştırılmalıdır.

Bir doku iskelesinde hücrelerin maruz kaldığı mekanik kuvvetlerin, iskele yapısının mekanik davranışından ve hücreler için sağladığı mikro stres ortamından etkilenmesi muhtemeldir. Bu nedenle, kemik hasarlarında kullanılacak doku iskelelerin hücrelere doğru fiziksel uyaranları sağlamak için yeterli mekanik özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanması çok büyük bir önem taşımaktadır. Hazırlanan doku iskeleleri in vivo koşullarda oluşabilecek yüke dayanıklı olmalıdır. Ayrıca mekanik özellikler hücrelerin doku iskeleleri üzerine tutunmaları, proliferasyonları ve farklılaşmaları

için de oldukça önemlidir. Bu açıdan bakıldığında, malzeme şeklini korumalı ve karşılaşabileceği yüklere dayanacak kadar mekanik olarak sağlam olmalıdır. Alternatif olarak, iskele hücre sızmasına ve göçüne izin vermelidir (Agrawal ve Ray, 2001; Gaharwar ve ark., 2014; Sargeant ve ark., 2012).

Sonuç olarak, tasarlanan malzemelerin fiziksel doğasını tam olarak karakterize etmek ve anlamak çok değerlidir. Bu doku iskelelerini karakterize etmek için, hazırlanmasına takiben tüm formülasyonların mekanik özellikleri incelenmiştir. Mekanik özelliklerin değerlendirilmesi için doku iskelelerine ait sıkıştırma modülleri hesaplanarak inceleme yapılmıştır. Sıkıştırma modülü mekanik dayanıklılık ile doğru orantılıdır (Sargeant ve ark., 2012).

Sıkıştırma modülü değerlendirmeleri sonucunda doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin JelMA, nanosilika oranı ve HA oranına bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Bu kapsamda JelMA oranının mekanik özelliklere etkisini değerlendirmek için NS oranı %2, HA oranı ise %1 olarak sabit tutulmuş ve %6, 8, 10, 12 ve 14 JelMA konsantrasyonlarının sıkıştırma modülleri belirlenmiştir (Şekil 48-50). Sıkıştırma modülleri %6, 8, 10, 12 ve 14 JelMA için 9,495±2,978, 18,624±2,365, 21,526±5,149, 23,328±4,658 ve 24,939±5,128 kPA olarak belirlenmiştir. U kapsamda %6 JelMA içeren formülasyonların mekanik dayanıklılıklarının düşük olduğu belirlenmiştir. Ancak, JelMA konsantrasyonunun artması ile mekanik dayanıklılık kademeli olarak artmıştır. Bu artış JelMA oranının artması ile kovalent ağ yapısının güçlenmesine bağlanmıştır.

Farklı NS oranlarının mekanik özelliklere etkisini değerlendirmek için JelMA oranı %10, HA oranı ise %1 olarak sabit tutulmuş ve %0, 1, 2 ve 3 NS konsantrasyonlarının sıkıştırma modülleri belirlenmiştir. %0, 1, 2 ve 3 NS için sıkıştırma modülleri sırasıyla 6,416±1,759, 16,526±5,149, 21,526±5,149, 28,236± 5,637 kPA olarak belirlenmiştir. NS oranının artması ile negatif yüklü NS ve pozitif yüklü jelatin arasındaki elektrostatik etkileşimin güçlenmesi ile sıkıştırma modülü artış göstermiştir. Silika ile modifiye edilmiş matrislerde mekanik mukavemet ve strese karşı direnç artar, polimer iplikler ve lifler daha esnektir ve gerilime karşı geliştirilmiş bir direnç görülür. Mekanik basınç doğrudan silikalar aracılığıyla iletilir ve bu nedenle tüm iskele boyunca daha iyi dağıtılır. Silikalar, inorganik

malzemelerin geliştirilmiş dağılımı nedeniyle matrislerin sertliğini ve gücünü artırabilir ve hibrit yapılarda daha iyi bir organik-inorganik ara yüz elde edilir (Tang ve ark., 2014; Ding ve ark., 2015; Tang ve ark., 2017).

Farklı HA oranlarının mekanik özelliklere etkisini değerlendirmek için JelMA oranı %10, NS oranı ise %2 olarak sabit tutulmuş ve %0, 1, 2 ve 3 HA konsantrasyonlarının sıkıştırma modülleri belirlenmiştir. %0, 1, 2 ve 3 için sıkıştırma modülleri sırasıyla 26,427±4,264, 21,526±5,149, 21,287±4,421, 15,156± 2,475 kPA olarak belirlenmiştir. Artan HA oranı sıkıştırma modülünü düşürmüştür. Bu da ön basım aşamalarında %2 ve üzeri HA oranının homojeniteyi bozması bulgusu ile uyumludur.

Çoğu vücut dokusunun yüksek su içeriği göz önüne alındığında, hidrofiliklikleri hidrojelleri doku mühendisliği uygulamaları için doğal bir seçim haline getirir. Ek olarak, hidrojeller değişen seviyelerde gözeneklilik yoluyla besinlerin ve oksijenin büyüyen hücrelere difüzyonunu koruyabilir (Annabi ve ark. 2010; Sargeant ve ark., 2012). Bu noktada dikkate alınması gereken diğer özellikler arasında şişme derecesi ve malzemenin bozunma oranı yer alır. Bir implantın tanımlanmış bir kusuru dolduracağı klinik uygulamalar için, implantın çok fazla şişmemesi ve kusurdan dışarı fırlama riskinin olmaması önemlidir; tersine, implantın büzülmesi ise de çevre doku ile zayıf entegrasyona yol açabilir. Doku iskelesinin bozunması da optimal bir orana sahip olmalıdır; çok hızlı bozunma etkisizliğe yol açabilirken, çok yavaş bozunma doku büyümesini engelleyebilir (Sargeant ve ark., 2012). Şişme veya hidrasyon derecesi ayrıca etken madde salım özellikleri üzerine etkili olabilmektedir (Ghadiri ve ark., 2013; Xavier ve ark., 2015).

Bu çalışma kapsamında şişme çalışmaları pH 7,4 PBS tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. İlk bir saatte çok hızlı bir şişme davranışı ve bunu takip eden ilk üç saatte de hızlı bir artış gözlemlenmiştir. JelMA ve nanosilika artışı şişmeyi azaltırken, HA artışı şişmeyi arttırmıştır. Şişme derecesi tüm formülasyonlar için yaklaşık 12 saatte denge durumuna gelmiştir (Şekil 51-53).

Bu kapsamda farklı JelMA oranlarının şişme üzerine etkisini değerlendirmek için NS oranı %2, HA oranı ise %1 olarak sabit tutulmuş ve % 8, 10 ve 12 JelMA içeren

formülasyonlar değerlendirilmiştir. 12 saat sonunda 8J-2NS-1HA ağırlıkça değişimi % 441,21 ± 29,585, 10J-2NS-1HA ağırlıkça değişimi % 425,181 ± 29,37, 12J-2NS-1HA ağırlıkça değişimi % 416,420 ± 27,123 olarak belirlenmiştir (şekil 51). JelMA oranının yükselmesi ile hidrojelin kovalent ağ yapısı kuvvetlendiği için şişme özellikleri hafifçe azalmıştır.

