MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN MULTİFERROİK NANOPARTİKÜL YÜKLÜ DOKU İSKELELERİN 3B YAZICI İLE ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Melih Musa Ayran

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği
Ana Bilim Dalı

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Songül Ulağ

EŞ-DANIŞMAN

Dr. Rıdvan Yıldırım

İSTANBUL, 2023

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN MULTİFERROİK NANOPARTİKÜL YÜKLÜ DOKU İSKELELERİN 3B YAZICI İLE ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Melih Musa Ayran 533320017

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği
Ana Bilim Dalı

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Songül Ulağ

EŞ-DANIŞMAN

Dr. Rıdvan Yıldırım

İSTANBUL, 2023

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve tez çalışmam süresince her konuda yol gösteren, doğru kararları ile beni yönlendiren, olumlu tavrıyla beni motive eden, tecrübesi ile farklı bir bakış açısıyla bakmamı sağlayan ve beraber çalışmaktan gurur duyduğum danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Songül ULAĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarımda beni destekleyen, tez çalışmama ilham olan, teşvik eden, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ ve Dr. Rıdvan YILDIRIM hocalarıma ayrıca teşekkür ederim.

FLY-2022-10578 proje numarası ile tez çalışmama maddi desteği sağlayan Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkür ederim.

Hücre çalışmalarında ve analizlerinde yardımlarından dolayı sayın Doç Dr. Banu AYDIN ve elektrik-elektronik uygulamalarında desteğiyle Prof. Dr. Ümit Kemalettin TERZİ hocalarıma teşekkür ederim.

Son olarak, eğitim hayatım boyunca benim yanımda olan, aldığım kararların her zaman saygı duyup ve destekleyen aileme sonsuz şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

OCAK 2023 **Melih Musa AYRAN**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
İÇİNDEKİLER ii
ÖZET iv
ABSTRACT v
SEMBOLLER vi
KISALTMALAR viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
TABLOLAR LİSTESİ xi
1. GİRİŞ 1
1.1. Doku mühendisliği 2
1.2. İpek fibroin yapısı ve uygulamaları 3
1.3. Keratin yapısı ve uygulamaları 5
1.4.Polimerlerin metakrilasyonu ve uygulamaları 8
1.5.Multiferroik malzemeler 9
1.6. Manyetik alan ile manyetik partiküllerin manipülasyonu 9
1.6.1. Helmholtz bobin sistemi 10
1.6.2. 3 boyutlu yazıcı teknolojisi gelişimleri ve manyetik alan ile uygulamaları 11
2. MATERYAL VE YÖNTEM 13
2.1. Malzemeler 13
2.2. Method 14
2.2.1. İpek kozalarından fibroin ekstraksiyonu ve metakrilatlanması 14
2.2.2. Yünden keratin ekstraksiyonu 14
2.2.3. Keratin metakrilatlanma işlemleri 14
2.2.4. Solüsyonların hazırlanması 15
2.2.5. Helmholtz bobinin tasarımı ve üretimi 15
2.2.6. Bobinin 3B yazıcıya entegrasyonu ve kullanımı 17
2.2.7. İskelelerin 3B yazıcıda üretimi 19
2.2.8. Optimizasyon ve baskı parametreleri 19
2.2.9. İskelelerin ve solüsyonların karakterizasyonu 19
2.2.10. Hücre analizleri 23
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 24

3.1. Morfolojik karakterizasyon 24
3.1.1. AFM analizi 28
3.1.2. XRD analizi 28
3.2. Reolojik karakterizasyonu 29
3.3. Termal karakterizasyon 31
3.4. Mekanik karakterizasyon 31
3.5. Şişme ve degradasyon karakterizasyonu 32
3.10. Kimyasal karakterizasyon 34
3.11. Hücre testi karakterizasyonu 35
4. SONUÇLAR 38
KAYNAKLAR 39

ÖZET

Doku ve rejenerasyon mühendisliği, yapı iskeleleri, hücreler ve biyofiziksel ve biyokimyasal uyaranlar dahil olmak üzere**,** mühendislik yaklaşımlarını kullanarak hasarlı, dejenere olmuş veya kusurlu dokuları değiştirmeyi, onarmayı veya yenilemeyi amaçlar. Bu çalışmada Biyokompozit olarak kullanılabilen biyolojik olarak parçalanabilen metakrilatlanmış İpek fibroin (SilkMA) ve keratin metakrilat (KerMA) iskele sentezini ve fiziko-kimyasal karakterizasyonu yapılmış, doku mühendisliğinin amaçladığı ve hedeflediği özellikler analiz edilmiştir. SilkMA, belirlenen bir doku için iyi biyouyumluluk, reolojik özellikleri ve mekanik özellikler sergiler. Bu proje kapsamında metakrilatlanmış olarak, özgünlük ve biyouyumluluk açısından KerMA malzemesi seçilmiştir ama bu malzeme tek başına reolojik özellikleri ve mekanik dayanımı bakımından zayıftır. KerMA malzemesinin reolojik özelliklerini ve fibroblast hücre canlılığını geliştirmek için farklı konsantrasyonlarda SilkMA ile kompozit oluşturulmuştur.

Biyolojik aktif maddelerin vücut içinde taşınma kabiliyetini arttırmak için manyetik demir oksit nanoparçacık protein jellerine (akışkan formda) ilave edildi. Bu manyetik nanoparçacıklara dışardan müdahale olarak 3 eksenli bir Helmholtz bobini tasarlanarak üretilmiş olup, kullanımı içinde 3B cihaza entegre edildi. Bobinin entegrasyonu ve SilkMA/KerMA iskelesi üretimi ise, 3B SLA yazıcı ile yapıldı. Polimer zincirlerinin iç yapıların düzenli ve anizotropik olacak şekilde yönlendirilme işlemi, 3B baskı sırasında 3 eksenli Helmholtz bobinin oluşturduğu 15mT manyetik alan ile gerçekleştirildi.

SilkMA/KerMA yapıların, reolojik ve elektrik iletkenliği gibi değerlerin testleri yapılarak, manyetik olarak yönlendirilip, iskelelerin 1,3 ve 7 gün boyunca üstünde fibroblast hücreler iskele üzerinde toksik etki göstermediği ve yönlendirilmiş yapılarda hücre uyumluluğu özelliklerini geliştirildiği, yapılan testler ve analizler ile değerlendirildi. Ayrıca hücrelerin çoğalmasını ve yapışması desteklediğini görmek için SEM ve DAPI testleri yapıldı. Anizotropik oryantasyonun etkisini deneysel olarak görmek için, SEM ve atomik kuvvet mikroskobunda (AFM) görüntüleme çalışmaları ve incelemeleri yapıldı. İskelelere basma testi uygulanarak, mekanik gerilmelere karşı dayanımı ve elastisitesi hesaplanıp ayrıca şişme ve bozunma testleri yapılarak, iskelelerin yüksek şişme özelliği sergilediği ve 14 gün boyunca çözünmediği tespit edildi.

ABSTRACT

Tissue and regeneration engineering aims to replace, repair or regenerate damaged, degenerated or defective tissues using engineering approaches, including scaffolds, cells, and biophysical and biochemical stimuli. In this study, the synthesis and physico-chemical characterization of biodegradable methacrylate Silk fibroin (SilkMA) and keratin methacrylate (KerMA) scaffolds, which can be used as biocomposites, were performed, and tissue engineering aimed and targeted properties were analyzed. SilkMA exhibits good biocompatibility, rheological properties and mechanical properties for a given tissue. Within the scope of this project, KerMA material was chosen as methacrylate in terms of originality and biocompatibility, but this material alone is weak in terms of rheological properties and mechanical strength. In order to improve the rheological properties of KerMA material and fibroblast cell viability, a composite was formed with SilkMA at different concentrations.

Magnetic iron oxide nanoparticle was added to protein gels (in fluid form) to increase the ability of biological active substances to be transported within the body. As an external intervention to these magnetic nanoparticles, a 3-axis Helmholtz coil was designed and produced and integrated into the 3D device in use. Integration of the coil and SilkMA/KerMA scaffold production were done with a 3D SLA printer. Orientation of the polymer chains in such a way that the internal structures are ordered and anisotropic was carried out with a 15mT magnetic field created by the 3-axis Helmholtz coil during 3D printing.

It was evaluated by tests and analyzes that SilkMA/KerMA structures were magnetically oriented, did not show any toxic effects on the scaffolds for 1,3 and 7 days, and cell compatibility properties were improved in oriented structures. In addition, SEM and DAPI tests were performed to confirm that scaffolds support cell proliferation and adhesion. To experimentally see the effect of anisotropic orientation, imaging studies and examinations in SEM and atomic force microscopy (AFM) were performed. It was determined that the scaffolds exhibited high swelling properties and did not dissolve for 14 days by applying compression test to the scaffolds, calculating its resistance and elasticity against mechanical stresses, and also performing swelling and degradation tests.

SEMBOLLER

I: Akım

C: Akım taşıyan telin yolu

α: Alfa

AC: Alternatif Akım

Wo: Başlangıç ağırlık

β: Beta

β-ME: Beta-Merkaptoetanol

μo:Boş alanın geçirgenliği

dk: Dakika

rpm: Dakikadaki devir sayısı

Fe_3O_4: Demir Oksit nanopartikülleri

DC: Doğru Akım

Tm: Erime sıcaklığı

T%: Geçirgenlik değeri

Tg: Geçiş sıcaklığı

g: Gram

g/ml:Gram/mililitre

v/v: Hacim/hacim

Hz: Hertz

$CaCl_2$: Kalsiyum Klorit

CO2: Karbondioksit

kDA: Kilo Dalton

kPa:Kilo paskal

kV:Kilo voltaj

B: Manyetik alan

μl: Mikrolitre

μm:Mikro metre

mA: Mili Amper

mg/ml:Miligram/mililitre

ml:Mililitre

mm: Milimetre

mT: Mili tesla

M: Molar

MW:Moleküler ağırlık

nm: Nanometre

Pa: Paskal

V: Potansiyel fark

N: Sarım Sayısı

cm: Santimetre

NaCI: Sodyum Klorür

Ws: Son ağırlık

T: Tesla

2θ: 2 Theta

r: Yarıçap

KISALTMALAR

AFM: Atomik kuvvet Mikroskobu

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DIOC6: (3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür)

DMEM: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri

DMSO: Dimetil sülfoksit

DFM: Dinamik Modül

DSC: Diferansiyel taramalı kalorimetri

ECM: Hücre dışı matriks

FBS: Fetal bovin serumu

FTIR: Fourier dönüşümlü kızılötesi

GMA: Glisidil metakrilat anhidrit

LAP: Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate

MA: Metakrilik Anhidrit

MTT: Metiltiazol difenil tetrazolyum

PBS: Fosfat tampon çözeltisi

PI: Propidyum iyodür

PLA: Polilaktik Asit

SDS:Sodyum dodesil sülfat

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

SLA: Stereolitografi

UV: Ultra viole

XRD: X-ışını kırınım

3B : 3-boyutlu

4B: 4-boyutlu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. İskelelerin doku mühendisliği için sahip olması gereken özellikler. 3
Şekil 1.2. İpek fibroin bazlı malzemelerin olumlu etki gösterdiği uygulamalar: hasarlı bölgedeki dokunun iyileşmesi (A), bir iskele yapısından ilaç salımı (B), Kemik rejenerasyonu. (Değiştirilmiş referans, nyugen ve ark.,2019) 5
Şekil 1.3. Keratinin yapısındaki α-sarmal ve β-kristal yapıların şematik gösterimi 6
Şekil 1.4. Keratin malzemesinin metakrilatlanma ile işlevselleştirilmesinin şematik gösterimi 8
Şekil 1.5. Tek eksenli helmholtz bobin. 10
Şekil 1.6. 3 eksenli Helmholtz bobini (Mahoney ve ark.,2011) 11
Şekil 2.1. Helmholtz bobinin katı modellemeleri: bobinin kenarlı ve gölgeli görüntüleri (a,c), bobinin kenarlı ve gölgeli hallerinin ön görünüşleri (b,d). 17
Şekil 2.2. Helmholtz bobinin SLA cihazında üretimi(a), üretim sonrası helmholtz bobinin görseli (b), bakır teller ile sarılmış ve güç kaynağına bağlanmış helmholtz bobinin görseli (c). 17
Şekil 2.3. Haznenin katı modellemesi (a), alt tablanın katı modellemesi(b), alt tablanın PLA malzemesi ile 3B yazıcı ile üretimi(c). 18
Şekil 2.4. SLA yazıcıya Entegre edilmiş Helmholtz bobini ve entegrasyon parçalarının resimi. 18
Şekil2.5. İskele üretiminin genel şeması. 19
Şekil 2.6. Yönlendirilmiş iskelenin üretim sonrası ıslak hali (a), iskele için belirlenen ızgara katı modeli (b) 19
Şekil 2.7. Morfolojik analiz için kullanılan SEM cihazı. 20
Şekil 2.8. Reoloji analizinde kullanılan reometre cihazı. 21
Şekil 2.9. Dairesel şekilde kesilen numunenin basma cihazındaki görüntüsü. 22
Şekil 2.10. Kimyasal analizde kullanılan FT-IR cihazı. 23
Şekil 3.1. C-2 grubunun SEM görüntüleri; hizalanmış nanopartikül (a) ve iskele (b) yüzeylerinin yüksek ve düşük çözünürlüklü görüntüleri. 25
Şekil 3.2. Demir oksit nanopartiküllerin toz halinde SEM görüntüleri (a, c, d), nanopartiküllerin boyutlarının histogram grafiği (b) 26
Şekil 3.3. C-1, C-2 iskelelerin SEM görüntüleri ve yönlendirilmiş C-2 iskelelerin yüksek çözünürlüklü görüntüleri 27

Şekil 3.4. C-3 iskelesinin (a, c), C-4 iskelelerin yönlendirilmiş hallerinin ve C-4 iskelelerin (e, f) kuru haldeki porlu SEM görüntüleri. 27
Şekil 3.5. İskelelerin Yüzey topografya görüntüleri; AFM(a), DFM(b,c). 28
Şekil 3.6. Np yüklü iskelelerin XRD analizi. 29
Şekil 3.7. İskelelerin farklı kayma hızlarında viskozite değerleri: C-1(a),C-2(B),C-3(c),C-4(d) 30
Şekil 3.8. Doku mühendisliği için üretilen iskelelerin DSC analizi. 31
Şekil 3.9. İskelelerin mekanik karakteristiğini belirlemek için basma testi sonuçları; grupların basma dayanımı (a), elastiklik modülü değerleri(b), birim şekil değişimi (c). ... 32
Şekil 3.10. İskelelerin belirli zaman aralığında şişme oranları (a), degradasyon oranları (b) 34
Şekil 3.11. C-1, C-2, C-3 ve C-4 iskele yapıları için FT-IR grafiği. 35
Şekil 3.12. İskelelerin MTT grafiği. 36
Şekil 3.13. 1,3 ve 7 gün için C-1, C-2, C-3 ve C-4 iskelelerin hücreli SEM görüntüleri… 37
Şekil 3.14. C-1 ve C-2 iskelelerin DAPI görüntüleri 37

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. SilkMA/KerMA solüsyonlar gruplarının konsantrasyon oranlar 1

1. GİRİŞ

İnsan vücudu, doğal olarak oluşan birçok doku, hücre dışı matris (ECM) bileşenlerinin veya hücrelerinin hizalı düzenlenmesinden kaynaklanan çeşitli anizotropik yapılar sunar. Bu yapılar, ilgili dokular için yöne bağlı fizyolojik işlevlerini gerçekleştirmede ve maksimize etmede önemli bir rol oynar (Datta ve ark.,2019; Sano ve ark.,2018). Anizotropik yapı ile ilgili yapılan birçok çalışma, mekanik dayanım (Zhang ve ark.,2019), elektriksel iletkenlik (Chen ve ark.,2019; Chae ve ark.,2020), sertlik (Gilbert-Honick ve ark.,2018) ve biyokimyasal sinyaller (Lei ve ark.,2019) dahil olmak üzere malzemenin karakteristik özellikleri geliştirdiğini göstermiştir. Doku mühendisliği için hasarlı dokuları etkin bir şekilde onarmak veya değiştirmek için, konak dokuyu taklit edebilen ayarlanabilir yapısal ve biyomekanik özelliklere sahip manyetik alan altında yönlendirilmiş doku iskelelerine ihtiyaç vardır. Doku mühendisliği için yapılan yaklaşımlar, doku kültürünü hazırlama şeklini ve hücre mikro çevresine odaklanan çoklu mikrofabrikasyon süreçlerini geliştirdi. Hücre çevresinin organize veya taklit edilmesi, hücrelerin doğal davranışlarını ve sinyal ağların geliştirilmesini sağlar (Benton ve ark., 2009).

Doku mühendisliği, tipik olarak, hücre yapışması için ilk yapısal destek sağlamak ve doku oluşumuna hizmet etmek için iskelelerin kullanılmasına dayanır (O'brien, 2011). Bu nedenle, hedef dokunun *in vivo* benzeri anizotropik yapılarına sahip bir iskelenin kullanılması, yapı iskeleleri ve doğal matris arasındaki yapısal uyumsuzluklardan kaçınılması veya tercihen eksojen veya endojen hücrelerin içinde bulunduğu fizyolojik işlevlerinin kopyalanması açısından mantıklıdır. Anizotropik bir malzemenin topografik yapısı, malzemenin kendi ECM' lerini hizalamak, uzatmak, olgunlaşmak ve daha fazla salgılamak için yönlendirilebilir (Jana ve ark., 2016). Yönlendirilmiş kristal yapı sunan anizotropik karakteristik özelliği elde etme yöntemi için öne sürülen bir çok farklı yaklaşım; mikro model, elektro eğirme, kurutma, 3B baskı, iyon difüzyon, elektrik alan ve manyetik alan olarak literatürde bahsedilmektedir (Xue ve ark., 2021;Zue ve ark., 2019).

Manyetik nanoparçacık içeren ipek fibroin tabanlı kompozit malzemeler, ilaç salımı, enjekte edilebilir jellerin değerlendirilmesi ve vücutta biyo malzemelerin yerini değiştirmek için manyetik özelliklerin kullanılması gibi çeşitli uygulamalar için kullanılmıştır (Belda

Marin ve ark., 2020). Manyetik nanoparçacıklar ile yapılan son çalışmalar incelendiğinde, ferromanyetik ve ferroelektrik düzenlerin aynı fazda birlikte bulunduğu multiferroik malzemelere olan ilgiyi arttırmıştır (Zue ve ark., 2019). Bu tür malzemeler, elektrik ve manyetik özellikler arasında manyetoelektrik davranış gösterirler. Multiferroikler; elektrik, manyetik, mekanik ve yapısal özelliklerin bir sonucu olarak ferroelektriklik, ferromanyetizma, ferro elastikiyet gibi eş zamanlı etkiler sergileyen çok işlevli bir malzeme sınıfıdır.

1.1. Doku mühendisliği

Doku mühendisliği disiplinler arası bir konudur ve insan dokularının yenilenmesi üzerine odaklanılmıştır. Vücudun kendi kendini iyileştirme yetenekleri olmasına rağmen, yenilenme derecesi dokular arasında farklılık gösterir ve ayrıca bir yaralanma veya hastalığın ciddiyeti sebebiyle iyileştirme süreci yavaşlayabilir. Geleneksel paradigma, biyomalzeme tabanlı yapı iskeleleri, hücreler ve biyoaktif kimyasalların bir karışımını kullanarak, hücre ortamı içinde doku oluşumunu ve çoğalmasını destekler. Dokulara yeterli mekanik özellikler kazandıran yapısal iskeleler yardımıyla rejenerasyon süreçlerini kolaylaştırabilen, hücre çoğalmasını ve terapötik maddelerin verimli bir şekilde iletmesine katkı sağlayan biyomalzemelerin oluşturulması, doku mühendisliğinin önemli bir alanıdır.

Biyomalzeme tabanlı iskelelerin doku rejenerasyonu ve onarımında kullanımı, doku mühendisliği alanındaki sorunların üstesinden gelinmesinden dolayı bu malzemelere ilgi ve yönelim artmıştır (Khan ve ark., 2008). İskeleler, doku mühendisliği için çok önemli olan ve doku gelişiminin onarımı, bakımı ve iyileştirilmesi için kullanılan biyomalzemelerdir (O'brien ve ark., 2011). Hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalması için gerekli olan birçok faktörün mümkün olan en iyi şekilde tedarik edilmesini sağlayan iskeleler, hasarlı dokuların onarımına ve yenilenmesine yardımcı olurlar (Langer ve ark., 2004). İskele mühendisliğinin temel fikri, iskelelerin hücre dışı matriks (ECM) yapılara benzerliğinden dolayı uygun bir şekilde orijinal dokunun ECM yapılarını çoğaltmaktır. Doku mühendisliği için, iskele yapıların kullanıldığı alanlara göre karakteristik özelliklere sahip olmalıdır, genel olarak **şekil 1.1**'de gösterilen özelliklere sahip olması amaçlanmaktadır. İskeleler, vaskülarizasyon ve yeni dokuların gelişimi için gerekli alanı sağlamasının yanı sıra, uygulamaları ile dokunun etkileşimine izin verecek şekilde yeniden yapılanmaya da izin vermelidir. Şekilleri ve formları sayesinde mekanik gerilmelere dayanarak, hasarlı dokunun

yeniden inşası için stabil olmaları ve uyum sağlamaları gerekir. Canlı dokuların viskoelastisitesi, doku homeostazı ve rejenerasyonu için çok önemlidir ve son araştırmalar, bunun aynı zamanda hastalığın başlangıcında ve ilerlemesinde de rol oynadığını göstermiştir (Huang ve ark., 2019). Biyomalzemelerin doku rejenerasyonu ve onarımında kullanımı, vücudun kendi hücreleriyle çözünmesi gereken ve görevlerini tamamladıktan sonra çözünmesi gereken malzemelerdir. İskeleler, hücrelerin hidrojeller içinde kaplanması, ECM salgılayan tabakaların kullanılması, doğal, sentetik ve biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerden gözenekli yapı iskelelerinin üretilmesi dahil olmak üzere çeşitli şekillerde üretilebilir (suamte ve ark., 2023). 3 boyutlu (3B) yazıcı teknolojileri ile üretilmesini sağlayabilmek için iskele yapılarını oluşturan solüsyonların veya hidrojellerin reolojik açıdan basılabilir olması gerekmektedir.



Şekil 1.1. İskelelerin doku mühendisliği için sahip olması gereken özellikler

1.2. İpek fibroin yapısı ve uygulamaları

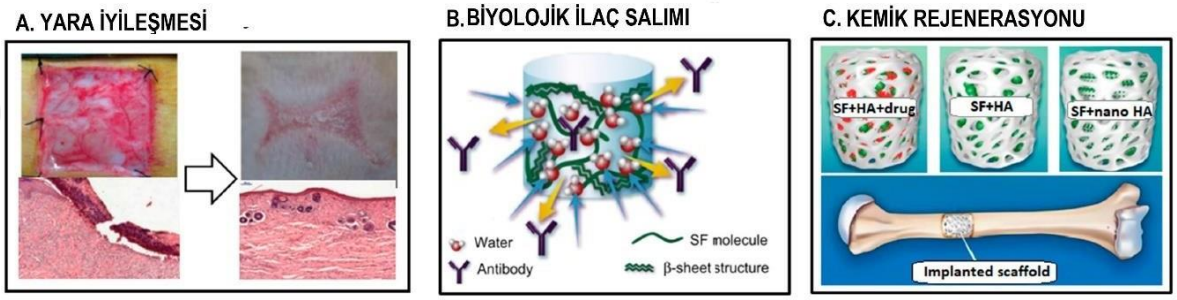
İpekler, yuvalarını (bal arıları ve yaban arıları), kozalarını (ipek böcekleri) ve ağlarını (örümcekler) inşa etmek için kullanılan bir dizi eklem bacaklı soyunun salgılama 'eğirme'

sürecinin ürünleri olan benzersiz bir biyopolimer sınıfı olarak tanımlanır. Ayrıca cırcır böcekleri, arılar, yaban arıları, pireler, dantel kanatlılar, caddisfly larvaları, su tatarcıkları larvaları, ateş kurtları ve mantar tatarcıklarının da ipek ürettiği bilinmektedir (Pereira ve ark.,2015). Bununla birlikte, en üretken ipek kaynakları Nephila clavipes ve Araneus diadematus örümcekleri, Bombyx mori (B. mori) evcil ipekböcekleri ve Antheraea pernyi ve Samia cynthia ricini yabani ipek böcekleridir (Murugesh Babu ve ark., 2017).

İpek fibroin, gelecek vaat eden bir doğal biyo malzemelerdir. Fibroin polipeptidi ipek yapı bloğunun iç çekirdeğinde bulunabilir. Mükemmel mekanik mukavemeti, biyouyumluluğu, enzimatik çözünebilirliği ve biyomolekül dayanıklılığı nedeniyle ipek fibroin, biyomedikal araştırmalarda çekici bir malzeme haline gelmiştir (nyugen ve ark., 2019). Toksik değildir, immünojenik değildir ve FDA onaylıdır (Wei ve ark., 2019). Bununla birlikte, fiziksel olarak çapraz bağlı ipek fibroin hidrojellerinin potansiyel bir dezavantajı, kırılgan olmalarıdır, bu da onları uzun süreli deformasyonlara karşı zayıf bırakmaktadır (Holland ve ark., 2019). Literatürde ipek fibroinin, metakrilatlanmış bir malzemesinin sertliğini ve elastik modülünü geliştirebildiği gösterilmiştir (Naderi ve ark., 2020). İpek fibroin ile ilgili farklı bir çalışmaya göre, metakrilatlanmış polipeptit ile osteoblast yapışma yüzeyi ve hücre yüklü bir iskele olarak kullanıldığında iyi biyouyumluluk görülmüştür (Xiao ve ark., 2019). Ek olarak, ipek fibroin partikülleri, hücre yüklenmesi sırasında hücre çökelmesini önlemeye yardımcı olan çapraz bağlanma öncesi metakrilatlanmış polipeptitlerin viskozitesini arttırmak için de kullanılmıştır (Na ve ark., 2018). Bu malzeme, spesifik karmaşık rekonstrüktif durumlarında dokular kemik yapılarıyla çevrili olduğunda sinir çatallanmalarına veya ulaşılması zor sinir yollarına tam olarak yardımcı olamaz. Bundan dolayı, manyetik nanoparçacık içeren ipek fibroin tabanlı kompozit malzemeler; ilaç salınımı, enjekte edilebilir jellerin uygulanması ve vücutta biyo malzemelerin yerini değiştirmek için manyetik özelliklerin kullanılması gibi çeşitli uygulamalar için kullanılmıştır (Ficai ve ark., 2015; Loret ve ark., 2018). **Şekil 1.2,** ipek fibroin tabanlı malzemelerin geçmişteki ve günümüzdeki uygulamaları incelendiğinde, klinik kullanımlarda hasarlı doku bölgelerinde iyileşme gözlemlendiği, kompozit yapı oluşturup kemik iyileşmesinde büyük bir rol aldığı ve polimerlerin ilaç salım kapasitesini geliştirdiği gözlemlenmiştir (nyugen ver ak., 2019).

İpekböceği kozalağından üretilen ipek fibroinler, biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikleriyle doğadaki en güçlü lifli proteinlerden biri olup, aynı zamanda

modifiye edilmemiş ipek fibroin yapıların veya geliştirilmemiş ipek malzemelerinin çoğu, gam giderme ve çözünme süreçlerinden dolayı doğal ipek liflerine kıyasla sıradan mekanik özelliklere sahiptir. Bundan dolayı sıcaklık artışı, metanol/tuz işlemi, diğer polimerlerle fiziksel olarak harmanlanmış veya kimyasal olarak çapraz bağlanma çeşitli stratejilerle ile ipek fibroin yapılarıları mekanik olarak geliştirilebilmesi mümkündür. Bu bağlamda, metakrilatlanmış gruplara dahil edilen başka polimerleri ipek fibroin ile birleştirerek foto çapraz bağlı bir hidrojel üretmek için birkaç çalışma yapılmıştır (Xiao ve ark., 2011; Kundu ve ark., 2012).



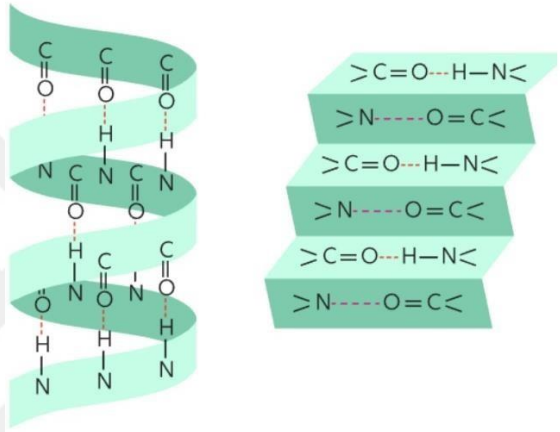
Şekil 1.2. İpek fibroin bazlı malzemelerin olumlu etki gösterdiği uygulamalar: hasarlı bölgedeki dokunun iyileşmesi (A), bir iskele yapısından ilaç salımı (B), Kemik rejenerasyonu. (Değiştirilmiş referans, nyugen ve ark., 2019).

1.3. Keratin yapısı ve uygulamaları

"Keratin" kelimesi literatürde ilk olarak 1850'lerde hayvan boynuzları ve toynakları gibi sert dokuları oluşturan materyali tanımlamak için kullanılmıştır. Geçen yüzyılda, saç ve yün liflerinden keratin proteinlerinin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonundaki gelişmeler, keratin bazlı biyomalzemeler için odak noktası haline gelmiştir. Saç, boynuz, tüy, yün ve tırnak gibi hücre iskeleti ve epidermal apendiks yapılarının büyük bir kısmı, keratin olarak bilinen sistein açısından zengin lifli proteinden oluşur (McLellan ve ark., 2019). Mevcut kükürt miktarına bağlı olarak, bu biyopolimerler, yapıları ve özelliklerindeki önemli farklılıklara dayalı olarak sert ve yumuşak keratinlere ayrılabilir. Sağlam epidermal yapı, birincil olarak, çapraz bağlı bir matriste bulunan sıralı diziler halinde düzenlenmiş ara filamentlerden oluşan, daha büyük oranda kükürt çapraz bağlarına sahip sert keratinler tarafından desteklenir.

Keratinlerin yapısı literatürde sıklıkla alfa-keratinler ve beta-keratinler olarak

tartışılmaktadır. Alfa(α)-Keratin, hiyerarşik olarak dimerler, protofilamentler, protofibriller ve ara filamentler olarak organize edilen yaklaşık 35 kalıntı uzunluğunda bir α-sarmal motifinin oluşumu ile sınıflandırılır. β-keratin yapıları ise β-kristal yapılarından oluşmaktadır. β-keratindeki polipeptit zincirleri kıvrımlı beta yaprakları şeklini alırken, α-keratinde sarmalları olarak yani sarmal yapılar olarak düzenlenirler. α-keratinin sarmal yapısı, iki bükülmüş polipeptit zinciri tarafından oluşmuştur. α ve β keratinin dağılımı söz konusu olduğunda, alfa keratin yünün, kılların, toynakları, tırnakları ve boynuzları α keratinin birincil bileşenidir. Oysa beta-keratin, tüylerin, kuş pençelerinin ve gagalarının, sürüngen pençelerinin ve pullarının birincil bileşenidir (feroz ve ark., 2020).



Şekil 1.3. Keratinin yapısındaki α-sarmal ve β-kristal yapıların şematik gösterimi

Biyomalzeme uygulamalarında kullanılmak üzere çeşitli keratin bazlı biyomalzemelerin oluşturulması, keratin araştırmalarının güçlü temelleri sayesinde mümkün olmuştur. Bu çerçeve, bu biyomalzemelerin genel fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlevini etkileyen bir dizi önemli keratin özelliğine dayanmaktadır. İzole edilmiş keratin proteinlerinin kendiliğinden bir araya gelme ve gözenekli, lifli iskeleler halinde polimerleşme kapasitesi ilk sıradadır. Keratin solüsyonlarının kendiliğinden birleşmesi, hem mikro ölçekte (Thomas ve ark., 1986) hem de makro ölçekte (Ikkai ve ark., 2002) kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu kendiliğinden bir araya gelme olgusu, saç lifinin yüksek oranda korunmuş üst yapısında belirgindir ve doğru şekilde işlendiğinde keratin bazlı malzemelerin tekrarlanabilir mimarisinden ve gözenekliliğinden sorumludur. Keratinler ayrıca doğal olarak oluşan diğer birçok makromolekül gibi doğal biyolojik aktivite ve biyouyumluluk içerir.

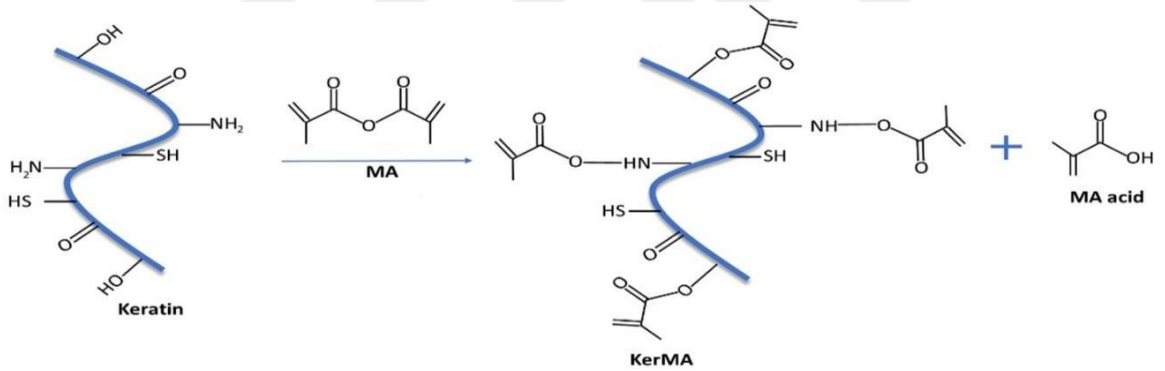
Tachibana ve ark., 2001'de uzun süreli hücre kültürü için yün keratin yapı iskelelerinin

üretimine ilişkin ilk çalışmayı yayınladılar. Kontrollü dondurmadan sonra, sulu yün keratin çözeltileri liyofilize edilerek, tek biçimli gözenekli bir mikro mimariye sahip olan ve sert olan matrisler üretilmiştir. RGD ve LDV hücre adezyonunu arttırdığı keşfedilen keratinler, iyi hücre uyumluluğu göstermiş ve 23-43 günlük uzun bir kültür periyodu boyunca fibroblastların adezyonunu ve büyümesini sürdürmüştür. Ek olarak, iskelenin serbest sistein kalıntılarının, biyoaktif bileşiklerin immobilizasyonu için modifikasyon bölgeleri olarak hizmet edebileceği gösterilmiştir.

Biyomateryal olarak büyük ilgi gören bir diğer doğal polimer, doğası gereği biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olan ipek fibroin ile keratin malzemesinin etkileşimleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. İki biyomolekül arasında meydana gelen etkileşimleri ve bunların biyomalzemenin genel mekanik ve biyolojik özellikleriyle nasıl ilişkili olduğunu anlamak için keratin-SF filmler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Keratin-SF filmlerinin ikincil yapısı üzerine yaptıkları çalışmada (lee ve ark., 1999), keratindeki polar amino asitlerin mevcudiyetinin, fibroin yapılarının rastgele α-sarmal şeklinden kendisi için β-kristal yapısına değişmesine neden olduğunu bulmuşlardır. Bu harmanlanmış filmlerin, ipek fibroin veya sadece keratin içeren filmlerden daha iyi antitrombojenik ve biyouyumluluk özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2001). Bu, büyük olasılıkla, proteinlerin konformasyonel modifikasyonu tarafından üretilen, karışımların gelişmiş yüzey polaritesinden kaynaklanmaktadır. Keratin ve silk fibroin karışımıyla elde edilmiş filmlerin mekanik ve degradasyon özellikleri, farklı bir çalışma da (Vasconcelos ve ark.,2008) incelemeleri yapılmıştır. İpek fibroin ve keratin arasındaki etkileşimlerin yalnızca birinin özellik bakımından baskın olmadığı ve daha ziyade iki proteinin birleşiminden ortaya çıkan özelliklerin, doğrudan etkisi olan spesifik moleküller arası etkileşimlerden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Bu bağlantıların türü ve yoğunluğunun yanı sıra degradasyon oranlarının anlaşılması, gelecekteki biyolojik uygulamalar için uygun olan aktif kimyasallar için salım matrislerinin geliştirilmesini sağlayabileceğini öngörmüşlerdir.

1.4.Polimerlerin metakrilasyonu ve uygulamaları

Polimeler malzemelerin hidrojel bileşenleri metakrilasyon yardımıyla foto çapraz bağlanabilir hale gelebilirler. Literatürde bunlara örnek olarak, metarkrilatlanmış hyaluronik asit (HAMA), aljinat ve jelatin (GelMA) gibi bazı hidrojel bileşenleri, foto-çapraz bağlanabilir malzemeler haline gelecek şekilde modifiye edilmiştir. Metkaritlanma sayesinde polimerler suda çözünür ve fotoçapraz bağlanabilir hale modifiye edilmiş bir şekilde getirilebilir, ayrıca biyolojik olarak aktif olarak ve geometrik olarak ayarlanabilir bir ECM matris biyomalzemesi oluşturabilir (Yu ve ark., 2022). Bu özellik, foto-çapraz bağlama reaksiyonundan geçerek basılı yapıların hızlı, kolay bir şekilde katılaşmasını ve sabitlenmesini mümkün kılar **Şekil 1.4**, keratin malzemesinin MA ile metakrilatlanması ve reaksiyon sonucu yan ürün olarak ortaya çıkan metakrilik asidin (MA acid) moleküler düzeyde gösterimidir, bununla birlikte fonksiyonel gruplardaki değişimleri ve metakrilatasyonun hangi gruplar üzerinden bağlanıldığı gösterilmektedir.



Şekil 1.4. Keratin malzemesinin metakrilatlanma ile işlevselleştirilmesinin şematik gösterimi

Hidrojeller ve diğer malzemeler, araştırmacılar tarafından ECM benzeri bir yapı oluşturmak için sıklıkla kullanılır. Yapı iskelesi, insan vücudundaki ortamı taklit ederek hücrelerin içinde büyüyebilmesini sağlar, ancak insan vücuduna uygun bir yapının ve çevreye uygun hücre iskelelerinin ne kadar hassas bir şekilde geliştirilebileceği önemli bir sorundur. Bilim adamları, daha geleneksel teknikler kullanılarak yapılandan daha kesin ve tutarlı bir yapı iskelesi üretebileceği tahmin edilen hücrelerin ve yapı iskelesi malzemelerinin uzamsal tasarımını yürütülebilmesi için 3B yazıcılara veri girişinde 3B baskı teknolojisini kullanırlar. Belirli yapılara veya formlara sahip biyomedikal araçlar, kalıplar ve organlar oluşturmak için 3B baskının kullanılması yaygın bir eğilimdir. Uygun biyomürekkep ile 3B

baskı, iskeleler veya hidrojeller üretmek ve doku mühendisliği veya rejenerasyon için gerçek dokulara benzeyen karmaşık sistemler oluşturmak için bir imkân sunar (jammalamadaka ve ark., 2018; Pekkanen ve ark., 2017).