Farklı NS oranlarının şişme üzerine etkisini değerlendirmek için JelMA oranı %10, HA oranı ise %1 olarak sabit tutulmuş ve % 0, 1 ve 2 NS içeren formülasyonlar değerlendirilmiştir. 12 saat sonunda 10J-0NS-1HA ağırlıkça değişimi % 537,069 ± 27,67, 10J-1NS-1HA ağırlıkça değişimi % 457,319 ± 22,98, 10J-2NS-1HA ağırlıkça değişimi % 425,181 ± 29,37 olarak belirlenmiştir (şekil 52). NS oranının artması ile fiziksel çapraz bağlanma kuvvetlendiği için şişme özellikleri azalmıştır.

Farklı HA oranlarının şişme üzerine etkisini değerlendirmek için JelMA oranı %10, NS oranı ise %0 olarak sabit tutulmuş ve % 0, 1 ve 2 HA içeren formülasyonlar değerlendirilmiştir. 12 saat sonunda farklı HA oranlarının incelenmesinde, 10J-2NS-0HA ağırlıkça değişimi % 385,593 ± 28,971, 10J-2NS-1HA ağırlıkça değişimi % 425,181 ± 29,37, 10J-2NS-2HA ağırlıkça değişimi % 492 ± 35,236 olarak belirlenmiştir (şekil 53). Beklenen üzere hidrofilik HA'nın yapıya eklenmesi ile şişme belirgin olarak artmıştır.

Doku iskelerinin degredasyon özelliklerinin yeni doku oluşumu ile eş zamanlı olması büyük bir önem taşımaktadır. Çalışma kapsamında degredasyon çalışmaları pH 7,4 PBS tamponu içerisinde 37 ºC gerçekleştirilmiştir. Sadece %0 nanosilika içeren tek formülasyon olan J10-NS0-HA1 formülasyonunun yarı ömrü yaklaşık 1-3 gün bulunurken, diğer formülasyonların degredasyon yarı ömürleri yaklaşık 3-5 gün olarak belirlenmiştir (Şekil 54,56; Tablo 19-21). Sonuç olarak, JelMA konsantrasyonunun artması beklendiği üzere degredasyon süresinin uzamasını sağlamıştır. Ayrıca, doku iskelelerinin degredasyonunun nanosilika oranı ile arttığı, nanosilika yokluğunda ise ciddi oranda azaldığı görülmektedir. Bu durum JelMA ve nanosilika arasındaki güçlü etkileşim sebebi ile açıklanabilir. İncelenen diğer araştırmalarda da nanosilika oranının artması ile degredasyon sürelerinin uzadığı görülmüştür (Gaharwar ve ark., 2012; Ghadiri ve ark., 2013; Xavier ve ark., 2015).

HA oranının artması ise degredasyon hızlandığı belirlenmiştir. Bu durum HA suda çözünme özelliğine bağlanmıştır.

Etkin madde yükleme etkinliği değerlendirmelerinde, etkin madde yükleme etkinliklerinin tüm doku iskeleleri için %95'in üzerinde olduğu görülmüştür (Tablo 22).

Doku iskelelerinden etkin madde salımı PBS pH 7,4 içerinde 37 ºC'de 21 gün süresince incelenmiştir. Salım çalışmaları farklı JelMA, NS ve HA oranlarının etkisini incelemek üzere tasarlanmıştır (Şekil 57-62).

Salım çalışmalarında farklı JelMA oranlarının salım üzerine etkisini değerlendirmek için NS oranı %2, HA oranı ise %1 olarak sabit tutulmuş ve % 8, 10 ve 12 JelMA içeren formülasyonlar değerlendirilmiştir. 8J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %50 vankomisin hidroklorür salımı yaklaşık 2-3 günde, 10J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %50 vankomisin hidroklorür salımı yaklaşık 4-5 günde, 12J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %50 vankomisin hidroklorür salımı yaklaşık 6 günde olmuştur. 14. Günde %8 JelMA içeren formülasyondan 85,64 ± 7,35, %10 JelMA içeren formülasyondan 82,48 ± 7,64, %12 JelMA içeren formülasyondan ise 71,95 ± 4,46 vankomisin HCl serbestleşmiştir. Salım çalışmalarının tamamlandığı 21. günün sonunda ise 8J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %91,75, 10J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %85,47, 12J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %75,34 oranında vankomisin hidroklorür salımı gerçekleşmiştir (Şekil 57). Salım çalışmaları kapsamında artan JelMA oranına bağlı olarak, kovalent hidrojel yapısının kuvvetlenmesi ile vankomisin HCl serbestleşme miktarı kademeli olarak yavaşlamıştır.

Salım çalışmaları kapsamında farklı NS oranlarının salım üzerine etkisini değerlendirmek için JelMA oranı %10, HA oranı ise %1 olarak sabit tutulmuş ve % 0, 1 ve 2 NS içeren formülasyonlar değerlendirilmiştir. 10J-0NS-1HA kodlu formülasyondan %50 vankomisin hidroklorür salımı yaklaşık 1 günde, 10J-1NS-1HA kodlu formülasyondan %50 vankomisin hidroklorür salımı yaklaşık 3 günde, 10J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %50 vankomisin hidroklorür salımı yaklaşık 4-5 günde olmuştur. Salım çalışmalarının 14. gününde %0 NS içeren formülasyondan

96,38 ± 2,52, %1 NS içeren formülasyondan 89,15 ± 5,31, %2 NS içeren formülasyondan ise 82,48 ± 7,64 vankomisin HCl serbestleşmiştir. Salım çalışmalarının tamamlandığı 21. günün sonunda ise 10J-0NS-1HA kodlu formülasyondan %98,23, 10J-1NS-1HA kodlu formülasyondan %94,36, 10J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %85,47 Vankomisin hidroklorür salımı gerçekleşmiştir (Şekil 59). NS oranının artması ile fiziksel çapraz bağlanmanın etkisi ile vankomisin HCl salımı belirgin olarak azalmıştır.

Salım çalışmaları kapsamında farklı HA oranlarının etken madde serbestleşmesi üzerine etkisini değerlendirmek için JelMA oranı %10, NS oranı ise %0 olarak sabit tutulmuş ve % 0, 1 ve 2 HA içeren formülasyonlar değerlendirilmiştir. 10J-2NS-0HA kodlu formülasyondan %50 vankomisin hidroklorür salımı yaklaşık 6 günde, 10J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %50 vankomisin hidroklorür salımı yaklaşık 4-5 günde, 10J-2NS-2HA kodlu formülasyondan %50 vankomisin hidroklorür salımı yaklaşık 2 günde olmuştur. 14. Günde %0 HA içeren formülasyondan 73,94 ± 3,86, %1 HA içeren formülasyondan 82,48 ± 7,64, %2 HA içeren formülasyondan ise 93,35 ± 7,84 vankomisin HCl serbestleşmiştir. Salım çalışmalarının tamamlandığı 21. günün sonunda ise 10J-2NS-0HA kodlu formülasyondan %77,34, 10J-2NS-1HA kodlu formülasyondan %85,47, 10J-2NS-2HA kodlu formülasyondan %96,83 oranında vankomisin hidroklorür salımı gerçekleşmiştir (Şekil 61). Salım çalışmalarında genel olarak, artan HA etkisiyle salım hızı belirgin olarak hızlanmıştır.