1.5.Multiferroik malzemeler

Manyetik parçacıklar alanında yapılan son çalışmalar incelendiğinde, ferromanyetik ve ferroelektrik düzen gibi aynı fazda iki ferroik düzenin aynı anda bulunanan multiferroik malzemelere olan ilgi artmıştır (Zhu ve ark., 2019). Bu tür malzemeler, elektrik ve manyetik özellikler arasında manyetoelektrik davranış gösterirler. Manyetoelektrik, manyetik ve elektronik özellikleri arasında önemli karşılıklı bağlantı sergileyen malzemenin genel adıdır. Bu kategoridekiler, aynı anda ferroelektriklik ve ferromanyetizma özellikler sergilerler. Multiferroikler; elektrik, manyetik, mekanik ve yapısal özelliklerin bir sonucu olarak ferroelektriklik, ferromanyetizma, ferro elastikiyet gibi eş zamanlı etkiler sergileyen çok işlevli bir malzeme sınıfıdır (Barone ve ark., 2012; Lu ve ark., 2019).

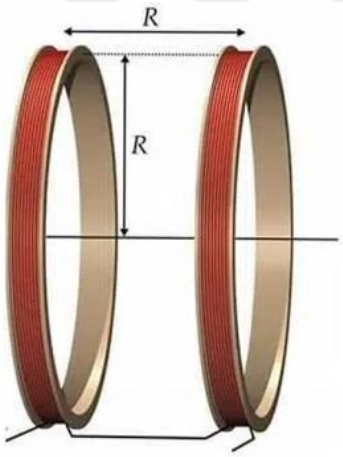
Kolayca erişilebilen tek kristalli substratların kafesiyle eşleşen ve sınırlı sayıda atomik türden oluşan bir yapıya sahip oda sıcaklığında multiferroikler belirgin bir avantaja sahiptir. Fe_3O_4 gibi düşük sıcaklıkta multiferroik geçiş metali monoksitlerinin ortam sıcaklığında multiferroik olduğunu anlamak zordur, bu da diğer basit oksitler arasında bu özelliği inceleme ihtiyacını vurgulamaktadır.

1.6. Manyetik alan ile manyetik partiküllerin manipülasyonu

Manyetik parçacık manipülasyonu kullanılarak mikro ve nano parçacıkların hizalanmasının mekanik özellikleri geliştirdiği gösterilmiştir (Nelson ve ark., 2019). Parçacık dağılımını yönetmek için parçacıkların uygulanan manyetik alana tepki vermesi gerekir. Bazı diyamanyetik ve paramanyetik malzemeler, fiziksel olarak riskli veya ekonomik olarak mümkün olmayan çok güçlü manyetik alanlar gerektirebilir. Bunun nedeni, yüzey mıknatıslanma süreçlerinde diyamanyetik ve paramanyetik parçacıkların yerini almak, parçacıkların manyetizasyonunu değiştirmek için daha büyük parçacıkların yüzeyleri üzerine kaplanan süperparamanyetik parçacıkların kullanılmasıdır. Fe_3O_4 parçacıkları içeren anyonik bir ferro sıvı ile yüzey manyetizasyonunun kullanılması özellikle dikkate değerdir (Graeve ve ark, 2013). Zıt yüklü iki parçacık arasındaki elektrostatik temas, güçlü bir bağlantı oluşturur ve yüzey mıknatıslanma sürecine izin verir.

1.6.1. Helmholtz bobin sistemi

Literatürde bahsedilen ideal olarak tekdüze bir manyetik alan üretebilen Helmholtz bobini, manyetik parçacıkları manipüle etmek için faydalı olduğu gösterilen bir cihazdır. Bir Helmholtz bobini, tek eksen olarak düşündüğümüzde aynı akımı geçirmek için koaksiyel olarak yönlendirilmiş ve seri bağlanmış iki benzer bobinden oluşur (**şekil 1.5**). Bobinler arasındaki mesafe bobinin yarıçapına eşittir. Sensörleri kalibre ederken veya Dünya'nın manyetik alanını ortadan kaldırırken olduğu gibi, oldukça düzgün bir manyetik alan gerektiğinde, Helmholtz bobinleri kullanılır (Nelson ve ark., 2019).

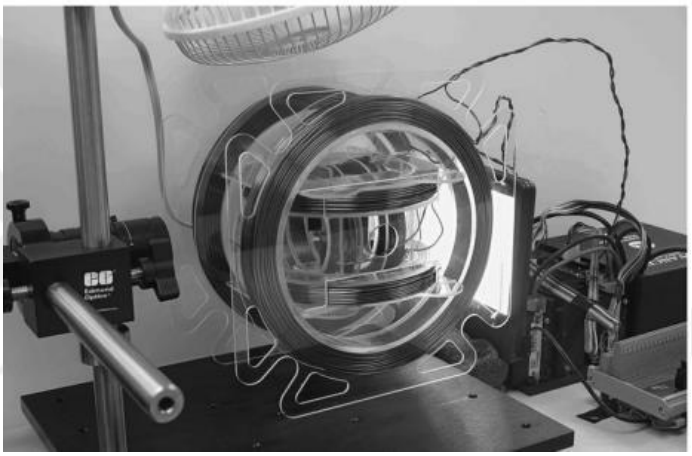


Şekil 1.5. Tek eksenli helmholtz bobin

Manyetik alan hem uzayda hem de düzlemde dönebilir. İki veya üç eksenli Helmholtz bobinleri, bir hacimde veya bir düzlemde dönen bir manyetik alan oluşturabilir. Üç Helmholtz bobin çiftini kartezyen koordinat sisteminde birbirine dik olarak hizalayarak, istenen yön ve yoğunlukta dönen bir hacimde tekdüze dönen bir manyetik alan oluşturmak mümkündür. Bobinlerden geçen akımın yönü ve şiddeti ayarlanarak dönen manyetik alanın yönü ve yoğunluğu değiştirilebilir. Dönen manyetik alan, herhangi bir mekanik aksesuara ihtiyaç duymadan bir 3B Helmholtz bobini kullanılarak oluşturulabilir ve çeşitli uygulamalarda kullanılabilir.

Galt ve ark.,1993, 3 eksenli bobinin tasarımı için ilk olarak her bobinin çapı 20 cm olan bir 3B Helmholtz bobin sistemi geliştirdiler ve hem AC hem de DC manyetik alanlar üreterek, manyetik alanların iyon kanalları üzerindeki etkisine baktılar. Her bir bobin üzerine 25 adet 0,75 mm çapında bakır tel sarılmıştır. Sistem AC'de 20 ve 40 Hz frekanslarında 50

mV voltaj uygulanarak çalıştırılmıştır. Bu çalışmadan sonra farklı bir ekip tarafından (Lassahn ve ark., 1995) oldukça büyük bir alan boyunca tutarlı bir manyetik alan yaratmak amacıyla 210 cm, 215 cm ve 220 cm çaplarında üç bobin çiftinden oluşan bir 3D Helmholtz bobin sistemi oluşturdu. 3 boyutlu Helmholtz bobin teknolojisinin, 3 boyutlu manyetik alan sensörlerini kalibre etmek için kullanıldığında hassasiyetten ödün vermeden kalibrasyon prosedürünü çok daha kolay hale getirdiğini iddia ettiler. Bu çalışmadan 16 yıl sonra, yeni ekipmanlarla farklı araştırmacılar tarafından (Mahoney ve ark., 2011), yerçekimi ayarı ve hız kontrolü için manyetik sarmal mikro sürücüler kullanıldı ve araştırmalarını bir 3B Helmholtz bobin sistemi kullanarak yürüttüler (**Şekil 1.6**). Bobin çiftleri sırasıyla 44 mm, 69 mm ve 98 mm yarıçaplara sahipti ve hepsi aynı akım değerinde çalışacak şekilde yapıldı. Her bobin, 1.628 mm çapında bakır tel kullanılarak sarılmıştır.



Şekil 1.6. 3 eksenli Helmholtz bobini (Mahoney ve ark.,2011)

1.6.2. 3 boyutlu yazıcı teknolojisi gelişimleri ve manyetik alan ile uygulamaları

Polimerik 3D baskı teknolojisi, özellikle otomobil, moda, tasarım ve mimari endüstrileri gibi ürün özelleştirme ve karmaşık formların önemli katma değerli özellikler olduğu çeşitli endüstriyel sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, faydaları, tasarım özgürlüğüne ve maliyet düşürmeye ek olarak esnekliği ve yeni malzemelere adaptasyonu ile genişletilebilmektedir. (Wohlers ve ark., 2017; Gross ve ark., 2014; Berman ve ark., 2014).

Fonksiyonel malzemelerin sentezi ve yazdırılabilir kompozitlerin oluşturulması için potansiyel yeni kullanım alanlarını araştırmak için son yıllarda giderek daha fazla çalışma yapılmıştır (Farahani ve ark., 2016; Mohan ve ark., 2017). Son zamanlarda bu alanda çok

yeni bir çalışma alanı gelişti. Dış uyaranlara tepki olarak biçimlerini ve özelliklerini değiştirebilen akıllı materyallerin basılması ve teknolojinin dördüncü boyut olduğu 4 boyutlu (4B) baskı sistemlerine ilgi artmaya başlamıştır (Mitchell ve ark.,2018; Choi ve ark.,2015). Robotik, sensörler ve biyotıp dahil olmak üzere çok sayıda endüstrinin 4B baskı (Hann ve ark., 2020) sayesinde devrim niteliğinde ilerlemeler görmesi hedeflenmektedir. Polimerik 4B baskı için akıllı malzemeler, çözücüler (Meng ve ark., 2013), ışık (Yang ve ark., 2017), sıcaklık (Wu ve ark., 2016), elektrik yükleri (Bar-cohen ve ark., 2002) ve pH (Bose ve ark., 2013) gibi fizikokimyasal uyaranlar tarafından etkinleştirilebilen bir veya daha fazla işleve sahip olmalıdır. Bu uyaranlar ışık, sıcaklık, ışık yoğunluğu, solvent konsantrasyonu ve ışık dalga boyunu içerir. Bunlardan özellikle ilginç olanı, kaynak veya hedefle temasa geçmek zorunda kalmadan yönlerini ve güçlerini uzaktan değiştirmek basit olduğu için manyetik alanların kullanılmasıdır. Ayrıca bu alanda yapılan çalışmalar vücut için güvenli olan manyetik alanlardır (Qiu ve ark., 2015). Polimerlerin çoğunun manyetik özelliklerden yoksun olmasına rağmen, manyetik dolgu maddelerini polimerik matrise kolayca eklemek için bu özellik kullanılmalıdır. Düşük yoğunluklu manyetik alanların kullanılması, 4D uygulamaları için uygun adaylar olan yumuşak manyeto-tepkisel kompozit polimerlerin deforme edilmesini kolaylaştırır.

Bununla birlikte, yüksek yoğunluklu manyetik alanların kullanılması, malzemenin üretiminde, azalan malzeme stabilitesini, zayıf dolgu maddesi dağılımında, basılı katmanlar içinde zayıf yapışma yani kötü baskı kalitesi ve zayıf mekanik kaliteler dahil olmak üzere çeşitli sorunlara neden olur. Öte yandan, manyetik dipollerin organizasyonu ve manyetik alana tepki veren parçacıkların yapısı, manyetik parçacıkların bir sıvı ortam boyunca yayıldığında ve homojen bir manyetik alana maruz kaldığında baştan sona bir düzenleme oluşturulmasını sağlar (Rozhkov ve ark., 2018; Zverev ver ark., 2021). Bu sistemlerde üretilen manyetik kuvvetlerin bir sonucu olarak, manyetik partiküller ile hizalanmış zincir benzeri yapılar halinde kendiliğinden birleşir. Yoğunlaşmış topaklaşmaların geometrisi nedeniyle, yapının ana ekseni boyunca yönlendirilmiş bir mıknatıslanma yönüne sahip bir manyetik anizotropi vardır. Bu yöntem, sıvılar, erimiş polimer solüsyonları, ışıkla kürlenebilen iskeleler ve polimer solüsyonları için kullanılabilir. Kendi kendine birleşen parçacıklar, aynı zamanda kompozit malzemenin manyetik anizotropisini de sabitleyen polimer matrisin katılaşması veya sertleşmesiyle belirli bir mikro yapı haline bürünebilir.

Doğrudan Mürekkep Yazma (DIW), Erimiş Filament Üretimi (FFF), Stereolitografi

(SL) ve Dijital Işık İşleme (DLP) teknolojileri için, 3D baskılı manyetik duyarlı parçacıkların üretimi literatürde gösterilmiştir (Hodaei ve ark., 2018). Farklı bir çalışmada (Kim ve ark., 2018) programlanabilir manyetik alanlara sahip manyetik yumuşak kompozit filmler oluşturmak için, manyetik destekli 3B DIW yazıcısı kullanılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Malzemeler

SilkMA malzemesi için kullanılan malzemeler:

- İpek böceği kozalağı
- Kalsiyum klorür ($CaCl_2$) ağırlıkça molekül ağırlığı (Mw): 110,98 g/mol
- Ethanol 95% saflıkta
- 1 M Sodyum karbonat (Merck Ltd.)
- Glisidil metakrilat (Sigm-Aldrich)
- 12–14 kDa diyaliz tüpleri (Thermo Scientific).
- LAP (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate)

KerMA malzemesi için kullanılan malzemeler:

- Koyun yünü
- 2-Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich) Mw:78,13 g/mol
- Sodyum karbonat (Merck Ltd.)
- Sodyum bikarbonat
- Sodyum dodesil sülfat (SDS)
- Ethanol 95%
- 0,1M NaCI
- 12–14 kDa diyaliz tüpleri (Thermo Scientific).
- LAP (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate)
- 1M Hidroklorik asit (HCI)
- Metakrilik anhidrit (C8H10O3)

Helmholtz bobini için kullanılan malzemeler:

- UV reçine (Mavi)
- Bakır tel (0.4mm)
- Gaussmetre
- 3 fazlı güç kaynağı
- Krokodil kablo

Ek malzeme: Demir oksit nanopartikül (Fe_3O_4)

2.2. Method

2.2.1. İpek kozalarından fibroin ekstraksiyonu ve metakrilatlanması

Her ipek böceği kozalağı 4 parçaya bölündü ve içindeki ipek böcekleri çıkartıldı. Serisini çıkarmak için 10 g dilimlenmiş ipek böceği kozalakları 1L 0.02M soydum karbonat içinde 1 saat 60 °C de bekletildi. Daha sonra, kozaklar birkaç kere yıkandı ve 1 gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldı. Kurutulmuş ipek böceği kozalakları, 5M kalsiyum klorür ve 20% ethanol çözeltisinde çözülmeye bırakıldı. 60°C ‘de 1-2 saat bekletilen fibroinler tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fibroinler çözeltide tamamen çözündükten sonra 0.5 ml/dk hızla GMA (10% v/v) eklendi ve reaksiyon için 3 saat 60°C’de 300 rpm karıştırma hızıyla devam etti. 3 saat sonra, solüsyon diyaliz membranlarına alınarak, 7 gün 4°C’ de bekletildi. Diyalizden sonra SilkMA malzemesi, kurutulması için 2 gün liyofilizatöre (christ) alındı. Toz formda elde edilen SilkMA malzemesi -20°C’ de sonraki kullanım için muhafaza edildi.

2.2.2. Yünden keratin ekstraksiyonu

Kir ve tozdan kurtulmak için yünler 0.5% (w/v) SDS ile yıkandı. Daha sonra pH, 2 saat süreyle yağdan arındırmak için etanol (EtOH) (95%, v/v) ile bir ön işlemden sonra su ile yıkanarak dengelendi. Yünler daha sonra fırında kurutularak keratin ekstraksiyonu için hazırlandı ve ardından küçük parçalar halinde öğütüldü. Yünler (30 g), damıtılmış su (900 ml), üre (270 g), SDS (28.8 g) ve 2-merkaptoetanol (28.8 g), yıkama işleminden sonra 1 litrelik yuvarlak dipli bir şişede birleştirildi. Karıştırılan solüsyon 48 saat 70°C'ye ısıtıldı ve daha sonra 1 M NaOH kullanılarak pH değeri 9-10 aralığına ayarlandı. Karışım 8000 rpm'de 15 dk 4°C'de santrifüjlendikten sonra süpernatant son karışımdan süzüldü. Elde edilen solüsyonu 0.1% 2-merkaptoetanol içeren deiyonize suya karşı diyaliz etmek için 12-14 kDa'lık bir diyaliz membranı kullanıldı. 12 saatte bir diyaliz suyu yenilendi ve 1 hafta sonra diyalizden alınan keratinler, liyofilizatörde (christ) kurutuldu.

2.2.3. Keratin metakrilatlanma işlemleri

200 mL 0.1 M CB (CB: 95 mg sodyum karbonat, 764 mg sodyum bikarbonat) tamponunda, 10 g merkaptoetanol ile hazırlanmış keratin çözüldü. Daha sonra karıştırma hızı 400 rpm' ye ayarlanarak çözelti sıcaklığı 50 °C'ye yükseltildi. Çözelti sıcaklığı 50°C' ye ulaştığında MA

kademeli olarak 1 ml'lik bir hacimde ilave edildi. Reaksiyon, her eklemeden sonra 5 N NaOH ile 30 dk süreyle pH 9' da kontrol edildikten sonra 3 saat gerçekleştirildi. Reaksiyonun durdurmak için 1M HCI pH:7.4' e ulaştırıldı. Üretilmiş KerMA malzemesi 14 gün boyunca diyalizde tutularak saflaştırma işlemi yapılmıştır.14 gün sonunda liyofilizatörde (christ) kurutularak, toz haline getirilmiştir.

2.2.4. Solüsyonların hazırlanması

SilkMA/KerMA solüsyonları 4 grup olacak şekilde aşağıdaki **Tablo 2.1**'deki gibi hazırlandı.

Tablo 2.1. SilkMA/KerMA solüsyonlar gruplarının konsantrasyon oranları

Grup adı	SilkMA(%)	KerMA(%)	Demir Oksit(mg/ml)	LAP(%)	Toplam Çözelti(ml)
C-1	24	6	X	0.5	5ml
C-2	24	6	0.4	0.5	5ml
C-3	6	24	X	0.5	5ml
C-4	6	24	0.4	0.5	5ml

Polimer malzemeler ve nanopartiküller tamamen homojen bir şekilde karışana kadar pH:8.5 olan tampon çözelti içinde manyetik karıştırıcıda 400 rpm'de 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Homojen bir solüsyon elde edildikten sonra karanlık ortamda fotobaşlatıcı (LAP) eklenmiştir. Işık görmeyecek şekilde bir sonraki işleme kadar bekletilmiştir. Bu çalışma için 4 grup belirlenmiştir. Manyetik özelliği incelemek ve kullanılan polimer malzemelerin etkilerini değerlendirmek için farklı konsantrasyonlar kullanılmıştır.

2.2.5. Helmholtz bobinin tasarımı ve üretimi

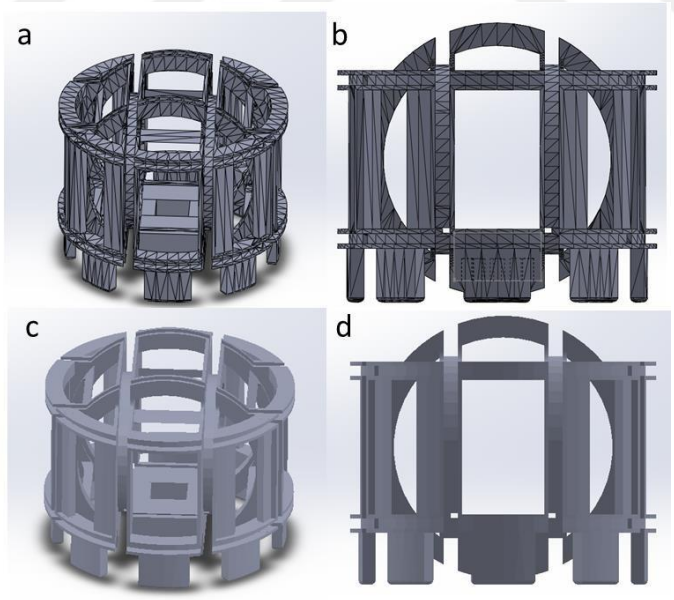
3B SLA yazıcı ile basım yaparken cihaza uyum sağlayabilecek 3 eksenli Helmholtz bobini tasarımı yapıldı (**Şekil 2.1**). Her eksende 2 bobin olacak şekilde toplam 6 tane bobin kullanıldı. Bobinlerin çapları 15 cm olacak şekilde her eksen için tasarlandı. Helmholtz bobinin üretimi için SLA (Anycubic mono x photon 6K) cihazıyla UV reçine ile basıldı. **Şekil 2.2 (a),** Manyetik alan deneysel değerlerine ek olarak, bir Helmholtz bobini tarafından üretilen manyetik alanın teorik tekdüzeliğini belirlemek için denklem 2.1'deki Biot Savart Yasası kullanıldı.

$$\vec{B}(\vec{r}) = \frac{\mu_o}{4\pi} \int_C \frac{Id\vec{\ell} \times \vec{r}'}{||\vec{r}'||3}$$

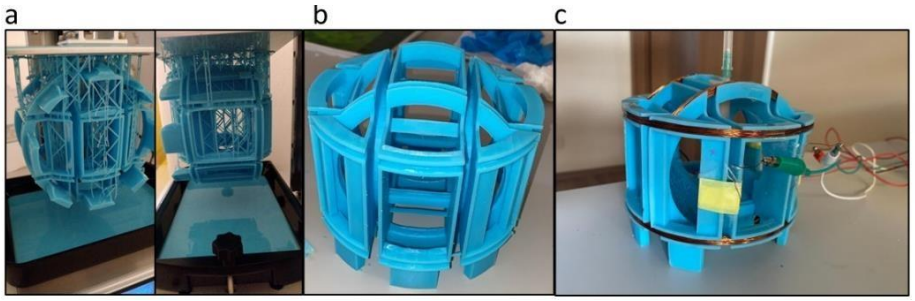
(2.1.)

Bu denklemde μo boş alanın geçirgenliğidir, C akım taşıyan telin yoludur, I akımdır, dl tel yolu boyunca bir vektördür, C bir tel elemanını temsil eder ve r yarıçaptır. Biot-Savart Yasası, Helmholtz bobininde akım taşıyan tellerin ürettiği manyetik alanı teorik olarak (B) tanımlamak için kullanıldı.

3 eksenli Helmholtz bobinin her ekseni için ayrı ayrı 0.4 mm çap kalınlığında bakır tel ile 100 sarım olacak şekilde sarıldı (**Şekil 2.2 (b)**) ve hesaplandı. Bakır telin yanmaması için en fazla 10 potansiyel fark (V) tüm eksenler için DC güç kaynakları ile besleme yapıldı (**Şekil 2.2 (c)**). Tasarlanan bobinin ortasında her eksenden eşit bir manyetik alana maruz kalarak basım gerçekleştirildi. 1-1.5 akım (A) verilerek, manyetik alanın 15 mT değeri sabit tutularak, malzemelerin konumsal yönlendirilmesi sağlandı.



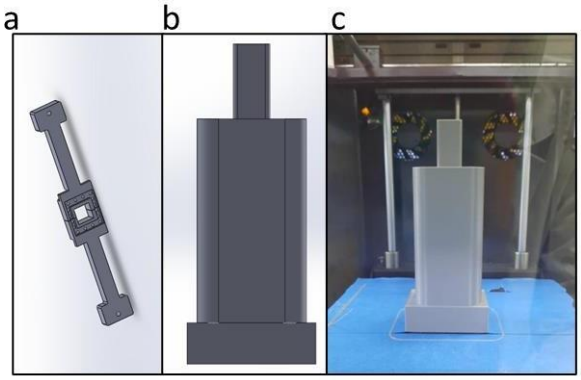
Şekil 2.1. Helmholtz bobinin katı modellemeleri: bobinin kenarlı ve gölgeli görüntüleri (a, c), bobinin kenarlı ve gölgeli hallerinin ön görünüşleri (b, d).



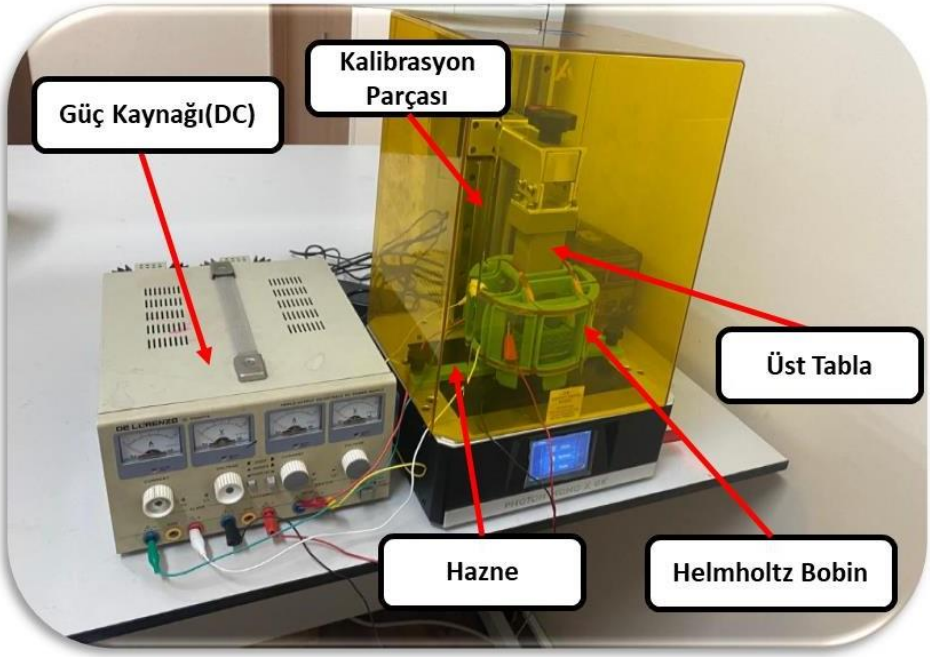
Şekil 2.2. Helmholtz bobinin SLA cihazında üretimi(a), üretim sonrası Helmholtz bobinin görseli (b), bakır teller ile sarılmış ve güç kaynağına bağlanmış Helmholtz bobinin görseli (c).

2.2.6. Bobinin 3B yazıcıya entegrasyonu ve kullanımı

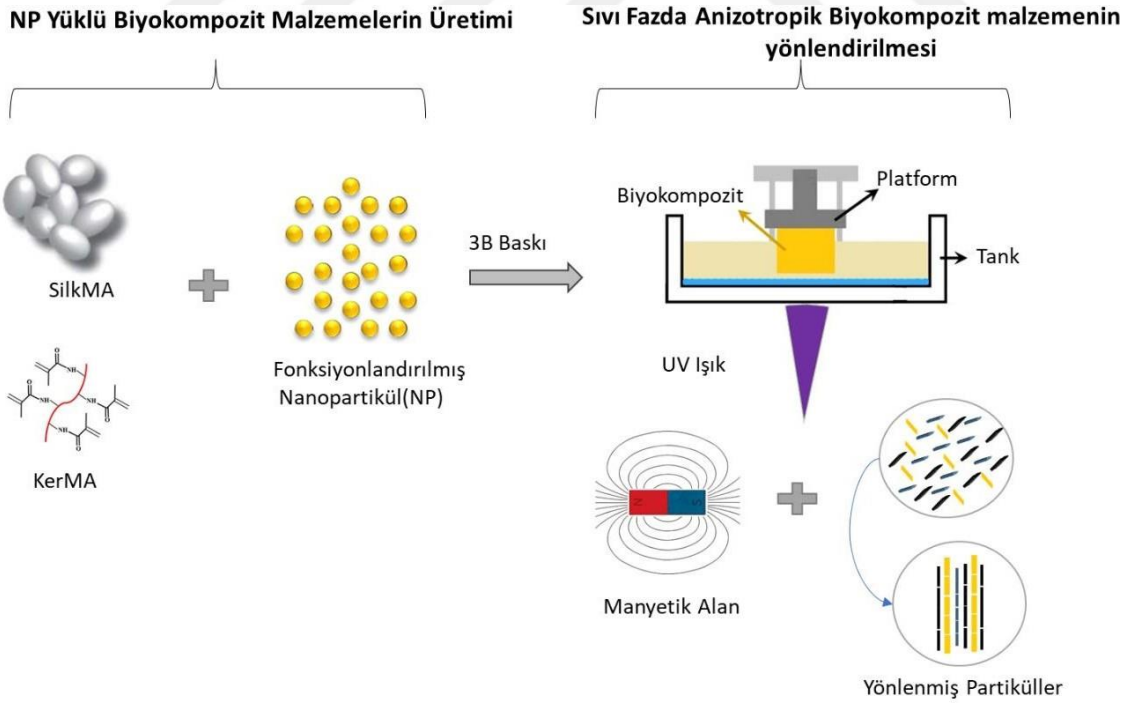
Helmholtz bobinin üretiminden sonra 3B SLA (anycubic photon mono x 6k) cihazına kurulmasını ve basım yapmaya izin vermesi için parçalar üretildi. Bu parçalardan biri solüsyonu koyacağımız hazne (**Şekil 2.3 (a)**), kullanılacağı cihazda üretildi. Haznenin, solüsyonu sızdırmaması gerekmektedir, bundan dolayı FEP filmin altına sızdırmayı önleyecek silikonlar yerleştirildi. Basılacak geometrik yapının tutunup, yapışacağı ve Helmholtz'dan geçerek z ekseninde hareket eden üst tabla, filamentli 3B (Creality CR-200B) yazıcıda üretildi. Dayanıklı olması için reçine yerine PLA filamenti ile üretilmiştir (**Şekil 2.3 (c)**). Bobinin cihaz üzerinde, üst tablaya yükseklik kazandırdığından dolayı, SLA yazıcının daha yukarda kalibrasyon yapılmasına izin verilmesi gerekmektedir. Bu cihazda bu özelliği sağlayabilmek için cihazın kalibrasyon çubuğu tekrar modifiye edildi ve üst tablanın basımı sürdürebilmesi için gereken yükseklik sağlandı. **Şekil 2.4**, Helmholtz bobinin kullanılabilir şekilde SLA yazıcı üstünde entegrasyonunu göstermektedir.



Şekil 2.3. Haznenin katı modellemesi (a), alt tablanın katı modellemesi (b), alt tablanın PLA malzemesi ile 3B yazıcı ile üretimi (c).



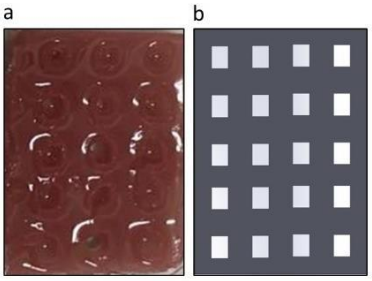
Şekil 2.4. SLA yazıcıya entegre edilmiş Helmholtz bobini ve entegrasyon parçalarının resmi



Şekil 2.5. İskelelerin üretiminin genel şeması

2.2.7. İskelelerin 3B yazıcıda üretimi

SilkMA/KerMA iskeleler için ızgara modeli tercih edildi. Çapraz bağlama durumu göz önüne bulundurulduğunda, en ideal iskele olarak ızgara belirlendi çünkü yüksek katmanlı olmaması, karmaşık bir geometriye sahip olmaması ve doku mühendisliği için istenilen porlu yapıya sahip olmasından dolayı ızgara modeli tercih edilmiştir. **Şekil 2.6.**, ızgara modelinin katı modelini ve manyetik alan etkisi ile 3B olarak basılmış SilkMA/KerMA iskelesini göstermektedir.



Şekil 2.6. Yönlendirilmiş iskelenin üretim sonrası ıslak hali (a), iskele için belirlenen ızgara katı modeli (b).

2.2.8. Optimizasyon ve baskı parametreleri

SilkMA/KerMA solüsyonların baskı parametreleri için optimizasyon yapıldı. UV maruz kalma süresi 90sn olarak ayarlandı. Bu sürenin altında katmanlar arasında bütünlüğün sağlanamadığı görülmüştür. Katman yüksekliği 0.05mm, alt taban maruz kalma süresi 60sn ve UV yoğunluğu 90% olarak ayarlandı. Izgara geometrisine sahip iskelelerin basım süresi her biri için yaklaşık 45dk sürdü.

2.2.9. İskelelerin ve solüsyonların karakterizasyonu

2.2.9.1. İskele yapıların morfolojik analizleri

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüksek çözünürlüklü görseller oluşturur ve katı malzeme yüzeylerinin vakumdan sonra 3 boyutlu morfolojik özelliklerini analiz etmek için kullanılır. Deneysel araştırma sırasında, 3B SLA yazıcı tarafından oluşturulan yapı iskelesi örneklerinin morfolojisini belirlemek ve hücre testi denemelerinden elde edilen örneklerde hücre yapışmasını ve çoğalmasını göstermek için kullanıldı.

SEM analizinden önce numunelerin yüzeyleri, yaklaşık 2 dk boyunca QUORUM SC7620 Sputter Coater kullanılarak altınla kaplandı. Bu şekilde kaplanan numuneler, 20 kV hızlanma voltajına sahip bir SEM (EVO MA-10, Carl Zeiss, ABD) kullanılarak analiz edildi. **Şekil 2.7**, bu çalışmada kullanılan SEM cihazı göstermektedir. Numuneler etüvde 37ºC' de kurutulmuştur ve kuru numuneler üzerinden görüntüler alınmıştır.



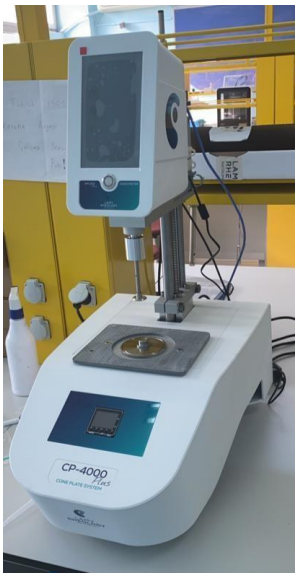
Şekil 2.7. Morfolojik analiz için kullanılan SEM cihazı

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) görüntüleri, dinamik modda (DFM) çalıştırılan Hitachi AFM5100N tipi cihaz kullanılarak toplandı. DFM modunda, uç, yıkıcı yanal kuvvetleri en aza indirmek için numune yüzeyine aralıklı temas uygular. Görüntüler, ortam sıcaklığında ve nemde 2.4 Nm^{-1} yay sabitine sahip SI-DF-3P2 (Hitachi) konsolu kullanılarak 10 x 10 ve 1x1 mikronluk alan taranarak elde edilmiştir.

İskelelerin saflığını ve kristalliğini belirlemek için X-ışını kırınım (XRD) analizi kullanıldı. Analiz, 40 kV ve 30 mA' de CuK radyasyonu (λ = 1.541) kullanılarak 2°/dk tarama hızında 10° ile 30° arasındaki bir 2θ aralığında gerçekleştirildi. Elde edilen veriler OriginPro 7.0 yazılımı (OriginLab Corporation, MA, ABD) kullanılarak XRD spektrumuna dönüştürüldü.

2.2.9.2. İskelelerin reolojik analizleri

Islak iskelelerin viskozitesini ölçmek için reolojik deneyler yapıldı. Ölçümler, MK-PP25 paralel plakası (25 mm çapında) ile CP-4000 Plus (Lamy Rheology Instruments, Champagne-au-Mont-d'Or, Fransa) reometresi kullanılarak 25°C' de gerçekleştirilmiştir. Viskozite, 120 s için 150 s^{-1}'lik sabit kesme hızında ölçülmüştür. **Şekil 2.8**, reoloji testi yapılan cihazı göstermektedir.



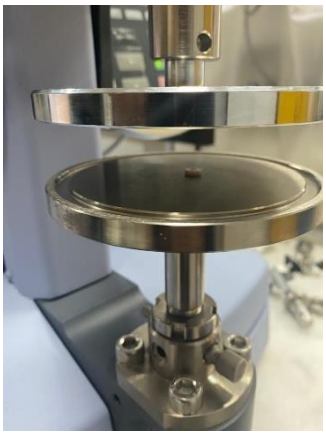
Şekil 2.8. Reoloji analizinde kullanılan reometre cihazı

2.2.9.3. İskele yapıların termal analizleri

İskele yapılarının termal davranışını belirlemek için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) cihazı kullanılarak incelenmiştir. Shimadzu DSC60 Plus cihazı, 25 °C ile 400 °C arasında değişen sıcaklıklarda alüminyum pimler üzerine yerleştirilen her bir iskelenin, termal cam geçiş sıcaklığı (T_g), erime sıcaklığı (Tm) ve termal davranışını ölçmek için kullanıldı. Ardından, bilgisayar yazılımı (OriginPro) kullanılarak grafiklere dönüştürüldü.

2.2.9.4. İskele yapıların mekanik analizleri

Basım sonrası SilkMA/KerMA iskeleleri kuru halde olacak şekilde basma testi Shimadzu cihazı ile yapılmıştır. Her numunenin gerilim-uzama eğrisi kaydedildi ve bu eğriden Young modülü hesaplandı. Ayrıca, elastik modül grafiğin ilk eğiminden elde edildi. İskeleler 10mm çaplı dairesel şekiller halinde kesilerek, basma testleri yapıldı (**Şekil 2.9**). Basma hızı 1 mm/dk olarak ayarlandı ve yükseklik 10 mm' de sabit tutuldu.



Şekil 2.9. Dairesel şekilde kesilen numunenin basma cihazındaki görüntüsü

2.2.9.5. İskele yapıların şişme ve degradasyon özelliklerinin incelenmesi

SilkMA/KerMA iskelelerinin şişme kinetikleri gravimetrik yöntemle (Zhang ve ark., 2016) incelenmiştir. İlk olarak, tüm yeni basılmış iskeleler 3 gün oda sıcaklığında kurutulmuş ve ardından tartılmıştır (başlangıç ağırlığı, W_o). Kuru iskeleler, 37°C' de fosfat tamponu (PBS) (pH 7.4) içine daldırıldı. Önceden belirlenen zaman aralıklarında, numune PBS' den çıkarıldı, yüzeydeki fazla sıvıyı uzaklaştırmak için filtre kâğıdı ile kurulandı ve tartıldı. Belirli zaman aralıklarında şişme oranı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{Ws - Wo}{Wo} * 100 \qquad \textbf{(2.1)}$$

Bu denklemde, W_o ve W_s ilk kuru iskelelerin ve şişmiş iskelelerin sabit zaman aralıklarındaki ağırlıkları göstermektedir. Tüm ölçümler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve nihai sonuç rapor edildi ve karşılık gelen standart hatayla çizildi.

In vitro degradasyon testinin başlamasından önce, iskeleler 3 gün oda sıcaklığında kurutuldu ve ardından tartıldı. Daha sonra kuru iskeleler 37◦C' de 5 mL PBS (pH 7.4) içeren eppendorflara yerleştirildi ve önceden belirlenen zaman aralıklarında örnekler PBS' den çıkarılarak üç kez deiyonize su ile yıkandı ve tekrar 1gün kurutuldu. Yapı iskelelerinin kalan ağırlığı Denklem (**2.2**)' ye göre hesaplandı:

$$\text{Degradasyon} = \frac{Wo - Ws}{Wo} * 100 \qquad \textbf{(2.2)}$$

W_o, kuru iskelenin başlangıç ağırlığıdır ve W_s, sabit zaman aralıklarında iskelenin ağırlığıdır. Yine, tüm deneysel veriler üçlü numunelerden elde edildi ve sonuç rapor edildi ve standart hata ile ortalama olarak çizildi.