Sonuçların değerlendirmesinde doku iskelelerinden etkin madde salım süresinin JelMA miktarı ve nanosilika miktarı ile doğru orantılı olarak uzamıştır. HA artışı ise salım süresini ters orantılı olarak etkileyerek kısaltmıştır. Salım süresinin nanosilika miktarı ile orantılı olarak uzaması, jelatin ve nanosilika arasındaki etkileşime bağlanmış ve sonuçların mekanik dayanıklılık sonuçlarıyla uyum içinde olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar daha önce gerçekleştirilen çalışmalarla da uyumludur (Cross ve ark., 2019).

Doku iskelelerinden etkin madde salım kinetikleri, sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Hixon-Crowel yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır

(Tablo 22). Hazırlanan tüm formülasyonlarda vankomsin HCl salımı Higuchi'ye ve Korsmeyer-Peppas'a uygun olarak gerçekleşmiştir.

Higuchi modeli, çözünmeyen ve şişebilen bir gözenekli matris içinde dağılan suda çözünür/düşük çözünürlüğe sahip ilaçların salınması için Fick'in difüzyon yasasına dayanan difüzyon sürecini tanımlamak için kullanılır (Ilgin ve ark., 2019). Çalışma kapsamında salım kinetiklerinin Higuchi kinetiğine uyumlu olduğu belirlenmiştir. NS içermeyen 10J-0NS-1HA kodlu formülasyonda Higuchi kinetiğine ait R^2 değerinin diğer formülasyonlara göre daha düşük, Korsmeyer Peppas kinetiğine ait R^2 değerinin ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle özellikle NS ilavesinin şişmeyi azalttığı ve daha yoğun bir yapı oluşturduğu için difüzyon etkisini artırdığı düşünülmüştür.

Hidrojel yapısındaki ilaç taşıyıcılarda kovalent ve fiziksel çapraz bağlanma derecesi, degredasyon ve şişme miktarı ilaç serbestleşmesi üzerinde belirleyicidir. Korsmeyer-Peppas kinetiği, hidrojellerden salımı açıklamak için kullanılan ana mekanizmalardandır. Bu nedenle geliştirilen formülasyonlarda salım kinetiğinin Korsmeyer-Peppas'a uygun olduğu anlaşılmıştır. Özellikle NS içermeyen 10J-0NS-1HA kodlu formülasyonda Korsmeyer Peppas kinetiğine ait R^2'nin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak HA oranının etkisi değerlendirildiğinde (%10 JelMA ve %2 NS), %0, 1 ve 2 HA için Korsmeyer Peppas kinetiğine ait R^2 değerlerinin 94,97, 97,39 ve 98,48 olarak HA oranının artışına bağlı olarak kademeli olarak yükseldiği belirlenmiştir. Bu durumun şişme sonuçlarına uyumlu olduğu anlaşılmıştır. JelMA oranının %8, 10 ve 12 olarak değişmesi ile (%2NS ve %1 HA) ise Korsmeyer Peppas kinetiğine ait R^2 değerleri 98,99, 96,88 ve 94,23 olarak kademeli olarak azalmıştır. Bu durum JelMA oranının artması ile kovalent yapının güçlenmesi ve daha yoğun bir ağ yapısının oluşmasına bağlanmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, osteomiyelit tedavisi için lokal olarak enfeksiyon bölgesine implante edilmek üzere 3B biyobaskı ile vankomisin HCl içeren JelMA-NS-HA doku iskeleleri hazırlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle JelMA-NS-HA biyomürekkeplerin basım optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda çalışma farklı JelMA, NS ve HA oranlarının malzeme basılabilirliğine, topografik, reolojik ve mekanik özelliklerine, şişme, degredasyon ve ilaç serbestleştirme

davranışlarına etkisi değerlendirilmiştir. Tasarlanan doku iskelelerinin salım profillerinin Higuchi ve Korsmeyer-Peppas'a uygun olarak gerçekleştiği anlaşılmıştır. Çalışma sonunda en iyi basılabilirliği gösteren ve mekanik, şişme, degredasyon ve ilaç salım özellikleri de uygun olan 10J-2NS-1HA kodlu formülasyonun optimum formülasyon olduğu belirlenmiştir. 3B biyobasım ile hazırlanan doku iskelelerinin hastaya özgü osteomiyelit tedavisi için büyük bir umut vadetmektedir. Hazırlanan sistem lokal uygulama ile sistemik yan etkileri engelleyerek i) ölü alanı doldurabilecek, ii) yeni kemik oluşumunu indükleyebilecek (NS, JelMA ve HA'nın etkisiyle), iii) enfeksiyon kontrolünü sağlayabilecek (vankomisin ve HA'nın antimikrobiyal etkisiyle) ve hastaya özgü tedavi sağlayabilecektir. Elde edilen doku iskelelerinin hücresel davranışlarının ve antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi sonrası, elde edilen verilerin in vivo sonuçlarla desteklenmesinden sonra klinikte önemli bir yer bulabileceği öngörülmektedir.

8. KAYNAKLAR

Adams CS, Antoci Jr V, Harrison G, Patal P, Freeman TA, Shapiro IM, Parvizi J, Hickok NJ, Radin S, Ducheyne P. Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on implant surfaces successfully controls osteomyelitis. Journal of Orthopaedic Research. 2009 Jun;27(6):701-9.

Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. 2001 May;55(2):141-50.

Aguado BA, Mulyasasmita W, Su J, Lampe KJ, Heilshorn SC. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. Tissue Engineering Part A. 2012 Apr 1;18(7-8):806-15.

Alarçin E, Lee TY, Karuthedom S, Mohammadi M, Brennan MA, Lee DH, Marrella A, Zhang J, Syla D, Zhang YS, Khademhosseini A. Injectable shear-thinning hydrogels for delivering osteogenic and angiogenic cells and growth factors. Biomaterials science. 2018;6(6):1604-15.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. Critical Reviews™ in Biomedical Engineering. 2012;40(5).

Amiri B, Bahari A, Nik AS, Nik AS, Movahedi NS. Use of AFM technique to study the nano-silica effects in concrete mixture. Indian J Sci Technol. 2012 Feb;5(2):2055-9.

Anagnostakos K, Wilmes P, Schmitt E, Kelm J. Elution of gentamicin and vancomycin from polymethylmethacrylate beads and hip spacers in vivo. Acta orthopaedica. 2009 Jan 1;80(2):193-7.

Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, Dehghani F. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2010 Aug 1;16(4):371-83.

Annabi N, Tamayol A, Uquillas JA, Akbari M, Bertassoni LE, Cha C, Camci-Unal G, Dokmeci MR, Peppas NA, Khademhosseini A. 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. Advanced materials. 2014 Jan;26(1):85-124.

Anthony JP, Mathes SJ, Alpert BS. The muscle flap in the treatment of chronic lower extremity osteomyelitis: results in patients over 5 years after treatment. Plastic and reconstructive surgery. 1991 Aug 1;88(2):311-8.