2.2.9.6. İskele yapıların kimyasal analizleri

SilkMA/KerMA iskelelerin kimyasal bileşimini belirlemek için Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR, JASCO-4000) kullanıldı (**Şekil 2.10**). 4 cm^{-1} çözünürlük ile iletim modu 4.000 ile 400 cm^{-1} arasında seçilmiştir. Kimyasal analizde, iskelelerin yapısındaki bağların ışık geçirimi (T%) değerleriyle ölçüm yapıldı. Işık geçirgenlik değerlerinin ölçülmesi iskele içindeki grupların ortaya çıkarılması ve tespiti için yapılmıştır.



Şekil 2.10. Kimyasal analizde kullanılan FT-IR cihazı

2.2.10. Hücre analizleri

Farklı 3B baskılı iskelelerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi, tetrazolyum tuzu invitrogen markalı MTT' nin (3(4,5 dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) indirgeme reaksiyonu yoluyla değerlendirildi. Bu, hücresel metabolik aktivite yoluyla hücre canlılığını incelemek için yaygın olarak kabul edilen güvenilir bir yöntemdir. MTT testi, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksisitenin bir göstergesi olarak hücresel metabolik aktiviteyi ölçer. Canlı hücreler, MTT' yi formazana indirgeyen NAD(P)H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri içerir, bu da çözündükten sonra ölçülebilen ve miktarı belirlenebilen renkli bir çözelti ile sonuçlanır.

SilkMA/KerMA iskeleleri üzerinde ekilmiş insan CCD-18co fibroblast hücrelerinin in vitro hücre canlılığı değerlendirmesi, hücre kültürünün 1, 4 ve 7. günlerinde MTT testi ile gerçekleştirildi. Dulbecco Modifiye Eagles Ortamında (DMEM, Gibco) 106 hücre/ml hücre yoğunluğunda 25 $cm^{2'}$ lik şişelerde 2 mM L-glutamin (Sigma), 100 IU/ml penisilin ve

streptomisin eklendi. Daha sonra 37˚C'de 5% CO_2 içeren nemli bir atmosferde İnkübe edildi. Ortam 2 günde bir değiştirildi ve hücre kültürleri haftada iki kez bölündü. Konfluansın yaklaşık 80%' indeki hücreler, tripsinize edildi (tripsin-EDTA, Gibco), yıkandı ve hücre canlılığı açısından değerlendirildi. Kültür ortamı, gece boyunca iyileştikten sonra yenisiyle değiştirildi. MTT deneyleri 24 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. CCD-18co hücreleri (kuyucuk başına yaklaşık 10^4 hücre), 2 saat boyunca UV ile sterilize edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, ortamı değiştirmek için kuyucuk başına 500 µL DMSO (dimetil sülfoksit) kullanılmıştır. Plaka daha sonra serin, karanlık bir odada bir karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Daha sonra, 550 nm dalga boyunda bir mikroplak spektrofotometre (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader) kullanılarak ölçülmüştür. Tüm MTT deneyleri üç kez tekrarlandı. Her işlemden sonra morfolojik incelemeler yapılmıştır.

Hücre ortamı Floresan boyama ile 7 günlük hücre deneyi tamamlandıktan sonra 4 nM DIOC6 (3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür) ve 2 mg/mL propidyum iyodür (PI) içerecek şekilde değiştirildi. Sonuç olarak, boyama ölü hücreleri ve mitokondriyi görünür hale getirdi. Ölü hücreler PI boyası ile boyanarak, hücrelerin yapısındaki düşük konsantrasyonlu mitokondriler ise DIOC6 boyası ile tespit edildi. Hücreler, her boyamadan önce 15 dk süreyle inkübe edildi ve görüntüler, floresan hücre görüntüleyici (BIORAD) cihazı kullanılarak alındı.

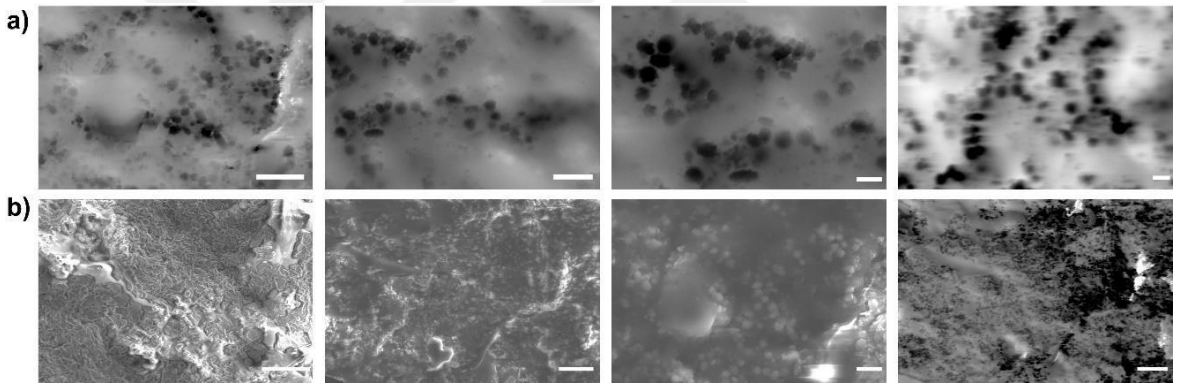
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1.Morfolojik karakterizasyon

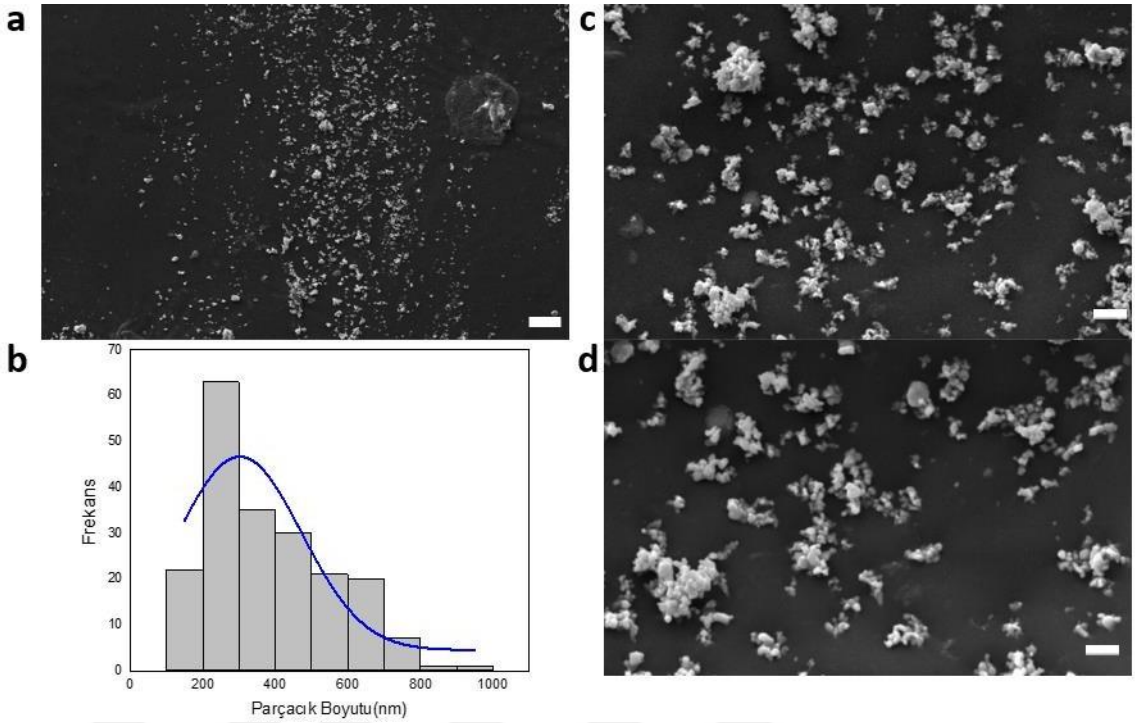
Morfolojik Analiz, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) altında gerçekleştirilmiş olup elde edilen iskelelerin görüntüleri incelenmiştir. Üretilen nanopartikül yapıların parçacık boyutları doku mühendisliği açısından oldukça önemlidir çünkü bu boyutlar, parçacıkların hücrelere girdiğinde ne kadar etkili olacağını belirler. Örneğin, çok küçük nanoparçacıklar hücrelerin içine girerek hücrenin işlevini bozabilirken, çok büyük nanoparçacıklar ise hücrelere giremeyebilir. Ayrıca, nanoparçacıkların boyutları aynı zamanda doku mühendisliği için kullanılan malzemenin gözenek boyutlarını da etkiler. Bu gözenek boyutları, hücrelerin besin taşınmasını sağlamak için uygun bir aralıkta olmalıdır. Ek olarak, gözenekler hücrelerin kararsız bir ortama yeni doku oluşumunu kontrol etmelerini

sağlamaktadır. Bu görüntüler ile nanopartiküllerin hizalanması, manyetik alan etkisi ile yönlenen nanopartiküllerin pozisyonları incelenmiştir. Nanopartiküllerin manyetik özelliklerini iskele içinde sürdürdüğünü ve yönlenmekte olduğu da incelenmiştir.

Görüntüler 50X ve 100X büyütmede alınmıştır ve yapıların pürüzsüz olduğu görülmektedir. SEM görüntülerinde hem hücrelerin büyümesi, çoğalması ve yapışması incelenmiştir. Manyetik alan ile yönlenen nanopartiküllerin hizalanması SEM ve AFM görüntüleri ile kanıtlanmıştır. Bu yönlenmiş yapıların hücre canlılığı üzerindeki etkisi görüntülerle desteklenmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin boyutları da iskelelerin gözenekleri SEM görüntüleme ile desteklenmiştir. **Şekil 3.1**, C-2 iskelesini ve manyetik alan etkisinde nanopartiküllerin yönlenmeye başladığı görülmüştür. Yönlenmenin belli bir yöne doğru olduğu ve sıralanması, SEM analizi ile tespit edilmiştir. Bu analiz sonucunda nanopartiküllerin manyetik özelliklerini iskele içinde sürdürdüğü ve tepki göstererek, yönlendiğini gözlemlenmiştir.

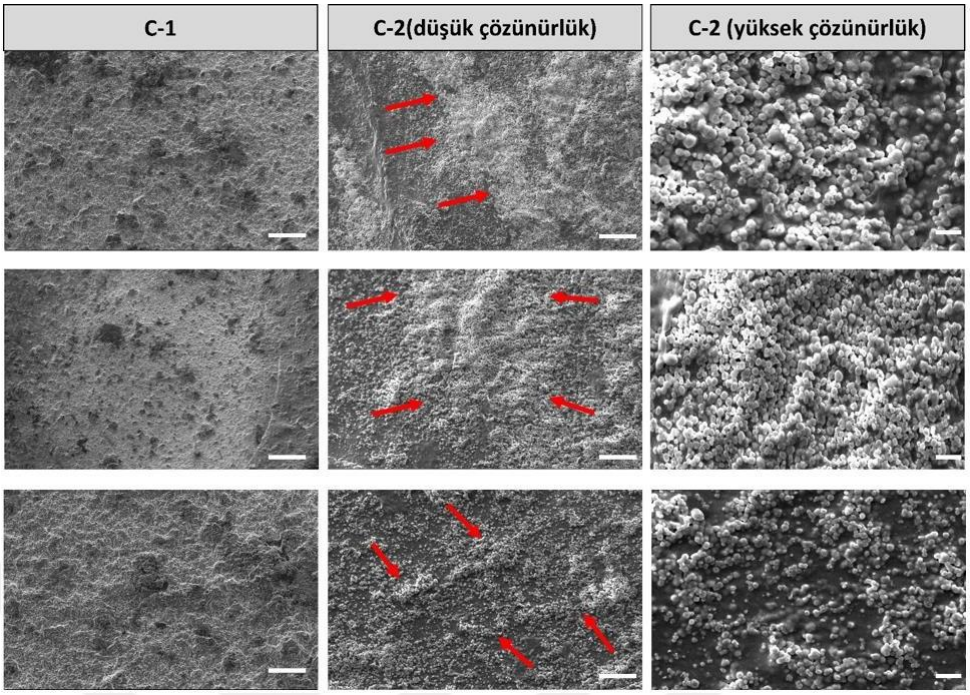


Şekil 3.1. C-2 grubunun SEM görüntüleri; hizalanmış nanopartikül(a) ve iskele(b) yüzeylerinin yüksek ve düşük çözünürlüklü görüntüleri

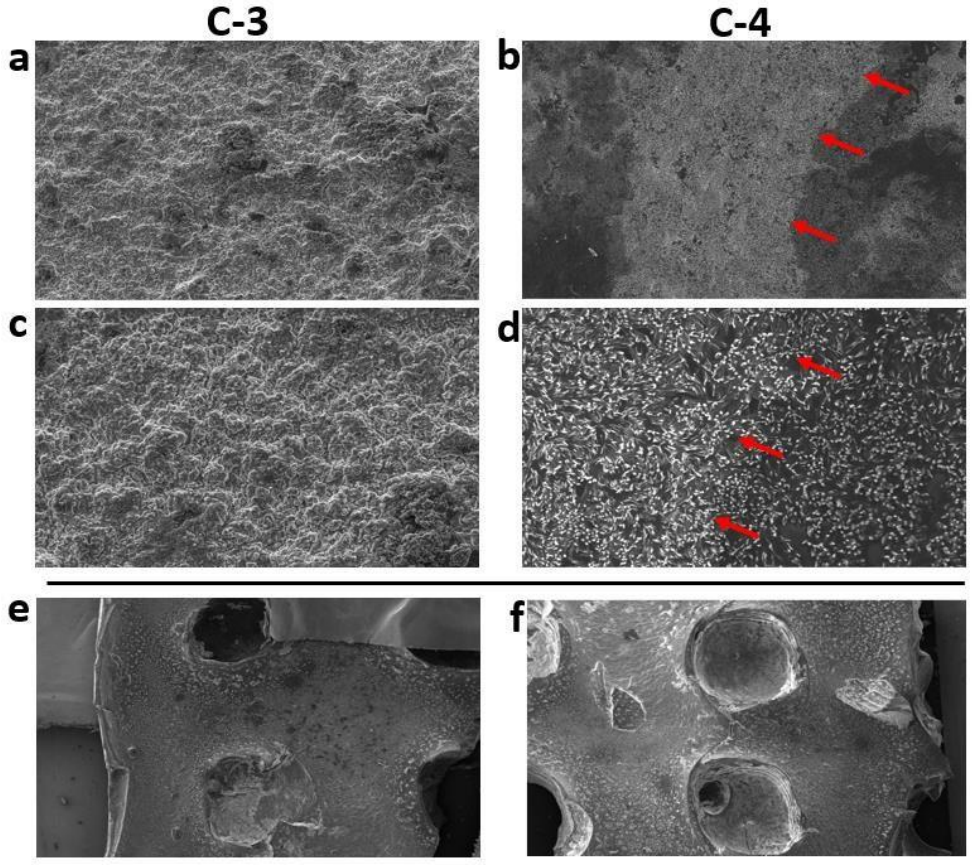


Şekil 3.2. Demir oksit nanopartiküllerin toz halinde SEM görüntüleri (a, c, d), nanopartiküllerin boyutlarının histogram grafiği (b)

Demir oksit nanopartiküllerin parçacık boyutlarını analiz etmek için SEM görüntüleri kullanıldı (**şekil 3.2).** Bu görüntülerde parçacıkları nano boyutta olduğunu ve boyut dağılımının histogram grafiğine (**Şekil 3.2 (b)**) göre 100-1000nm arası partiküllerin olduğunu, özellikle 200-300nm arasında yoğunlaştığını ve sıklaştığını görülmektedir. **Şekil 3.3**, C-1 ve C-2 ve iskelelerin farklı bir teknik ile SEM görüntülerin incelemesi yapılmıştır. C-2 iskelelerinde düşük ve yüksek çözünürlük görüntülerinde kırmızı oklar ile gösterilen alanlarda nanopartiküllerin hizalanmaların ve topaklaşmaların olduğu görülmüştür. **Şekil 3.4 (a-d)**, C-3 ve C-4 iskeleleri için SEM görüntülerini göstermektedir. C-4 iskelesindeki yönlenmeler kırmızı ok ile gösterilmiştir. C-4 iskelesindeki nanoparçacıkların manyetik alan altında şekil değiştirdiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin, manyetik şekil hafızası (MSM) etkisi olarak bilinir. Bu etki, nanoparçacıklardaki demir atomlarının manyeto kristal anizotropisinden kaynaklanmaktadır (Gabdulin ve ark., 2015). Nanopartiküllere bir manyetik alan uygulandığında, demir atomlarının yönelimi değişir ve bu da nanopartiküllerin şeklinde bir değişikliğe yol açar. C-4 iskelelerin porlu yapılarının SEM görüntüsü **şekil 3.4 (e-f)**' de görülmektedir. İskelelerin kalın olmasından dolayı kuruduğunda kırılmaya ve porlu yapılarının bozulduğu görülmektedir.



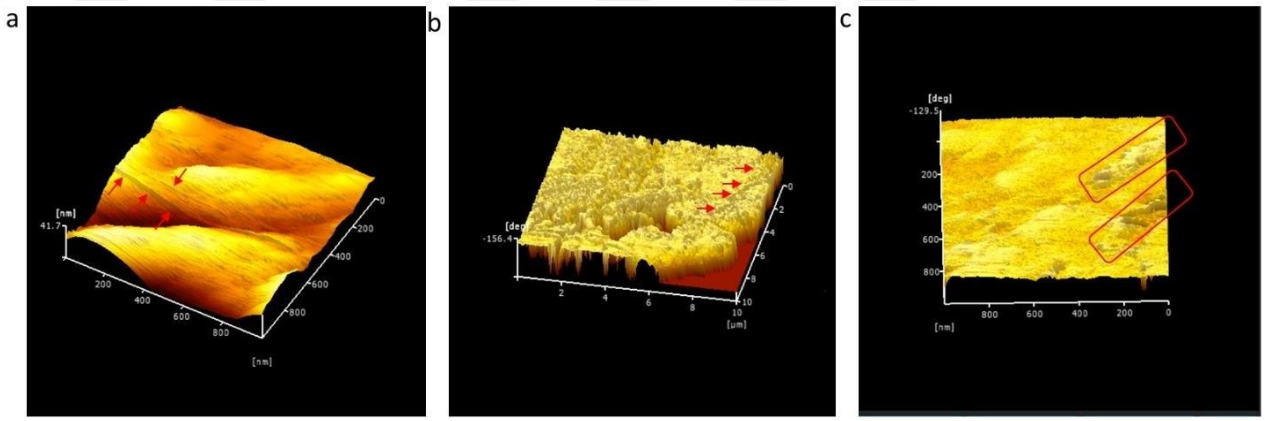
Şekil 3.3. C-1, C-2 iskelelerin SEM görüntüleri ve yönlendirilmiş C-2 iskelelerin yüksek çözünürlüklü görüntüleri



Şekil 3.4. C-3 iskelesinin (a, c), C-4 iskelelerin yönlendirilmiş hallerinin ve C-4 iskelelerin (e, f) kuru haldeki porlu SEM görüntüleri

3.1.1. AFM analizi

AFM, nanopartikül yüklü SilkMA tabanlı yönlendirilmiş iskelenin yüzey topografyasını belirlemek için uygulandı. Nanopartiküllerin iskele yüzeyinde yönlenmesinin gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için AFM testi yapıldı. **Şekil 3.5**, C-2 grubun yüzeyindeki hizalanmalar kırmızı ok ile gösterilmiştir. Bu ölçümlerde 10x10µm ve 1x1µm alanlarda incelemeler yapılmıştır. AFM görüntüsündeki farklı çizgiler boyunca gözlenen yüksekliklerin 4 µm değerinde olduğu gözlemlenmiştir. **Şekil 3.5 (a)**, AFM görüntüsünde nanopartikülleri dalgasal bir düzlemde sıralı bir şekilde devam ettiği görülmüştür. **Şekil 3.5 (b, c)**, dinamik modül (DFM) ile yapılan görüntülemede sağ taraflarında bir iskele yüzeyinde bir hizalanmanın olduğu tespit edilmiştir.