Ardizzoni A, Neglia RG, Baschieri MC, Cermelli C, Caratozzolo M, Righi E, Palmieri B, Blasi E. Influence of hyaluronic acid on bacterial and fungal species, including clinically relevant opportunistic pathogens. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2011 Oct 1;22(10):2329.

Ariza J, Pujol M, Cabo J, Pena C, Fernandez N. Vancomycin in surgical infections due to meticillin-resistant Staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin. Lancet (British edition). 1999;353(9164):1587-8.

Ashammakhi N, Hasan A, Kaarela O, Byambaa B, Sheikhi A, Gaharwar AK, Khademhosseini A. Advancing frontiers in bone bioprinting. Advanced healthcare materials. 2019 Apr;8(7):1801048.

Ashby NP, Binks BP. Pickering emulsions stabilised by Laponite clay particles. Physical Chemistry Chemical Physics. 2000;2(24):5640-6.

Augustine R. Skin bioprinting: a novel approach for creating artificial skin from synthetic and natural building blocks. Progress in biomaterials. 2018 Jun;7(2):77-92.

Avery RK, Albadawi H, Akbari M, Zhang YS, Duggan MJ, Sahani DV, Olsen BD, Khademhosseini A, Oklu R. An injectable shear-thinning biomaterial for

endovascular embolization. Science translational medicine. 2016 Nov 16;8(365):365ra156-.

Bae KH, Wang LS, Kurisawa M. Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges. Journal of Materials Chemistry B. 2013;1(40):5371-88.

Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. International journal of nanomedicine. 2006 Sep;1(3):317.

Berendt T, Byren I. Bone and joint infection. Clin Med (Lond). 2004; 4(6):510–8. https://doi.org/10.7861/clinmedicine.4-6-510 PMID: 15656476.

Bernard L, Pron B, Lotthé A, Gleizes V, Signoret F, Denormandie P, Gaillard JL, Perronne C, Groupe d'Etude sur l'Ostéite. Outpatient parenteral antimicrobial therapy (OPAT) for the treatment of osteomyelitis: evaluation of efficacy, tolerance and cost. Journal of clinical pharmacy and therapeutics. 2001 Dec 31;26(6):445-51.

Bertassoni LE, Cecconi M, Manoharan V, Nikkhah M, Hjortnaes J, Cristino AL, Barabaschi G, Demarchi D, Dokmeci MR, Yang Y, Khademhosseini A. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. Lab on a Chip. 2014;14(13):2202-11.

Billiet T, Gevaert E, De Schryver T, Cornelissen M, Dubruel P. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. Biomaterials. 2014 Jan 1;35(1):49-62.

Birt MC, Anderson DW, Toby EB, Wang J. Osteomyelitis: recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. Journal of orthopaedics. 2017 Mar 1;14(1):45-52.

Bistolfi A, Massazza G, Verné E, Massè A, Deledda D, Ferraris S, Miola M, Galetto F, Crova M. Antibiotic-loaded cement in orthopedic surgery: a review. International Scholarly Research Notices. 2011;2011.

Boland T, Mironov V, Gutowska A, Roth EA, Markwald RR. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. The Anatomical Record Part A: discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology. 2003 Jun;272(2):497-502.

Boland T, Tao X, Damon BJ, Manley B, Kesari P, Jalota S, Bhaduri S. Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs. Materials Science and Engineering: C. 2007 Apr 1;27(3):372-6.

Bracaglia LG, Smith BT, Watson E, Arumugasaamy N, Mikos AG, Fisher JP. 3D printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds. Acta biomaterialia. 2017 Jul 1;56:3-13.

Bruniera FR, Ferreira FM, Saviolli LR, Bacci MR, Feder D, da Luz Goncalves Pedreira M, Sorgini Peterlini MA, Azzalis LA, Campos Junqueira VB, Fonseca FL. The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015 Feb 1;19(4):694-700.

Campos DF, Blaeser A, Weber M, Jäkel J, Neuss S, Jahnen-Dechent W, Fischer H. Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid. Biofabrication. 2012 Nov 21;5(1):015003.

Cao Y, Xiong D, Wang K, Niu Y. Semi-degradable porous poly (vinyl alcohol) hydrogel scaffold for cartilage repair: evaluation of the initial and cell-cultured tribological properties. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. 2017 Apr 1;68:163-72.

Carek PJ, Dickerson LM, Sackier JM. Diagnosis and management of osteomyelitis. American family physician. 2001 Jun 15;63(12):2413.

Carlson GA, Dragoo JL, Samimi B, Bruckner DA, Bernard GW, Hedrick M, Benhaim P. Bacteriostatic properties of biomatrices against common orthopaedic pathogens. Biochemical and biophysical research communications. 2004 Aug 20;321(2):472-8.

Carretero MI, Pozo M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries Part II. Active ingredients. Applied Clay Science. 2010 Feb 1;47(3-4):171-81.

Cheng Y, Yu Y, Fu F, Wang J, Shang L, Gu Z, Zhao Y. Controlled fabrication of bioactive microfibers for creating tissue constructs using microfluidic techniques. ACS applied materials & interfaces. 2016 Jan 20;8(2):1080-6.

Chimene D, Miller L, Cross LM, Jaiswal MK, Singh I, Gaharwar AK. Nanoengineered osteoinductive bioink for 3D bioprinting bone tissue. ACS applied materials & interfaces. 2020 Feb 24;12(14):15976-88.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clinical journal of the American Society of Nephrology. 2008 Nov 1;3(Supplement 3):S131-9.

Cohen DL, Lipton JI, Bonassar LJ, Lipson H. Additive manufacturing for in situ repair of osteochondral defects. Biofabrication. 2010 Sep 8;2(3):035004.

Colosi C, Shin SR, Manoharan V, Massa S, Costantini M, Barbetta A, Dokmeci MR, Dentini M, Khademhosseini A. Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3D tissue constructs using low-viscosity bioink. Advanced materials. 2016 Jan;28(4):677-84.

Cowin SC, Doty SB. Tissue mechanics. Springer Science & Business Media; 2007 Dec 22.

Deo KA, Singh KA, Peak CW, Alge DL, Gaharwar AK. Bioprinting 101: design, fabrication, and evaluation of cell-laden 3D bioprinted scaffolds. Tissue Engineering Part A. 2020 Mar 1;26(5-6):318-38.

Derakhshanfar, S., Mbeleck, R., Xu, K., Zhang, X., Zhong, W., Xing, M. (2018). 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances, Bioactive Materials, Vol. 3, No. 2, pp 144-156

Dhanoa A, Singh VA, Mansor A, Yusof MY, Lim KT, Thong KL. Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus

osteomyelitis in an adult: case report and review of literature. BMC infectious diseases. 2012 Dec;12(1):1-9.

Ding Y, Yao Q, Li W, Schubert DW, Boccaccini AR, Roether JA. The evaluation of physical properties and in vitro cell behavior of PHB/PCL/sol–gel derived silica hybrid scaffolds and PHB/PCL/fumed silica composite scaffolds. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015 Dec 1;136:93-8.

Drago L, Cappelletti L, De Vecchi E, Pignataro L, Torretta S, Mattina R. Antiadhesive and antibiofilm activity of hyaluronic acid against bacteria responsible for respiratory tract infections. Apmis. 2014 Oct;122(10):1013-9.