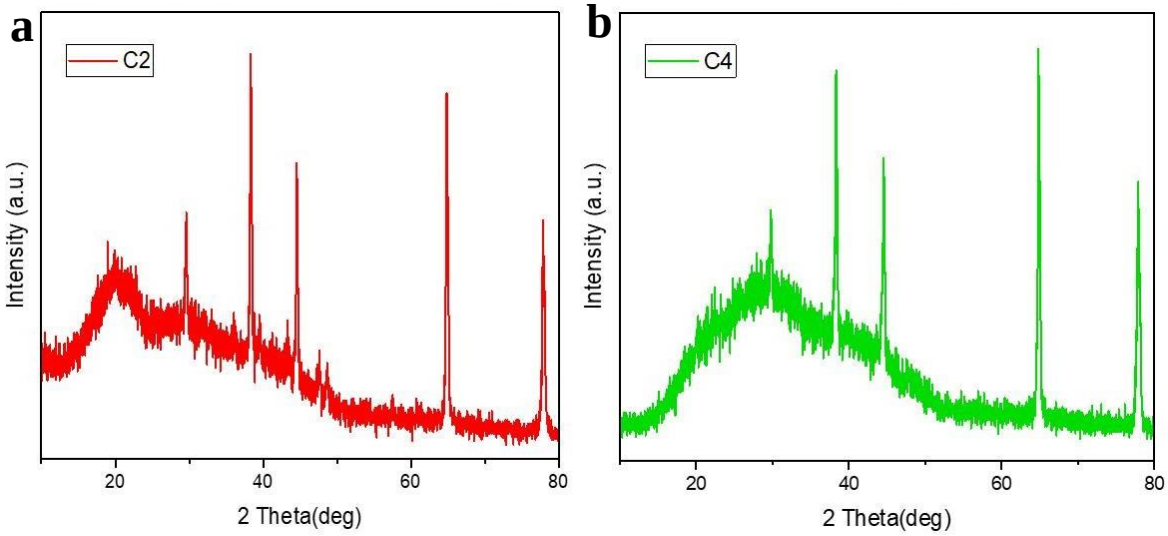


Şekil 3.5. İskelelerin Yüzey topografya görüntüleri; AFM(a), DFM(b,c).

3.1.2. XRD analizi

İskelelerin kristalliğini belirlemek için manyetik alan ile yönlendirilmiş demir oksit nanopartikül yüklü SilkMA ve KerMA tabanlı C-2 ve C-4 iskeleleri için ayrı ayrı XRD analizi yapılmıştır. Daha önceki çalışmaya göre (Liu ve ark., 2017), 20° civarındaki diğer tepe noktası ise β-kristal yapısını ilişkilendirmiştir. **Şekil 3.6 (b)**, demir oksit nanopartiküllerine ait 2theta değerlerini 30°, 39°,43°, 62° ve 74° olarak sırasıyla göstermiştir. **Şekil 3.6 (a),** diğer grafiğe göre tek farkı 20° de geniş bir tepe noktası vermesidir. Bu tepe noktası β-kristal yapıları ile ilişkilendirilmektedir, C-2 iskelesinde yüksek konsantrasyonlu SilkMA' dan dolayı bu tepe noktanın açık bir şekilde ortaya çıkmasının sebebi olabilir. Diğer pikler, demir oksit nanopartiküllerim kristal kübik yapılarından dolayı ortaya çıkmıştır çünkü bu aralıklarda kullanılan polimerlerin kristal

fraksiyonları bulunmamaktadır. Literatürde demir oksit nanopartikülleri için görülen piklere ve kristal düzlemlere yakındır ama 78° pik, saf demir oksit nanopartikül ile yapılan XRD çalışmalarında görülmemiştir (Balamurugan ve ark., 2014; LaGrow ve ark., 2019). XRD modelinde 2-teta'da 78° bir tepe noktasının mevcut olması mümkündür, ancak bu, nanoparçacıkların spesifik kristal yapısına ve yönelimine bağlı olarak değişebileceğini söyleyebiliriz. XRD modellerinin demir oksit nanoparçacıklarının boyutuna, şekline, kristalliğine ve bileşimine duyarlı olduğunu not etmek de önemlidir, bu nedenle hassas XRD sonuçları elde etmek için numuneleri dikkatli bir şekilde hazırlaması ve analiz edilmesi için önemlidir.

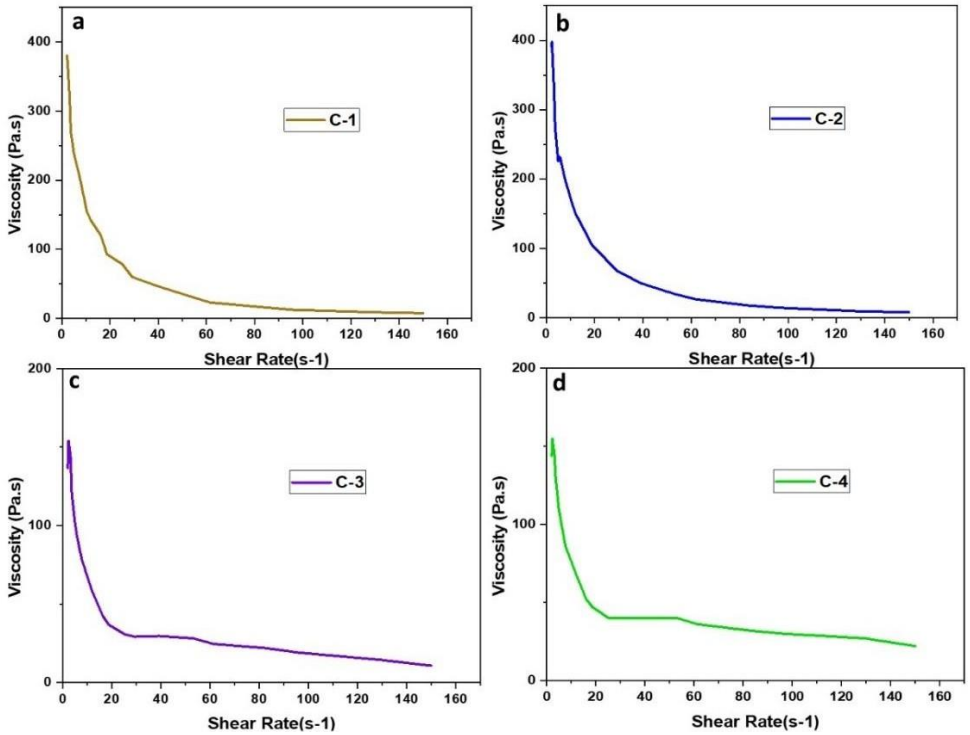


Şekil 3.6. Np yüklü iskelelerin XRD analizi; C-2 (a) ve C-4 (b) iskelelerin XRD analizi

3.2. Reolojik karakterizasyonu

Baskı işlemi sırasında iskelelerin farklı kayma hızlarının viskozitesi üzerindeki etkisi 25 mm paralel plaka kullanılarak 0 ile 150 kayma hızı arasında 25 °C' de incelenmiştir. Deneyler yapılmadan önce numunelerin 3 dk denge sıcaklığına ulaşmasına izin verilmiştir. **Şekil 3.7**' de gösterildiği gibi elde edilen reolojik veriler, kayma hızının artmasıyla viskozitenin azaldığını gösterir ve bu da kayma incelmesi davranışına atfedilmektedir. Her grup için ayrı ayrı viskozite- kayma hızı grafiği çıkarılmıştır. C-1 grubu (**şekil 3.7 (a)**), C-2 grubu (**şekil 3.7 (b)**), C-3 grubu (**şekil 3.7 (c)**), C-4 grubu (**şekil 3.7 (d)**) farklı kayma hızlarında viskozite davranışlarında farklılık görülmüştür, özellikle SilkMA konsantrasyonu artışıyla başlangıç kayma hızında 400 Pa.s ve düşük SilkMA konsantrasyonunda yine

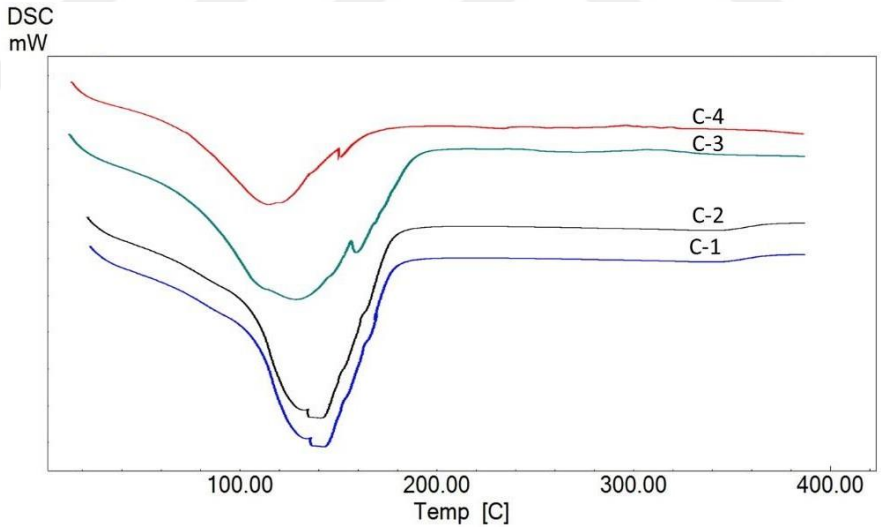
başlangıç kayma hızında 150 Pa.s civarı bir değer gözlemlenmiştir. SilkMA' nın moleküller arası bağlarının daha güçlü, rijit olması ve iskelenin çapraz bağlama kapasitesini arttırabildiği için SilkMA konsantrasyonu artan iskelelerde yüksek viskozite değerlerine sahip olması beklenmektedir. Viskozite değerlerinin diğer testler ile de uyumlu olduğu, yüksek viskoziteli grupların daha düşük geçirgenliğe sahip olduğu şişme testi ile anlaşılmıştır. Viskoz yapıların malzemenin kristal yapısındaki dinamik hareketleri minimum seviyeye indirme eğilimindedir, bu yüzden düşük viskoziteli KerMA tabanlı malzemeler daha yüksek geçirgenlik özelliği göstermiştir. Polimerlerin veya kompozit malzemelerin viskozitesi, kullanıldığı 3B teknolojiye göre dezavantaj sağlayabilir. Örneğin, Inkjet yazıcılarda yüksek viskoziteli malzemelerin kullanılması kanallar ve nozul içinde tıkanmalara, böylelikle baskı kabiliyetini azaltarak iskele oluşumunu engellemektedir (Singh ve ark., 2010). SLA yazıcılarda viskozite ile ilgili diğer teknolojilerdeki kadar sıkıntı yaşanmamaktadır ama bu çalışmada yüksek viskoziteli yapıların aşırı yapışkan özelliğinden dolayı üst tablaya yapışmasıyla iskele oluşumunu engellediği görülmüştür. Bu yüzden dolayı jel kıvamında solüsyonların UV ile sertleşip 3B hassas bir yapı oluşturması zordur. Aşağıda belirtilen viskozite ölçümleri, yapıları başarılı bir şekilde basmak için en uygun iskelenin belirlenmesine yardımcı olmuştur. Ayrıca, hassas bir baskının yanı sıra hücrelere uygulanan ve hücre canlılığını etkileyecek minimum kesme kuvveti sağlamak için de önemlidir.



Şekil 3.7. İskelelerin farklı kayma hızlarında viskozite değerleri: C-1 (a),C-2 (b), C-3 (c), C-4 (d)

3.3.Termal karakterizasyon

Tüm SilkMA/KerMA iskele gruplarının camsı geçiş sıcaklığı DSC analizi ile belirlenmiştir, Ayrıca farklı polimer yapıların iskelelerin kristal yapıların nasıl etkilediği tartışılmıştır. DSC analizi, oda sıcaklığında yapılmıştır ve 10°C ile 400°C Proses sıcaklığında test edilmiştir. **Şekil 3.8**, tüm grupların belli bir aralıkta (135°C -160°C) Tg değeri verdiğini göstermiştir. T_g değerlerinin birbirlerine yakın olması iskelelerin homojen bir şekilde karışıp homojen yapı sergilemesinin ve iskelelerin kristal yapılarındaki benzerlik yakın bir termal özellik göstereceğinin işaretidir. C-1 (165°C) ve C-2 (162°C) gruplarında daha yüksek T_g değerleri elde edilmiştir. SilkMA konsantrasyonun artması kristal yapıyı geliştirdiği söylenebilir. Nanopartikül ilave edilmiş yapıların ihmal edilebilecek kadar Tg değerinde azalış gösterdiği görülmüştür. C-3 (135°C) ve C-4 (140° C) daha düşük değerlerde T_g değeri göstermiştir ve diğer gruplara göre kristal yapısı daha az olduğu belirlenmiştir. Termal analizde erime sıcaklığı tüm iskeleler de 400° C' ye kadar gözlemlenmemiştir.

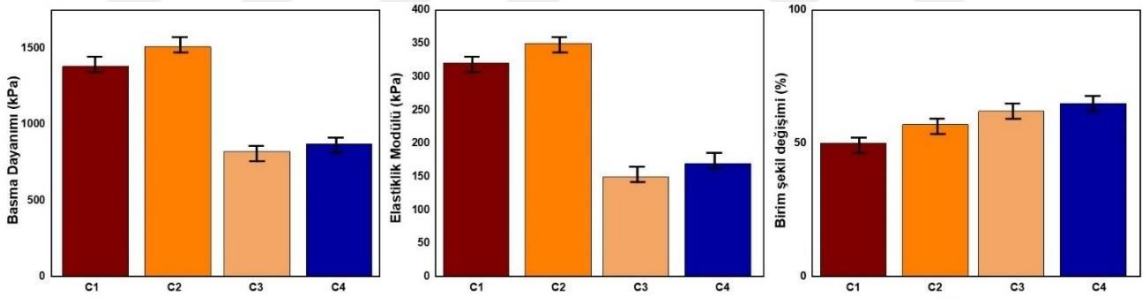


Şekil 3.8. Doku mühendisliği için üretilen iskelelerin DSC analizi

3.4.Mekanik karakterizasyon

Mekanik testler için 3B SLA yazıcısıyla çapraz bağlanan SilkMA/KerMA bileşenli 4 farklı konsantrasyonda elde edilen iskelelerin basma ve uzama için gerilim-gerinim eğrileri elde ederek SilkMA/KerMA iskelelerin mekanik testi yapılmıştır. SilkMA konsantrasyonu yüksek olan iskelelerde (C-3, C-4) basma dayanımının arttığı görülmüştür (**Şekil 3.9 (a)**).

C-4 iskelesinde en yüksek basma dayanımı (1476 kPa) elde edilmiştir. C-1 iskelesi ise C-2 iskelesine yakın bir basma dayanımı (1387 kPa) göstermiştir. C-1 ve C-2 arasındaki basma dayanımı farkının demir oksit parçacıklarından kaynaklandığını ve dayanım konusunda bu parçacıkların olumlu etki gösterdiği görülebilmektedir. SilkMA oranını azalttığımızda ve KerMA oranını arttırdığımızda, mekanik dayanımın 1000 kPa altına düştüğü gözlemlenmiştir. C-1 ve C-2 grupları ayrıca diğer gruplara göre yüksek elastiklik modülü göstermiştir (**Şekil 3.9 (b)**). SilkMA tabanlı iskelelerin KerMA tabanlı iskelelere göre yaklaşık 2 kat daha fazla basma dayanımı ve elastik modülü gösterdiği ve demir oksit nanopartikül ilavesi ile her iki grup içinde mekanik özellik olarak artış gösterdiği sonucunu çıkartabiliriz. Benzer bulgular, literatürde hidrojeller üzerinde SilkMA malzemesinin basma dayanımını, elastik modülünü ve uzamasını artırdığı gözlemlenmiştir (Kim ve ark., 2018). Birim şekil değişimi olarak, KerMA tabanlı grupların (C-3 ve C-4) birim şekil değimi katsayısının arttırdığı ama bu farkın yüksek olmadığı gözlemlenmiştir (**Şekil 3.9 (c)**). KerMA ile yapılan çalışmalarda basma dayanımının 10-30 kPa arası değiştiği görülmüştür (Yu ve ark., 2022), bizim sonuçlar ile karşılaştırıldığında KerMA tabanlı iskelelerin SilkMA birleşimi ile yaklaşık 15-20 kat daha arttırdığı tespit edilmiştir.



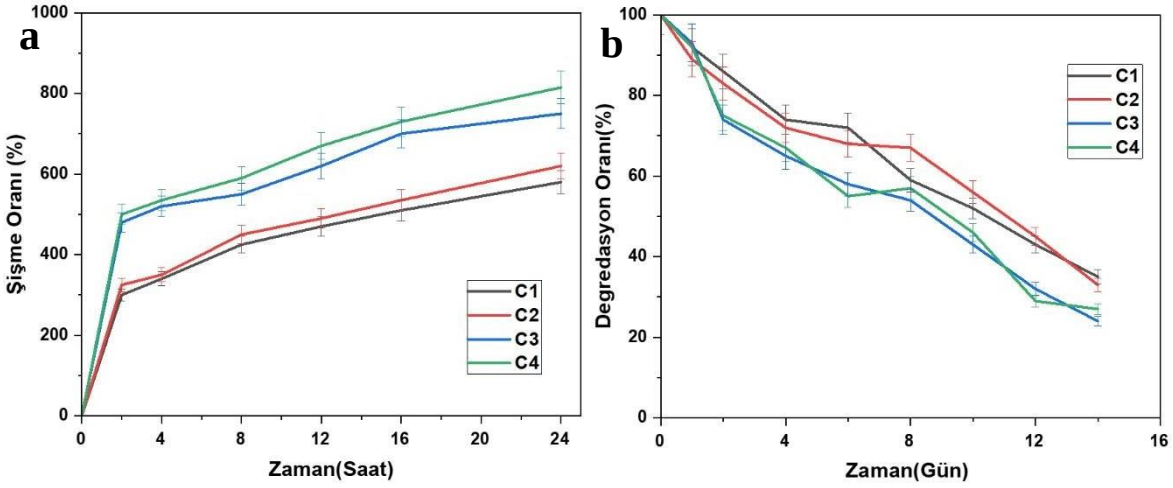
Şekil 3.9. İskelelerin mekanik karakteristiğini belirlemek için basma testi sonuçları; grupların basma dayanımı (a), elastiklik modülü değerleri(b), birim şekil değişimi (c).

3.5.Şişme ve degradasyon karakterizasyonu

Üretilen iskelelerin şişme derecesi veya dengeye ulaşan şişme oranları, temel alınan gravimetrik yöntem ile oda sıcaklığında ölçülmüştür. Ölçümler 24 saate kadar yapılmıştır. 4 farklı grup içinde şişme özellikler gözlemlenmiştir. Kurutulmuş iskeleler, PBS' ye batırıldıktan sonra hızla şiştiği görülmüştür. İlk 2 saat içinde, tüm iskelelerin %200 üstünde

şişme özelliği gösterdiği, şişme kapasitelerinin yüksek ve kontrol edilebilir olduğu görülmüştür **(Şekil 3.10 (a)).** İskeleler 2 saatten sonra dengeli bir şekilde artış göstererek, 24 saatte dengeye ulaşmaya başlamıştır. KerMA tabanlı grupların, diğer gruplara göre daha yüksek şişme kapasitesi gösterdiği ve %800 şişme oranına yaklaştığı gözlemlenmiştir. SilkMA konsantrasyonu arttıkça iskelelerin şişme kapasitelerinin azaldığı, iskelelerin suyu çekmesi ve hacimlerinin genişlemesinin kısıtlandığı tespit edilmiştir. Bunun sebebi mekanik dayanımın yüksek olmasıyla ilişkilendirilebilir. Demir oksit nanopartiküllerin şişmeyi olumlu yönde etkilediği ve bunun hidrofilik karakteristiğinden kaynaklandığını düşünebiliriz. Polimer türevli iskelelerin şişme kapasitesi, bölgesel gevşemeler veya esnemeler ile alakalı olduğu söyleyebiliriz çünkü KerMA' nın düşük viskoelastik davranışı iskelenin daha fazla su tutma kapasitesini arttırmış olabilir. KerMA kompozit yapıların şişme kapasitelerinin arttırdığını ve geliştirdiğiyle ilgili çalışmalar yapılmıştır (Yu ve ark., 2022).