Duarte AR, Mano JF, Reis RL. Polymer Processing Using Supercritical Fluid? Based Technologies for Drug Delivery and Tissue Engineering Applications. Supercritical Fluid Nanotechnology; Pan Stanford. 2015 Oct 22:273-96.

Eaton P, West P. Atomic force microscopy. Oxford university press; 2010 Mar 25.

Echave MC, Sánchez P, Pedraz JL, Orive G. Progress of gelatin-based 3D approaches for bone regeneration. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2017 Dec 1;42:63-74.

Eivazzadeh-Keihan R, Chenab KK, Taheri-Ledari R, Mosafer J, Hashemi SM, Mokhtarzadeh A, Maleki A, Hamblin MR. Recent advances in the application of mesoporous silica-based nanomaterials for bone tissue engineering. Materials Science and Engineering: C. 2020 Feb 1;107:110267.

El-Husseiny M, Patel S, MacFarlane RJ, Haddad FS. Biodegradable antibiotic delivery systems. The Journal of bone and joint surgery. British volume. 2011 Feb;93(2):151-7.

Eltom A, Zhong G, Muhammad A. Scaffold techniques and designs in tissue engineering functions and purposes: a review. Advances in Materials Science and Engineering. 2019 Mar 1;2019.

Essien EA, Kavaz D. Effective and reusable nano-silica synthesized from barley and wheat grass for the removal of nickel from agricultural wastewater. Environmental Science and Pollution Research. 2019 Sep;26(25):25802-13.

Fayyazbakhsh F, Leu MC. A Brief Review on 3D Bioprinted Skin Substitutes. Procedia Manufacturing. 2020 Jan 1;48:790-6.

Fedorovich NE, De Wijn JR, Verbout AJ, Alblas J, Dhert WJ. Three-dimensional fiber deposition of cell-laden, viable, patterned constructs for bone tissue printing. Tissue Engineering Part A. 2008 Jan 1;14(1):127-33.

Fedorovich NE, Swennen I, Girones J, Moroni L, Van Blitterswijk CA, Schacht E, Alblas J, Dhert WJ. Evaluation of photocrosslinked lutrol hydrogel for tissue printing applications. Biomacromolecules. 2009 Jul 13;10(7):1689-96.

Gaharwar AK, Mihaila SM, Swami A, Patel A, Sant S, Reis RL, Marques AP, Gomes ME, Khademhosseini A. Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Advanced materials. 2013 Jun 25;25(24):3329-36.

Gaharwar AK, Peppas NA, Khademhosseini A. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. Biotechnology and bioengineering. 2014 Mar;111(3):441-53.

Gao G, Schilling AF, Hubbell K, Yonezawa T, Truong D, Hong Y, Dai G, Cui X. Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjet-bioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG-GelMA. Biotechnology letters. 2015 Nov;37(11):2349-55.

Gao T, Gillispie GJ, Copus JS, Pr AK, Seol YJ, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Optimization of gelatin–alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. Biofabrication. 2018 Jun 29;10(3):034106.

Gauland C. Managing lower-extremity osteomyelitis locally with surgical debridement and synthetic calcium sulfate antibiotic tablets. Advances in skin & wound care. 2011 Nov 1;24(11):515-23.

Gauvin R, Chen YC, Lee JW, Soman P, Zorlutuna P, Nichol JW, Bae H, Chen S, Khademhosseini A. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. Biomaterials. 2012 May 1;33(15):3824-34.

Ghadiri M, Chrzanowski W, Lee WH, Fathi A, Dehghani F, Rohanizadeh R. Physico-chemical, mechanical and cytotoxicity characterizations of Laponite®/alginate nanocomposite. Applied clay science. 2013 Nov 1;85:64-73.

Gojzewski H, Sadej M, Andrzejewska E, Kokowska M. Nanoscale Young's modulus and surface morphology in photocurable polyacrylate/nanosilica composites. European polymer journal. 2017 Mar 1;88:205-20.

Goole J, Amighi K. 3D printing in pharmaceutics: a new tool for designing customized drug delivery systems. International journal of pharmaceutics. 2016 Feb 29;499(1-2):376-94.

Gordon NC, Price JR, Cole K, Everitt R, Morgan M, Finney J, Kearns AM, Pichon B, Young B, Wilson DJ, Llewelyn MJ. Prediction of Staphylococcus aureus antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. Journal of clinical microbiology. 2014 Apr;52(4):1182-91.

Goyanes A, Kobayashi M, Martínez-Pacheco R, Gaisford S, Basit AW. Fused-filament 3D printing of drug products: microstructure analysis and drug release characteristics of PVA-based caplets. International journal of pharmaceutics. 2016 Nov 30;514(1):290-5.

Grabowski P. Physiology of bone. Calcium and Bone Disorders in Children and Adolescents. 2009;16:32-48.

Gray H. (1821–1865). Anatomy of the Human Body. 1918.

Guan X, Avci-Adali M, Alarçin E, Cheng H, Kashaf SS, Li Y, Chawla A, Jang HL, Khademhosseini A. Development of hydrogels for regenerative engineering. Biotechnology journal. 2017 May;12(5):1600394.

Guideline IH. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005 Nov;1(20):05.

Gupta N, Weber C, Newsome S. Additive manufacturing: status and opportunities. Science and Technology Policy Institute, Washington. 2012 Mar.

Guvendiren M, Lu HD, Burdick JA. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. Soft matter. 2012;8(2):260-72.

Guvendiren M, Molde J, Soares RM, Kohn J. Designing biomaterials for 3D printing. ACS biomaterials science & engineering. 2016 Oct 10;2(10):1679-93.

Haas DW, McAndrew MP. Bacterial osteomyelitis in adults: evolving considerations in diagnosis and treatment. The American journal of medicine. 1996 Nov 1;101(5):550-61.

Hachicha W, Kodjikian L, Fessi H. Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters. International journal of pharmaceutics. 2006 Nov 6;324(2):176-84.

Hammes WP, Neuhaus FC. On the mechanism of action of vancomycin: inhibition of peptidoglycan synthesis in Gaffkya homari. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1974 Dec;6(6):722-8.

Hardy R, Cooper MS. Bone loss in inflammatory disorders. Journal of Endocrinology. 2009 Jun 1;201(3):309-20.

Härle A, Ritzerfeld W. The release of Gentamycin into the wound secretions from polymethylmethacrylate beads. Archives of orthopaedic and traumatic surgery. 1979 Oct 1;95(1-2):65-70.

Hassanzadeh P, Kazemzadeh-Narbat M, Rosenzweig R, Zhang X, Khademhosseini A, Annabi N, Rolandi M. Ultrastrong and flexible hybrid hydrogels based on solution self-assembly of chitin nanofibers in gelatin methacryloyl (GelMA). Journal of Materials Chemistry B. 2016;4(15):2539-43.

Heinrich MA, Liu W, Jimenez A, Yang J, Akpek A, Liu X, Pi Q, Mu X, Hu N, Schiffelers RM, Prakash J. 3D bioprinting: from benches to translational applications. Small. 2019 Jun;15(23):1805510.

Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. Advanced drug delivery reviews. 2012 Dec 1;64:223-36.

Hinton TJ, Jallerat Q, Palchesko RN, Park JH, Grodzicki MS, Shue HJ, Ramadan MH, Hudson AR, Feinberg AW. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. Science advances. 2015 Oct 1;1(9):e1500758.

Hockaday LA, Kang KH, Colangelo NW, Cheung PY, Duan B, Malone E, Wu J, Girardi LN, Bonassar LJ, Lipson H, Chu CC. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. Biofabrication. 2012 Aug 23;4(3):035005.

Hölzl K, Lin S, Tytgat L, Van Vlierberghe S, Gu L, Ovsianikov A. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. Biofabrication. 2016 Sep 23;8(3):032002.

Hospodiuk M, Dey M, Sosnoski D, Ozbolat IT. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. Biotechnology advances. 2017 Mar 1;35(2):217-39.

Huddleston A. Quantitative methods in bone densitometry. Springer Science & Business Media; 2012 Dec 6.

Ilgin P, Ozay H, Ozay O. A new dual stimuli responsive hydrogel: Modeling approaches for the prediction of drug loading and release profile. European Polymer Journal. 2019 Apr 1;113:244-53.

Ilkhanizadeh S, Teixeira AI, Hermanson O. Inkjet printing of macromolecules on hydrogels to steer neural stem cell differentiation. Biomaterials. 2007 Sep 1;28(27):3936-43.

Indurkar A, Bangde P, Gore M, Reddy P, Jain R, Dandekar P. Optimization of guar gum-gelatin bioink for 3D printing of mammalian cells. Bioprinting. 2020 Dec 1;20:e00101.

Ji S, Guvendiren M. Recent advances in bioink design for 3D bioprinting of tissues and organs. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2017 Apr 5;5:23.

Jia W, Gungor-Ozkerim PS, Zhang YS, Yue K, Zhu K, Liu W, Pi Q, Byambaa B, Dokmeci MR, Shin SR, Khademhosseini A. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. Biomaterials. 2016 Nov 1;106:58-68.

Jin T, liang Zhu Y, Li J, Shi J, qing He X, Ding J, qing Xu Y. Staphylococcal protein A, Panton-Valentine leukocidin and coagulase aggravate the bone loss and bone destruction in osteomyelitis. Cellular Physiology and Biochemistry. 2013;32(2):322-33.

Joosten U, Joist A, Gosheger G, Liljenqvist U, Brandt B, von Eiff C. Effectiveness of hydroxyapatite-vancomycin bone cement in the treatment of Staphylococcus aureus induced chronic osteomyelitis. Biomaterials. 2005 Sep 1;26(25):5251-8.

Juhász ML, Marmur ES. Temporal fossa defects: techniques for injecting hyaluronic acid filler and complications after hyaluronic acid filler injection. Journal of cosmetic dermatology. 2015 Sep;14(3):254-9.

Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. Eur Cell Mater. 2008 May 2;15(2):100-14.

Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. Nature biotechnology. 2016 Mar;34(3):312-9.

Kavanagh N, Ryan EJ, Widaa A, Sexton G, Fennell J, O'rourke S, Cahill KC, Kearney CJ, O'brien FJ, Kerrigan SW. Staphylococcal osteomyelitis: disease progression, treatment challenges, and future directions. Clinical microbiology reviews. 2018 Apr 1;31(2):e00084-17.

Kazemzadeh-Narbat M, Rouwkema J, Annabi N, Cheng H, Ghaderi M, Cha BH, Aparnathi M, Khalilpour A, Byambaa B, Jabbari E, Tamayol A. Engineering photocrosslinkable bicomponent hydrogel constructs for creating 3D vascularized bone. Advanced healthcare materials. 2017 May;6(10):1601122.

Kim P, Yuan A, Nam KH, Jiao A, Kim DH. Fabrication of poly (ethylene glycol): gelatin methacrylate composite nanostructures with tunable stiffness and degradation for vascular tissue engineering. Biofabrication. 2014 Apr 10;6(2):024112.

Kumar PS, Hashimi S, Saifzadeh S, Ivanovski S, Vaquette C. Additively manufactured biphasic construct loaded with BMP-2 for vertical bone regeneration: A pilot study in rabbit. Materials Science and Engineering: C. 2018 Nov 1;92:554-64.

Kuttappan S, Mathew D, Nair MB. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering-A mini review. International journal of biological macromolecules. 2016 Dec 1;93:1390-401.

Lee HJ, Kim YB, Ahn SH, Lee JS, Jang CH, Yoon H, Chun W, Kim GH. A new approach for fabricating collagen/ECM-based bioinks using preosteoblasts and human adipose stem cells. Advanced healthcare materials. 2015 Jun;4(9):1359-68.

Lee JM, Yeong WY. Design and printing strategies in 3D bioprinting of cell-hydrogels: A review. Advanced healthcare materials. 2016 Nov;5(22):2856-65.

Lee V, Singh G, Trasatti JP, Bjornsson C, Xu X, Tran TN, Yoo SS, Dai G, Karande P. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. Tissue Engineering Part C: Methods. 2014 Jun 1;20(6):473-84.

Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. The Lancet. 2004 Jul 24;364(9431):369-79.

Li J, Chen M, Fan X, Zhou H. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. Journal of translational medicine. 2016 Dec;14(1):1-5.

Liu M, Zeng X, Ma C, Yi H, Ali Z, Mou X, Li S, Deng Y, He N. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. Bone research. 2017 May 30;5(1):1-20.

Liu Y, Chan-Park MB. A biomimetic hydrogel based on methacrylated dextran-graft-lysine and gelatin for 3D smooth muscle cell culture. Biomaterials. 2010 Feb 1;31(6):1158-70.

Liu Z, Yao P. Injectable thermo-responsive hydrogel composed of xanthan gum and methylcellulose double networks with shear-thinning property. Carbohydrate polymers. 2015 Nov 5;132:490-8.

Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. Bone. 2016 May 1;86:119-30.

Lu L, Mikos AG. The importance of new processing techniques in tissue engineering. Mrs Bulletin. 1996 Nov;21(11):28-32.

Luo R, Li H, Lam KY. Modeling and simulation of chemo-electro-mechanical behavior of pH-electric-sensitive hydrogel. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2007 Oct;389(3):863-73.

Luo S, Jiang T, Yang Y, Yang X, Zhao J. Combination therapy with vancomycin-loaded calcium sulfate and vancomycin-loaded PMMA in the treatment of chronic osteomyelitis. BMC Musculoskeletal Disorders. 2016 Dec;17(1):1-2.

Maciel VB, Yoshida CM, Franco TT. Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator. Carbohydrate polymers. 2015 Nov 5;132:537-45.

Malda J, Visser J, Melchels FP, Jüngst T, Hennink WE, Dhert WJ, Groll J, Hutmacher DW. 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. Advanced materials. 2013 Sep;25(36):5011-28.

Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 3D bioprinting for engineering complex tissues. Biotechnology advances. 2016 Jul 1;34(4):422-34.

Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. Trends in molecular medicine. 2005 Feb 1;11(2):76-81.

Martínez-Sanz E, Ossipov DA, Hilborn J, Larsson S, Jonsson KB, Varghese OP. Bone reservoir: Injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. Journal of controlled release. 2011 Jun 10;152(2):232-40.