Doku mühendisliği için üretilen iskeleleri tasarlarken göz önünde bulundurulması gereken bir diğer temel özellik de bozulma oranlarıdır. Yapı iskelesi aynı anda doğal hücrelerin yüzeyini ve kütlesini doldurmasına ve biyoaktif moleküllerin kontrollü salımı için uygun bir hızda bozunma veya müteakip doğal doku yenilenmesine izin verecek kadar kararlı olmalıdır. Genel olarak, hidrojel yapı iskelelerinin mekanik sertliği, her iki özellik de genel çapraz bağlanma yoğunluğu ile doğrusal bir korelasyon gösterdiğinden, bozunma oranlarıyla orantılıdır (Gao ve ark., 2018). Test edilen tüm yapı iskelelerinin bozunma hızları, 37°C' de PBS' de inkübe edildiğinde zaman içinde ağırlıklarındaki değişiklikler ölçülerek izlenmiştir. Çeşitli formülasyonlar arasında bozulma oranlarında önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. **Şekil 3.10 (b)**, C-1 ve C-2 daha geç bozulmaya başlandığı görülmüştür ama düşük konsantrasyonla elde edilen değerler arasında çok büyük bir fark gözlenmemiştir. Bunun sebebinin mekanik dayanımlarının yüksek olduğundan dolayı çapraz bağlanmış zincirlerin iskeleleri kolay bir şekilde bozunma olmasına izin vermediğini söyleyebiliriz. Kuru iskelelerin, inkübasyon süreleri boyunca ağırlıkların azaldığı ve 14 gün sonuna kadar iskelelerin tamamen bozunma olmadığı gözlemlenmiştir. 10. günden sonra iskeleler ilk ağırlıklarının %65 kadarını kaybetmiştir. İskelelerin 14 günden de daha fazla dayanma potansiyeline sahip olması doku mühendisliğinde yaraların iyileşme aşamasından biri olan yeniden modelleme (21 gün) kısmı (Hadjidakis ve ark., 2006) için iyi bir aday olabilir.

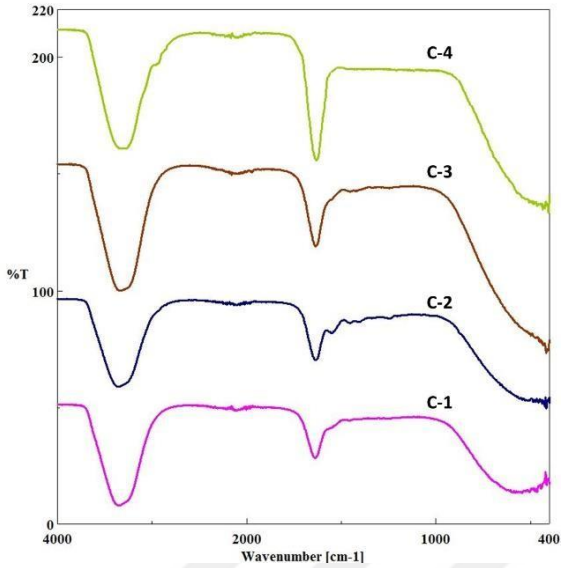


Şekil 3.10. İskelelerin belirli zaman aralığında şişme oranları (a) ve degradasyon oranları (b).

3.10. Kimyasal karakterizasyon

İskelelerin kimyasal karakterizasyonu FT-IR testi ile incelenmiştir. KerMA, SilkMA ve demir oksit nanopartiküllerin birleşimi ile oluşan iskelelerin FT-IR testleri **Şekil 3.11'**de verilmiştir. Tüm iskelelerin spektrumlarında benzer pikler görülmüştür, bununla kimyasal olarak 3 farklı malzemenin 4 grup için homojen bir şekilde dağıldığını sonucunu çıkarabiliriz. 3321 cm^{-1}de geniş band, amid grubunun varlığını gösteren ve Amid A olarak adlandırılan N-H bağına atfedilmektedir. 1633 cm^{-1} de Amid I, C-N gerilme ve 1480–1580 cm^{-1} pikinde N-H bükülme (Amid II), C-N ve C-O gerilmeleri görülmüştür. Belirgin Amid bantlarının pozisyonları modifikasyonla büyük bir değişime uğramadığı ve sadece Amid I bandının dalga boyunda kayma olduğu görülmüştür. Metakrilatlanmanın varlığı için genel olarak, 1630-1680 cm^{-1} aralıklarında metakrilat vinil grubunun olduğu literatürde bahsedilmektedir. Ancak, bu tepe noktası KerMA' larda güçlü Amid I absorbansına denk geldiği için izole olarak görülmez ve Amid I bandında kaymalara sebep olabilir. Daha da önemlisi, Amid I bölgesi ikincil yapıya karşı çok hassastır ve tirozin yan zincirleri, rastgele sarmal, dönüşler, α-helis ve β-kristal yapılarının göstergesi olarak gizli bileşen bantlarına ayrılabilir (Wei ve ark, 2012; Chen ve ark., 2001). Ayrıca, SilkMA/KerMA gruplarında C=C (970 cm^{-1}) bağları küçük bir pik görülmüştür. Bu band 940-970 cm^{-1}civarında görülen C=C bükülme absorpsiyonda zayıf bir tepe noktası gösterdiği için, literatürdeki araştırmalara göre geleneksel yöntemlerle metakrilatlama reaksiyonunu doğrulayabilir. Bu bant, demir oksit nanopartiküllerinden dolayı kaymış olabilir çünkü bir çalışmada (Hwang ve ark., 2014)

991cm^{-1} pik demir oksitin nitrat gruplarından kaynaklandığını belirtmiştir.



Şekil 3.11. C-1, C-2, C-3 ve C-4 iskele yapıları için FT-IR grafiği

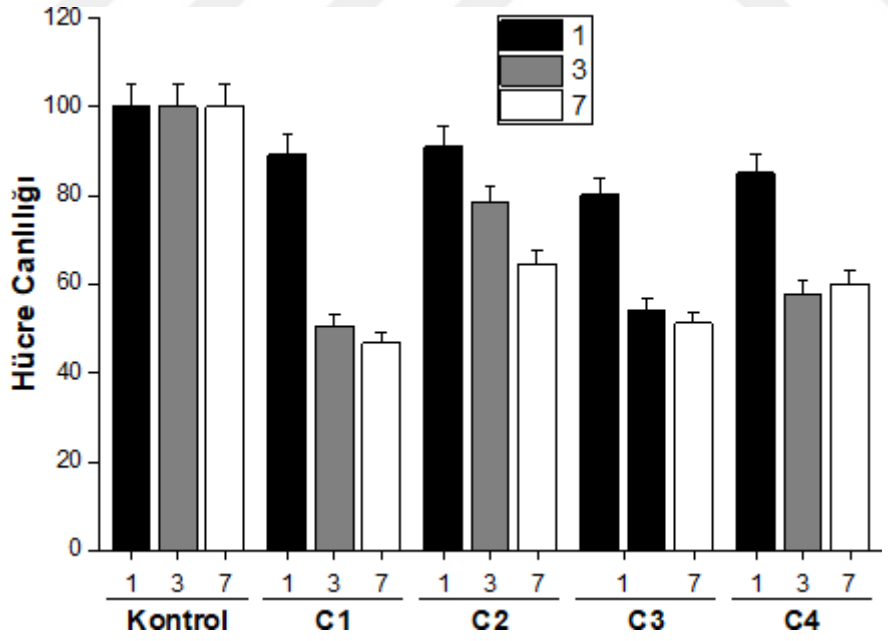
3.11. Hücre testi karakterizasyonu

MTT analizi sonucunda iskelelerin birinci gününde en yüksek hücre canlılığı gözlenmiştir (**Şekil 3.12**). Sitotoksisite testlerinde ilk gün sonuçlarına göre üretilen iskelelerin toksik oldukları görülmemiştir. Sonuçlarda 1. gün sonuçları 80%'in üzerindeyken 7. gün sonunda hücre canlılık değerleri azalmaya başlamıştır. Bunun sebebinin iskelelerin kalınlığının fiziksel engel oluşturduğundan dolayı hücrelerin canlılığını etkilediği düşünülmektedir. Yönlendirilmiş C-4 ve C-2 gruplarının MTT testi sonucunda tüm günler için yönlendirilmemiş olanlara göre daha fazla hücreyi çoğaltıcı etkisi olduğu görülmüştür. SilkMA tabanlı yönlendirilmiş iskelede 3.gün de diğer gruplar arasında en yüksek hücre canlılığı elde edilmiştir. KerMA tabanlı C-3 iskelesi canlılık olarak 1. günde en düşük canlılık değerini göstermiştir. C-1 iskelesi 3. ve 7. günde gruplar arasında en az canlılık değeri göstermiştir.

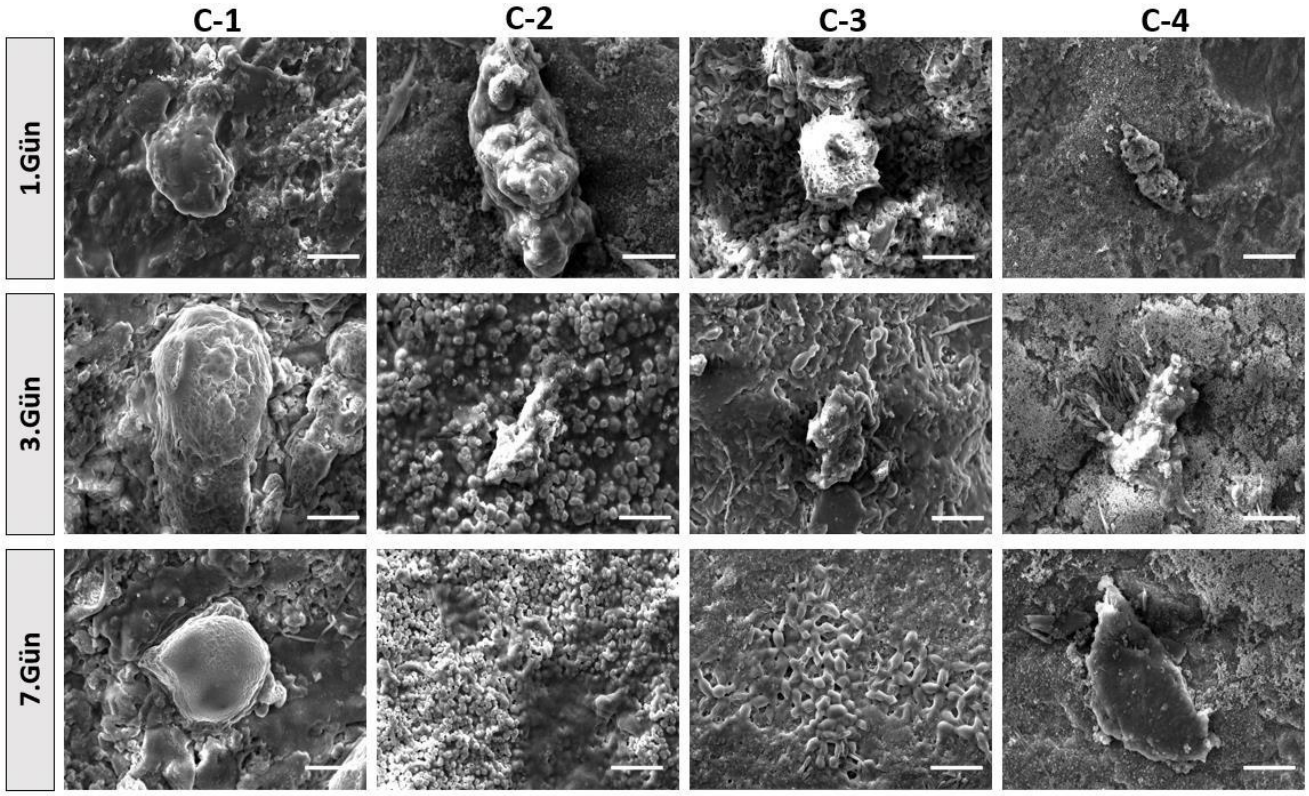
İskelelerin morfolojisi ve boyutları ve hücrelerle etkileşimleri hakkında bilgi edinmek için SEM ve DAPI analizi yapılmıştır. Bu görüntüler ile iskelelerin boyut ve şeklini, ayrıca hücreler tarafından içselleştirilme derecesini incelememizi sağlamıştır.

SEM (**şekil 3.13**) ve DAPI (**şekil 3.14**) görüntüleri ile hücrelerin kümeleşip, çoğaldığı görülmüştür. SEM görüntülerine göre tüm iskelelerde fibroblast hücreler görülmüştür ve gün sayısı arttıkça hücreler görülmeye devam etmiştir. C-2 iskelesi için 3 ve 7 günlerde daha belirgin olarak küresel yapılı nanoparçacıkların üzerinde hücrelerin yapıştığı ve yayıldığı

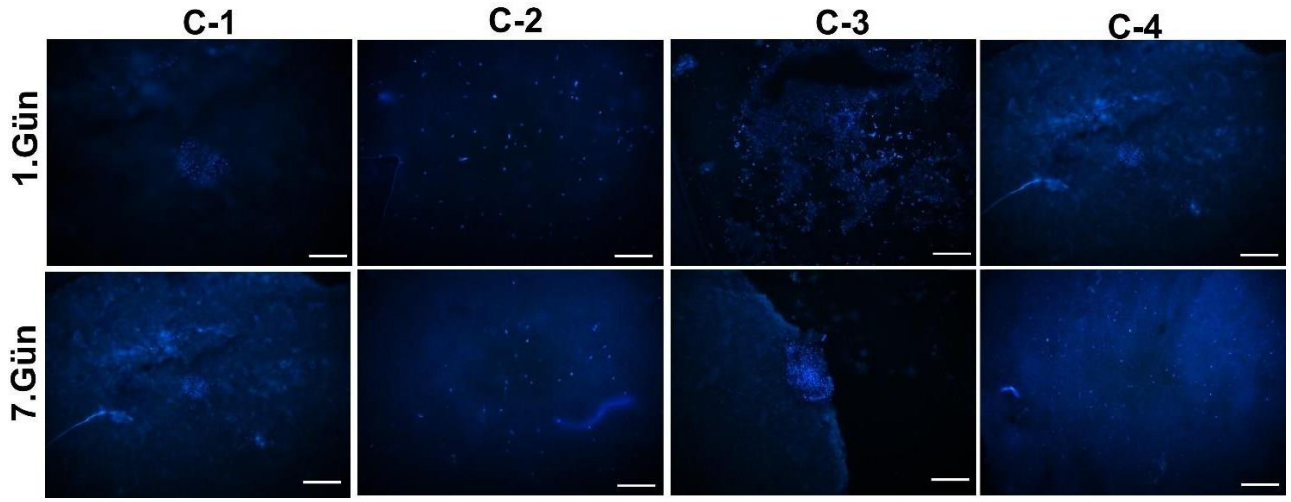
görülmektedir. Bu sonuç ile demir oksit nanopartiküllerin üzerinde hücrelerin yapıştığını ve çoğaldığını söyleyebiliriz. C-3 iskelesinin 7. Gün SEM görüntüsünde bacillus tipinde bir bakteri kolonizasyonuna yakın bir yapı görülmektedir ama bu yapı 20-30 µm uzunluğunda olduğu yani bakteri veya kontaminasyondan dolayı olamayacağını ve fiksasyon sonrası fibroblast hücrelerin şekil ve boyut değiştirdiğini söyleyebiliriz. C-4 SEM görüntülerinde, hücrelerin nanoparçacıklar üstünde yapıştığı ve çoğaldığı C-2 iskelesindeki gibi görülmektedir ama C-4 iskelesindeki nanoparçacıklar C-2'ye göre yapı olarak farklıdır.C-4 iskelesindeki nanoparçacıklar daha çok nanorod yapılara benzemektedir ve bunun sebebinin manyetik alan ile yönlenme sırasında şekil ve boyut değiştirebileceği olasılığı vardır. DAPI görüntülerinde en fazla hücre C-2 iskelesinde görülmüştür, görüntüler yüksek çözünürlük ile çekilmemiştir, bu yüzden net bir şekilde hücre kümeleşmesi ve çoğalması hakkında kesin bir açıklama yapmak mümkün değildir ama hücrelerin özellikle C-2 iskelelerinde tutunduğunu ve bu iskeleyi diğerlerine göre daha çok sevdiğini söyleyebiliriz. Literatürde yapılan çalışmalarda silk malzemelerin *in vivo* ortamlarda Tip I Kolajene göre daha düşük inflamatuar görülmüştür ve FDA tarafından silk malzemelerin medikal kullanımına izin verilmiştir (Rockwood ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2017).



Şekil 3.12. İskelelerin MTT grafiği



Şekil 3.13. 1, 3 ve 7 gün için C-1, C-2, C-3 ve C-4 iskelelerin hücreli SEM görüntüleri



Şekil 3.14. C-1, C-2, C-3 ve C-4 iskelelerin DAPI görüntüleri

4. SONUÇLAR

Çok yönlü biyomalzemelerin kullanımı, manyetik alanlar altında demir oksit nanoparçacıklarının yönlendirilerek, yapıların iskelede 3B SLA yazıcı ile üretimi neticesinde doku mühendisliği için uygunluğu test edildi. Diğer taraftan, 15 mT ve 1 Hz manyetik alanın altında doku iskelenin içindeki homojen dağılmış nanoparçacıklar, steril ortamda tutarlı ve yönlü hareket ettirilip, nanoparçacıkların hizalanması SEM VE AFM görüntüleme yöntemleri ile incelendi. C-2 iskelelerinde Basma testi ile, SilkMA tabanlı iskelelerin 1500 kPa değerine yakın basma dayanımı elde edilmiştir. Yüksek basma dayanımı, doku mühendisliği uygulama alanlarında daha yüksek gerilmelere dayanabileceğini ve böylelikle gerilmelerden dolayı deforme olmadan iskele görevini görmeye devam edebileceğini göstermektedir. Birim şekil değişiminin bulgular sonucunda tüm iskeleler için 50% üzerinde olduğu görülmüştür, bu sayede taşıdığı yükü veya daha fazlasını tek bir yerde toplamamasını ve o bölgedeki fazla kuvveti yayabileceğini göstermektedir. Yönlendirilmiş yapıların mekanik özelliği üzerinde olumlu etkisi gözlemlenmiştir. SilkMA tabanlı iskelelerin bozunma süresi 14 güne kadar devam etmesi sağlanmıştır. Doku mühendisliği için, iskelelerin bozunma da uzun süre boyunca kalması, hücrelerin ve dokuların büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan maddelerin sürekli olarak temin edilmesini sağlar. Ayrıca, hücrelerin ve dokuların yerleştiği malzemenin yavaş yavaş ortadan kalkması, hücrelerin ve dokuların yerleştiği yerde yavaş yavaş yerleşmelerini sağlar. Uzun süreli bozun, vücutta oluşabilecek inflamasyon veya enflamasyon riskini azaltabilir. 14 gün, bozunma süresi için kabul edilebilir bir süre olabilir. Ancak, doku mühendisliği uygulaması için optimal bozunma süresi farklılık gösterebilir ve uygulamanın hedeflenen dokudaki optimal bozunma süresi araştırmalar ile belirlenmelidir. Şişme özelliği bakımında tüm iskeleler 200% üstünde şişme karakteristiği ve KerMA tabanlı malzemeler için 800%'e yaklaşan şişme kapasitesi görülmüştür. Doku mühendisliğinde uygulamaları için şişme özelliği önemlidir çünkü hücrelerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan su ve oksijenin malzemenin içine girmesini ve hücrelerin yayılmasını sağlar. İskelelerin sitotoksisite testleri için ilk 24 saat içinde %80-90 arasında bir canlılık elde edilmiştir, sonrasında iskelelerin kalınlığından dolayı hücre canlılığında azalma görülmeye başlanmıştır. 7 gün boyunca iskeleler toksik etki göstermemiştir ve yönlendirilmiş malzemelerin hücre canlılığını arttırdığı görülmüştür. Hücrelerin iskeleler ile etkileşimi, yapışması ve iskele üzerinde çoğalması SEM ve DAPI analizleri ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu testler sonucunda

iskele üzerinde hücrelerin yapıştığı ve malzeme ile uyum sağladığı görülmüştür, ayrıca C-2 SilkMA tabanlı iskelede yönlenmiş nanopartikül üzerinde fibroblast hücrelerin tutunup, yayılmaya çalıştığı görülmüştür. Doku mühendisliği için manyetik demir oksit nanoparçacık yüklü iskeleler, manyetik alan ile doku yerleşimi ve hücrelerin yerleşim yerlerinin kontrolü için kullanılabilirler. Bu parçacıklar, yüksek çekim kuvvetleri oluşturan manyetik alanlara maruz bırakıldığında, hücreleri ve dokuları yönlendirebilir. Manyetik nanoparçacıklar, özellikle de demir oksit nanoparçacıklar ve birlikte kullanıldığı KerMA ve SilkMA iskeleler, doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir malzeme olarak kabul edilirler.