Martino MM, Briquez PS, Maruyama K, Hubbell JA. Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. Advanced drug delivery reviews. 2015 Nov 1;94:41-52.

Matzke GR, Zhanel GG, Guay DR. Clinical pharmacokinetics of vancomycin. Clinical pharmacokinetics. 1986 Oct;11(4):257-82.

Mazzocchi A, Devarasetty M, Huntwork R, Soker S, Skardal A. Optimization of collagen type I-hyaluronan hybrid bioink for 3D bioprinted liver microenvironments. Biofabrication. 2018 Oct 30;11(1):015003.

Millán JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. Calcified tissue international. 2013 Oct;93(4):299-306.

Mobaraki M, Ghaffari M, Yazdanpanah A, Luo Y, Mills DK. Bioinks and bioprinting: A focused review. Bioprinting. 2020 Jun 1;18:e00080.

Muscolino JE. Kinesiology-E-Book: The Skeletal System and Muscle Function. Elsevier Health Sciences; 2014 Apr 14.

Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nature medicine. 2011 Oct;17(10):1231-4.

Narayanan LK, Huebner P, Fisher MB, Spang JT, Starly B, Shirwaiker RA. 3D-bioprinting of polylactic acid (PLA) nanofiber–alginate hydrogel bioink containing human adipose-derived stem cells. ACS biomaterials science & engineering. 2016 Oct 10;2(10):1732-42.

Nguyen TB, Lee BT. A combination of biphasic calcium phosphate scaffold with hyaluronic acid-gelatin hydrogel as a new tool for bone regeneration. Tissue Engineering Part A. 2014 Jul 1;20(13-14):1993-2004.

Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. Biomaterials. 2010 Jul 1;31(21):5536-44.

Niu LN, Jiao K, Ryou H, Yiu CK, Chen JH, Breschi L, Arola DD, Pashley DH, Tay FR. Multiphase intrafibrillar mineralization of collagen. Angewandte Chemie International Edition. 2013 May 27;52(22):5762-6.

Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. Advanced drug delivery reviews. 2011 Apr 30;63(4-5):300-11.

Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. Journal of orthopaedic surgery and research. 2014 Dec;9(1):1-27.

Osmon DR, Berbari EF. Outpatient intravenous antimicrobial therapy for the practicing orthopaedic surgeon. Clinical Orthopaedics and Related Research®. 2002 Oct 1;403:80-6.

Ouyang L, Highley CB, Sun W, Burdick JA. A generalizable strategy for the 3D bioprinting of hydrogels from nonviscous photo-crosslinkable inks. Advanced materials. 2017 Feb;29(8):1604983.

Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. Biomaterials. 2016 Jan 1;76:321-43.

Ozbolat IT, Moncal KK, Gudapati H. Evaluation of bioprinter technologies. Additive Manufacturing. 2017 Jan 1;13:179-200.

Ozbolat IT. Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. Trends in biotechnology. 2015 Jul 1;33(7):395-400.

Park SH, Jung CS, Min BH. Advances in three-dimensional bioprinting for hard tissue engineering. Tissue engineering and regenerative medicine. 2016 Dec;13(6):622-35.

Peppas N. Biorelated Polymers and Gels: Controlled Release and Applications in Biomedical Engineering-T. Okano (ed.), Academic Press, New York, 1998, 257 pages. Journal of Controlled Release. 2001;3(71):353.

Peppas NA, Bures P, Leobandung WS, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2000 Jul 3;50(1):27-46.

Pereira RF, Bártolo PJ. 3D bioprinting of photocrosslinkable hydrogel constructs. Journal of Applied Polymer Science. 2015 Dec 20;132(48).

Petta, D., A. R. Armiento, D. Grijpma, M. Alini, D. Eglin & M. D'Este (2018) 3D bioprinting of a hyaluronan bioink through enzymatic-and visible light-crosslinking. Biofabrication, 10, 044104.

Pina S, Oliveira JM, Reis RL. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. Advanced Materials. 2015 Feb;27(7):1143-69.

Polimetilmetakrilat BC, Raporu İO. Antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate as an anterior biomechanical device for the treatment of cervical discitis and vertebral osteomyelitis: technical report of two cases. Turk Neurosurg. 2014;24(4):613-7.

Putnam NE, Fulbright LE, Curry JM, Ford CA, Petronglo JR, Hendrix AS, Cassat JE. MyD88 and IL-1R signaling drive antibacterial immunity and osteoclast-driven bone loss during Staphylococcus aureus osteomyelitis. PLoS pathogens. 2019 Apr 12;15(4):e1007744.

Raphael B, Khalil T, Workman VL, Smith A, Brown CP, Streuli C, Saiani A, Domingos M. 3D cell bioprinting of self-assembling peptide-based hydrogels. Materials Letters. 2017 Mar 1;190:103-6.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Elsevier; 2004 Aug 18.

Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. Nature reviews Drug discovery. 2012 Mar;11(3):234-50.

Renno AC, Van De Watering FC, Nejadnik MR, Crovace MC, Zanotto ED, Wolke JG, Jansen JA, van den Beucken JJ. Incorporation of bioactive glass in calcium phosphate cement: An evaluation. Acta biomaterialia. 2013 Mar 1;9(3):5728-39.

Rice University Textbook, Anatomy and Physiology, 2017

Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. Organogenesis. 2012 Oct 1;8(4):114-24.

Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. Science. 2000 Sep 1;289(5484):1508-14.

Romanò CL, Vecchi ED, Bortolin M, Morelli I, Drago L. Hyaluronic acid and its composites as a local antimicrobial/antiadhesive barrier. Journal of bone and joint infection. 2017 Jan 1;2(1):63-72.

Rupani A, Balint R, Cartmell SH. Osteoblasts and their applications in bone tissue engineering. Cell Health and Cytoskeleton. 2012 May 8;4:49-61.

Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, Moellering R, Craig W, Billeter M, Dalovisio JR, Levine DP. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. American Journal of Health-System Pharmacy. 2009 Jan 1;66(1):82-98.

Sadeghi M, Heidari B. Crosslinked graft copolymer of methacrylic acid and gelatin as a novel hydrogel with pH-responsiveness properties. Materials. 2011 Mar;4(3):543-52.

Sargeant TD, Desai AP, Banerjee S, Agawu A, Stopek JB. An in situ forming collagen–PEG hydrogel for tissue regeneration. Acta biomaterialia. 2012 Jan 1;8(1):124-32.

Schmitt SK. Osteomyelitis. Infectious disease clinics of North America. 2017 Jun 1;31(2):325-38.

Seliktar D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. Science. 2012 Jun 1;336(6085):1124-8.

Setiawati R, Rahardjo P. Bone development and growth. Osteogenesis and bone regeneration. 2019 Apr 24;10.

Sheehy EJ, Mesallati T, Vinardell T, Kelly DJ. Engineering cartilage or endochondral bone: a comparison of different naturally derived hydrogels. Acta biomaterialia. 2015 Feb 1;13:245-53.

Shi W, Sun M, Hu X, Ren B, Cheng J, Li C, Duan X, Fu X, Zhang J, Chen H, Ao Y. Structurally and functionally optimized silk-fibroin–gelatin scaffold using 3D printing to repair cartilage injury in vitro and in vivo. Advanced materials. 2017 Aug;29(29):1701089.

Shirtliff ME, Calhoun JH, Mader JT. Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite. Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007). 2002 Aug 1;401:239-47.

Silva CR, Babo PS, Gulino M, Costa L, Oliveira JM, Silva-Correia J, Domingues RM, Reis RL, Gomes ME. Injectable and tunable hyaluronic acid hydrogels releasing chemotactic and angiogenic growth factors for endodontic regeneration. Acta biomaterialia. 2018 Sep 1;77:155-71.

Singh S, Choudhury D, Yu F, Mironov V, Naing MW. In situ bioprinting–Bioprinting from benchside to bedside?. Acta biomaterialia. 2020 Jan 1;101:14-25.

Skoog SA, Goering PL, Narayan RJ. Stereolithography in tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2014 Mar 1;25(3):845-56.

Sowjanya JA, Singh J, Mohita T, Sarvanan S, Moorthi A, Srinivasan N, Selvamurugan N. Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2013 Sep 1;109:294-300.

Spellberg B, Lipsky BA. Systemic antibiotic therapy for chronic osteomyelitis in adults. Clinical infectious diseases. 2012 Feb 1;54(3):393-407.

Stanton MM, Samitier J, Sanchez S. Bioprinting of 3D hydrogels. Lab on a Chip. 2015;15(15):3111-5.

Sun JY, Zhao X, Illeperuma WR, Chaudhuri O, Oh KH, Mooney DJ, Vlassak JJ, Suo Z. Highly stretchable and tough hydrogels. Nature. 2012 Sep;489(7414):133-6.

Tabriz AG, Hermida MA, Leslie NR, Shu W. Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. Biofabrication. 2015 Dec 22;7(4):045012.

Tang Y, Zhao Y, Wang X, Lin T. Layer-by-layer assembly of silica nanoparticles on 3D fibrous scaffolds: Enhancement of osteoblast cell adhesion, proliferation, and differentiation. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2014 Nov;102(11):3803-12.

Tice AD, Hoaglund PA, Shoultz DA. Outcomes of osteomyelitis among patients treated with outpatient parenteral antimicrobial therapy. The American journal of medicine. 2003 Jun 15;114(9):723-8.

Tokatlian T, Cam C, Siegman SN, Lei Y, Segura T. Design and characterization of microporous hyaluronic acid hydrogels for in vitro gene transfer to mMSCs. Acta biomaterialia. 2012 Nov 1;8(11):3921-31.

TÜBİTAK Bilim ve Teknik, Mart 2014(556):8

Vazao H, Barata T, Rosa S, Pontes S, Honorio I, Pereira P, Khademhosseini A, Benedito R, Fernandes H, Ferrreira L. Assessment of embryonic vascular toxicity by pluripotent stem cell-derived arterial endothelial cells on a microfluidic system. InJournal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2014 Jun 1 (Vol. 8, pp. 62-63). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.

Villar G, Graham AD, Bayley H. A tissue-like printed material. Science. 2013 Apr 5;340(6128):48-52.

Viseras C, Cerezo P, Sanchez R, Salcedo I, Aguzzi C. Current challenges in clay minerals for drug delivery. Applied Clay Science. 2010 Apr 1;48(3):291-5.

Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. New England Journal of Medicine. 1970 Jan 29;282(5):260-6.

Wang H, Heilshorn SC. Adaptable hydrogel networks with reversible linkages for tissue engineering. Advanced Materials. 2015 Jul;27(25):3717-36.

Wang Z, Abdulla R, Parker B, Samanipour R, Ghosh S, Kim K. A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks. Biofabrication. 2015 Dec 22;7(4):045009.

Wang Z, Jin X, Dai R, Holzman JF, Kim K. An ultrafast hydrogel photocrosslinking method for direct laser bioprinting. RSC advances. 2016;6(25):21099-104.

Wang Z, Tian Z, Menard F, Kim K. Comparative study of gelatin methacrylate hydrogels from different sources for biofabrication applications. Biofabrication. 2017 Aug 21;9(4):044101.

Weiner S, Wagner HD. The material bone: structure-mechanical function relations. Annual review of materials science. 1998 Aug;28(1):271-98.

Wichterle O, Lim D. Hydrophilic gels for biological use. Nature. 1960 Jan;185(4706):117-8.

Wijesekara PN, Kumbukgolla WW, Jayaweera JA, Rawat D. Review on usage of vancomycin in livestock and humans: maintaining its efficacy, prevention of resistance and alternative therapy. Veterinary sciences. 2017 Mar;4(1):6.

Włodarczyk-Biegun MK, Del Campo A. 3D bioprinting of structural proteins. Biomaterials. 2017 Jul 1;134:180-201.

Xavier JR, Thakur T, Desai P, Jaiswal MK, Sears N, Cosgriff-Hernandez E, Kaunas R, Gaharwar AK. Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. ACS nano. 2015 Mar 24;9(3):3109-18.

Xie Z, Liu X, Jia W, Zhang C, Huang W, Wang J. Treatment of osteomyelitis and repair of bone defect by degradable bioactive borate glass releasing vancomycin. Journal of Controlled Release. 2009 Oct 15;139(2):118-26.

Xu T, Gregory CA, Molnar P, Cui X, Jalota S, Bhaduri SB, Boland T. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method. Biomaterials. 2006 Jul 1;27(19):3580-8.

Yang T, Hu Y, Wang C, Binks BP. Fabrication of hierarchical macroporous biocompatible scaffolds by combining pickering high internal phase emulsion templates with three-dimensional printing. ACS applied materials & interfaces. 2017 Jul 12;9(27):22950-8.

Yasayan G. Chitosan films and chitosan/pectin polyelectrolyte complexes encapsulating silver sulfadiazine for wound healing. Journal of the Faculty of Pharmacy of Istanbul University. 2020 Dec 1;50(3):238-45.

Yu Y, Moncal KK, Li J, Peng W, Rivero I, Martin JA, Ozbolat IT. Three-dimensional bioprinting using self-assembling scalable scaffold-free “tissue strands” as a new bioink. Scientific reports. 2016 Jun 27;6(1):1-1.

Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. Biomaterials. 2015 Dec 1;73:254-71.

Zhai P, Peng X, Li B, Liu Y, Sun H, Li X. The application of hyaluronic acid in bone regeneration. International journal of biological macromolecules. 2020 May 15;151:1224-39.

Zhang J, Zheng T, Alarçin E, Byambaa B, Guan X, Ding J, Zhang YS, Li Z. Biomedicine: Porous Electrospun Fibers with Self-Sealing Functionality: An Enabling Strategy for Trapping Biomacromolecules (Small 47/2017). Small. 2017 Dec;13(47):1770249.

Zhang W, Feng C, Yang G, Li G, Ding X, Wang S, Dou Y, Zhang Z, Chang J, Wu C, Jiang X. 3D-printed scaffolds with synergistic effect of hollow-pipe structure and bioactive ions for vascularized bone regeneration. Biomaterials. 2017 Aug 1;135:85-95.

Zhang X, Zhang Y. Tissue engineering applications of three-dimensional bioprinting. Cell biochemistry and biophysics. 2015 Jul;72(3):777-82.

Zhao L, Weir MD, Xu HH. An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering. Biomaterials. 2010 Sep 1;31(25):6502-10.