KAYNAKLAR

Bar-Cohen, Y. (2002). Electroactive polymers as artificial muscles: a review. *Journal of Spacecraft and Rockets*, *39*(6), 822-827.

Barone, P., Sanyal, B., & Picozzi, S. (2012). Multiferroics: theory, mechanisms, and materials. In *Science and Technology of Atomic, Molecular, Condensed Matter & Biological Systems* (Vol. 2, pp. 129-161).

Balamurugan, M., Saravanan, S., & Soga, T. (2014). Synthesis of iron oxide nanoparticles by using Eucalyptus globulus plant extract. *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, 12, 363-367.

Belda Marín, C., Fitzpatrick, V., Kaplan, D. L., Landoulsi, J., Guénin, E., & Egles, C. (2020). Silk polymers and nanoparticles: a powerful combination for the design of versatile biomaterials. *Frontiers in Chemistry*, *8*, 604398.

Bose, S., Vahabzadeh, S., & Bandyopadhyay, A. (2013). Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials today*, *16*(12), 496-504.

Babu, K. M. (2017). Silk from silkworms and spiders as high-performance fibers. In *Structure and Properties of High-Performance Fibers* (pp. 327-366). Woodhead Publishing.

Benton, J. A., DeForest, C. A., Vivekanandan, V., & Anseth, K. S. (2009). Photocrosslinking of gelatin macromers to synthesize porous hydrogels that promote valvular interstitial cell function.

Berman, B. (2012). 3-D printing: The new industrial revolution. *Business horizons*, *55*(2), 155-162.

Chae, S., Lee, S. S., Choi, Y. J., Gao, G., Wang, J. H., & Cho, D. W. (2021). 3D cell-printing of biocompatible and functional meniscus constructs using meniscus-derived bioink. *Biomaterials*, *267*, 120466.

Chen, M., Feng, Z., Guo, W., Yang, D., Gao, S., Li, Y., ... & Guo, Q. (2019). PCL-MECM-based hydrogel hybrid scaffolds and meniscal fibrochondrocytes promote whole meniscus regeneration in a rabbit meniscectomy model. *ACS applied materials & interfaces*, *11*(44), 41626-41639.

Chen, X., Shao, Z., Marinkovic, N. S., Miller, L. M., Zhou, P., & Chance, M. R. (2001). Conformation transition kinetics of regenerated Bombyx mori silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Biophysical chemistry*, *89*(1), 25-34.

Choi, J., Kwon, O. C., Jo, W., Lee, H. J., & Moon, M. W. (2015). 4D printing technology: a review. *3D Printing and Additive Manufacturing*, *2*(4), 159-167.

Datta, P., Vyas, V., Dhara, S., Chowdhury, A. R., & Barui, A. (2019). Anisotropy properties of tissues: A basis for fabrication of biomimetic anisotropic scaffolds for tissue engineering. *Journal of Bionic Engineering*, *16*(5), 842-868.

Elsevier. Lu, A. H., Salabas, E. E., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(8), 1222-1244.

Farahani, R. D., Dubé, M., & Therriault, D. (2016). Three-dimensional printing of multifunctional nanocomposites: manufacturing techniques and applications. *Advanced materials*, *28*(28), 5794-5821.

Ficai, D., Sonmez, M., Albu, M. G., Mihaiescu, D. E., Ficai, A., & Bleotu, C. (2015). Antitumoral materials with regenerative function obtained using a layer-by-layer technique. *Drug design, development and therapy*, *9*, 1269.

Feroz, S., Muhammad, N., Ratnayake, J., & Dias, G. (2020). Keratin-Based materials for biomedical applications. *Bioactive materials*, *5*(3), 496-509.

Gabdullin, N., & Khan, S. H. (2015, February). Review of properties of magnetic shape memory (MSM) alloys and MSM actuator designs. In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 588, No. 1, p. 012052). IOP Publishing.

Galt, S., Sandblom, J., Hamnerius, Y., Höjevik, P., Saalman, E., & Nordén, B. (1993). Experimental search for combined AC and DC magnetic field effects on ion channels. *Bioelectromagnetics*, *14*(4), 315-327.

Gao, Y., Kong, W., Li, B., Ni, Y., Yuan, T., Guo, L., ... & Zhang, X. (2018). Fabrication and characterization of collagen-based injectable and self-crosslinkable hydrogels for cell encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *167*, 448-456.

Gilbert-Honick, J., Iyer, S. R., Somers, S. M., Lovering, R. M., Wagner, K., Mao, H. Q., & Grayson, W. L. (2018). Engineering functional and histological regeneration of vascularized skeletal muscle. *Biomaterials*, *164*, 70-79.

Graeve, O. A., Fathi, H., Kelly, J. P., Saterlie, M. S., Sinha, K., Rojas-George, G., ... & Lopez, E. A. (2013). Reverse micelle synthesis of oxide nanopowders: Mechanisms of

precipitate formation and agglomeration effects. *Journal of colloid and interface science*, *407*, 302-309.

Gross, B. C., Erkal, J. L., Lockwood, S. Y., Chen, C., & Spence, D. M. (2014). Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences.

Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York academy of sciences*, *1092*(1), 385-396.

Hann, S. Y., Cui, H., Nowicki, M., & Zhang, L. G. (2020). 4D printing soft robotics for biomedical applications. *Additive Manufacturing*, *36*, 101567.

Hodaei, A., Akhlaghi, O., Khani, N., Aytas, T., Sezer, D., Tatli, B., ... & Akbulut, O. (2018). Single additive enables 3D printing of highly loaded iron oxide suspensions. *ACS applied materials & interfaces*, *10*(11), 9873-9881.

Holland, C., Numata, K., Rnjak-Kovacina, J., & Seib, F. P. (2019). The biomedical use of silk: past, present, future. *Advanced healthcare materials*, *8*(1), 1800465.

Huang, D., Huang, Y., Xiao, Y., Yang, X., Lin, H., Feng, G., ... & Zhang, X. (2019). Viscoelasticity in natural tissues and engineered scaffolds for tissue reconstruction. *Acta biomaterialia*, *97*, 74-92.

Hwang, S. W., Umar, A., Dar, G. N., Kim, S. H., & Badran, R. I. (2014). Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles for phenyl hydrazine sensor applications. *Sensor Letters*, *12*(1), 97-101.

Ikkai, F., & Naito, S. (2002). Dynamic light scattering and circular dichroism studies on heat-induced gelation of hard-keratin protein aqueous solutions. *Biomacromolecules*, *3*(3), 482-487.

Jammalamadaka, U., & Tappa, K. (2018). Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering. *Journal of functional biomaterials*, *9*(1), 22.

Jana, S., Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2016). Anisotropic materials for skeletal-muscle-tissue engineering. *Advanced Materials*, *28*(48), 10588-10612.

Khan, Y., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G., & Laurencin, C. T. (2008). Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *Jbjs*, *90*(Supplement_1), 36-42.

Kim, S. H., Yeon, Y. K., Lee, J. M., Chao, J. R., Lee, Y. J., Seo, Y. B., ... & Park, C. H. (2018). Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing. *Nature communications*, *9*(1), 1-14.

Kim, Y., Yuk, H., Zhao, R., Chester, S. A., & Zhao, X. (2018). Printing ferromagnetic domains for untethered fast-transforming soft materials. *Nature*, *558*(7709), 274-279.

Kundu, J., Poole-Warren, L. A., Martens, P., & Kundu, S. C. (2012). Silk fibroin/poly (vinyl alcohol) photocrosslinked hydrogels for delivery of macromolecular drugs. *Acta biomaterialia*, *8*(5), 1720-1729.

Langer, R., & Tirrell, D. A. (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature*, *428*(6982), 487-492.

LaGrow, A. P., Besenhard, M. O., Hodzic, A., Sergides, A., Bogart, L. K., Gavriilidis, A., & Thanh, N. T. K. (2019). Unravelling the growth mechanism of the co-precipitation of iron oxide nanoparticles with the aid of synchrotron X-Ray diffraction in solution. *Nanoscale*, 11(14), 6620-6628.

Lassahn, M. P., & Trenkler, G. (1995). Vectorial calibration of 3D magnetic field sensor arrays. *IEEE transactions on instrumentation and measurement*, *44*(2), 360-362.

Lee, K. Y. (2001). Characterization of silk fibroin/S-carboxymethyl kerateine surfaces: Evaluation of biocompatibility by contact angle measurements. *Fibers and Polymers*, *2*(2), 71-74.

Lee, K. Y., & Ha, W. S. (1999). DSC studies on bound water in silk fibroin/S-carboxymethyl kerateine blend films. *Polymer*, *40*(14), 4131-4134.

Lei, Q., He, J., & Li, D. (2019). Electrohydrodynamic 3D printing of layer-specifically oriented, multiscale conductive scaffolds for cardiac tissue engineering. *Nanoscale*, *11*(32), 15195-15205.

Liu, X., Nie, Y., Meng, X., Zhang, Z., Zhang, X., & Zhang, S. (2017). DBN-based ionic liquids with high capability for the dissolution of wool keratin. *RSC advances*, *7*(4), 1981-1988.

Loret, T., Rogerieux, F., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., & Lacroix, G. (2018). Predicting the in vivo pulmonary toxicity induced by acute exposure to poorly soluble nanomaterials by using advanced in vitro methods. *Particle and fibre toxicology*, *15*(1), 1-20.

Mahoney, A. W., Sarrazin, J. C., Bamberg, E., & Abbott, J. J. (2011). Velocity control with gravity compensation for magnetic helical microswimmers. *Advanced Robotics*, *25*(8), 1007-1028.

McLellan, J., Thornhill, S. G., Shelton, S., & Kumar, M. (2019). Keratin-based biofilms, hydrogels, and biofibers. In *Keratin as a Protein Biopolymer* (pp. 187-200). Springer, Cham.

Meng, H., & Li, G. (2013). A review of stimuli-responsive shape memory polymer composites. *polymer*, *54*(9), 2199-2221.

Mitchell, A., Lafont, U., Hołyńska, M., & Semprimoschnig, C. J. A. M. (2018). Additive manufacturing—A review of 4D printing and future applications. *Additive Manufacturing*, *24*, 606-626.

Mohan, N., Senthil, P., Vinodh, S., & Jayanth, N. (2017). A review on composite materials and process parameters optimisation for the fused deposition modelling process. *Virtual and Physical Prototyping*, *12*(1), 47-59.

Na, K., Shin, S., Lee, H., Shin, D., Baek, J., Kwak, H., ... & Hyun, J. (2018). Effect of solution viscosity on retardation of cell sedimentation in DLP 3D printing of gelatin methacrylate/silk fibroin bioink. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *61*, 340-347.

Naderi, N., Griffin, M. F., Mosahebi, A., Butler, P. E., & Seifalian, A. M. (2020). Adipose derived stem cells and platelet rich plasma improve the tissue integration and angiogenesis of biodegradable scaffolds for soft tissue regeneration. *Molecular Biology Reports*, *47*(3), 2005-2013.

Nagaoka, Y., Morimoto, H., & Maekawa, T. (2011). Ordered complex structures formed by paramagnetic particles via self-assembly under an ac/dc combined magnetic field. *Langmuir*, *27*(15), 9160-9164.

Nelson, I., Ogden, T. A., Al Khateeb, S., Graser, J., Sparks, T. D., Abbott, J. J., & Naleway, S. E. (2019). Freeze-casting of surface-magnetized iron (ii, iii) oxide particles in a uniform static magnetic field generated by a helmholtz coil. *Advanced Engineering Materials*, *21*(3), 1801092.

O'brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, *14*(3), 88-95.

Pereira, R. F., Silva, M. M., & de Zea Bermudez, V. (2015). Bombyx mori silk fibers: an outstanding family of materials. *Macromolecular Materials and Engineering*, *300*(12), 1171-1198.

Pekkanen, A. M., Mondschein, R. J., Williams, C. B., & Long, T. E. (2017). 3D printing polymers with supramolecular functionality for biological applications. *Biomacromolecules*, *18*(9), 2669-2687.

Qiu, F., & Nelson, B. J. (2015). Magnetic helical micro-and nanorobots: Toward their biomedical applications. *Engineering*, *1*(1), 021-026.

Rockwood, D. N., & Preda, R. C. (2011). TYU cel, X. Wang, ML Lovett and DL Kaplan. *Nat. Protoc*, *6*, 1612-1631.

Rozhkov, D. A., Pyanzina, E. S., Novak, E. V., Cerdà, J. J., Sintes, T., Ronti, M., ... & Kantorovich, S. S. (2018). Self-assembly of polymer-like structures of magnetic colloids: Langevin dynamics study of basic topologies. *Molecular Simulation*, *44*(6), 507-515.

Sano, K., Arazoe, Y. O., Ishida, Y., Ebina, Y., Osada, M., Sasaki, T., ... & Aida, T. (2018). Extra-large mechanical anisotropy of a hydrogel with maximized electrostatic repulsion between cofacially aligned 2D electrolytes. *Angewandte Chemie International Edition*, *57*(38), 12508-12513.

Singh, M., Haverinen, H. M., Dhagat, P., & Jabbour, G. E. (2010). Inkjet printing—process and its applications. *Advanced materials*, *22*(6), 673-685.

Suamte, L., Tirkey, A., Barman, J., & Babu, P. J. (2023). Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Materials in Manufacturing*, *1*, 100011.

Tachibana, A., Furuta, Y., Takeshima, H., Tanabe, T., & Yamauchi, K. (2002). Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. *Journal of biotechnology*, *93*(2), 165-170.

Thomas, H., Conrads, A., Phan, K. H., van de Löcht, M., & Zahn, H. (1986). In vitro reconstitution of wool intermediate filaments. *International Journal of Biological Macromolecules*, *8*(5), 258-264.

Vasconcelos, A., Freddi, G., & Cavaco-Paulo, A. (2008). Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules*, *9*(4), 1299-1305.

Yang, H., Leow, W. R., Wang, T., Wang, J., Yu, J., He, K., ... & Chen, X. (2017). 3D printed photoresponsive devices based on shape memory composites. *Advanced Materials*, *29*(33), 1701627.

Yu, K. F., Lu, T. Y., Li, Y. C. E., Teng, K. C., Chen, Y. C., Wei, Y., ... & Yu, J. (2022). Design and Synthesis of Stem Cell-Laden Keratin/Glycol Chitosan Methacrylate Bioinks for 3D Bioprinting. *Biomacromolecules*.

Zhang, W., Chen, L., Chen, J., Wang, L., Gui, X., Ran, J., ... & Zou, X. (2017). Silk fibroin biomaterial shows safe and effective wound healing in animal models and a randomized controlled clinical trial. *Advanced healthcare materials*, *6*(10), 1700121.

Zhang, Z. Z., Chen, Y. R., Wang, S. J., Zhao, F., Wang, X. G., Yang, F., ... & Jiang, D. (2019). Orchestrated biomechanical, structural, and biochemical stimuli for engineering anisotropic meniscus. *Science translational medicine*, *11*(487), eaao0750.

Zhu, M., Li, W., Dong, X., Yuan, X., Midgley, A. C., Chang, H., ... & Kong, D. (2019). In vivo engineered extracellular matrix scaffolds with instructive niches for oriented tissue regeneration. *Nature communications*, *10*(1), 1-14.

Zverev, V. S., Gupalo, M. A., Mauser, N. J., Kantorovich, S. S., & Novak, E. V. (2021). The influence of an applied magnetic field on the clusters formed by Stockmayer supracolloidal magnetic polymers. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *521*, 167445.

Wei, L., Wu, S., Kuss, M., Jiang, X., Sun, R., Reid, P., ... & Duan, B. (2019). 3D printing of silk fibroin-based hybrid scaffold treated with platelet rich plasma for bone tissue engineering. *Bioactive materials*, *4*, 256-260.

Wei, Q. N., Huang, A. M., Ma, L., Huang, Z., Huang, X., Qiang, P. P., ... & Zhang, L. (2012). Structure regulation of silk fibroin films for controlled drug release. *Journal of Applied Polymer Science*, *125*(S2), E477-E484.

Wohlers, T. T. (2014). *Wohlers Report...: 3D Printing and Additive Manufacturing, State of the Industry, Annual Worldwide Progress Report*. Wohlers Associates Incorporated.

Wu, J., Yuan, C., Ding, Z., Isakov, M., Mao, Y., Wang, T., ... & Qi, H. J. (2016). Multi-shape active composites by 3D printing of digital shape memory polymers. *Scientific reports*, *6*(1), 1-11.

Xiao, W., He, J., Nichol, J. W., Wang, L., Hutson, C. B., Wang, B., ... & Khademhosseini, A. (2011). Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta biomaterialia*, *7*(6), 2384-2393.

Xiao, W., Li, J., Qu, X., Wang, L., Tan, Y., Li, K., Li, H., Yue, X., Li, B., Liao, X., 2019, "Cell-laden interpenetrating network hydrogels formed from methacrylated gelatin and silk fibroin via a combination of sonication and photocrosslinking approaches", Mater. Sci. Eng. C, 99, 57–67.

Xue, W., Shi, W., Kong, Y., Kuss, M., & Duan, B. (2021). Anisotropic scaffolds for peripheral nerve and spinal cord regeneration. *Bioactive materials*, *6*(11), 4141-4160.
Nguyen, T. P., Nguyen, Q. V., Nguyen, V. H., Le, T. H., Huynh, V. Q. N., Vo, D. V. N., ... & Le, Q. V. (2019). Silk fibroin-based biomaterials for biomedical applications: a review. *Polymers*, *11*(12), 1933.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Melih Musa Ayran

Lisans: Işık Üniversitesi-Makine Mühendisliği

Yüksek Lisans: Marmara Üniversitesi-Metalurji ve Malzeme Mühendisliği

Dil Bilgisi: İngilizce-Almanca

Yayınlar:

- 3D-Printed PCL Scaffolds Combined with Juglone for Skin Tissue Engineering
- Fabrication and characterization of electrospun GelMA/PCL/CS nanofiber composites for wound dressing applications

Konferanslar:

Applications of Chemistry in Nanoscience and Biomaterials Engineering (2022) (Sözlü sunum)