MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

3 BOYUTLU BİYOYAZICI YÖNTEMİ İLE DOKU İSKELETİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ESRA ALTUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

EŞ-DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Nazmi EKREN

İSTANBUL, 2018

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

3 BOYUTLU BİYOYAZICI YÖNTEMİ İLE DOKU İSKELETİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ESRA ALTUN

(523314012)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

EŞ-DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Nazmi EKREN

İSTANBUL, 2018

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Esra ALTUN'un **"3 Boyutlu Biyoyazıcı Yöntemi ile Doku İskeleti Üretimi ve Karakterizasyonu"** başlıklı tez çalışması, 01/11/2018 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri		**İmza**
Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ Marmara Üniversitesi	(Danışman)	.....
Prof. Dr. Faik Nüzhet OKTAR Marmara Üniversitesi	(Üye)	.....
Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ Yıldız Teknik Üniversitesi	(Üye)	.....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07.11.2018 tarih ve 2018/27-75 sayılı kararı ile Esra ALTUN'un Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi birikimleri ile beni yönlendiren ve çalışmalarımda destek olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Kapısı öğrencilerine her zaman açık olan, yardımlarını esirgemeyen eş-danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazmi EKREN'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Bilgi birikimi ile öğrencilerine ışık tutan hocalarım Sayın Prof. Dr. Serdar SALMAN ve Sayın Prof. Dr. Faik Nüzhet OKTAR'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

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

Yüksek lisans eğitimim süresince yanımda olan, ihtiyacım olan her anda yardımlarını esirgemeyen sevgili Mehmet Onur AYDOĞDU'ya yardımları için teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan destekçilerim, sevgili kardeşim Harun ALTUN ve sevgili eşi Tuğba ALTUN ile sevgili kardeşim Musab Talha ALTUN'a, sevgili anneannem Semiha ÜNAL'a ve sevgili dedem Cevdet ÜNAL'a çalışmalarımda gösterdikleri maddi ve manevi destekleri için ve beni motive ettikleri için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca en büyük destekçim olan, her koşulda benden yardımlarını esirgemeyen ve çocukları için rol model olan çok sevgili annem Aysun ÜNAL'a hayatta sahip olduğum ve olacağım her şey için minnetimi sunarım.

Bu tez çalışmasından çıkan yayınlar ve yapılan konferans sunumları ise aşağıda listelendiği gibidir:

1. Esra Altun ve ark. (2018) Cell Studies on Electrohydrodynamic (EHD)-3D-Bioprinted Bacterial Cellulose\Polycaprolactone Scaffolds for Tissue Engineering, Materials Letters, 234, 163-167.
2. Esra Altun ve ark. (2018) Electrohydrodynamic (EHD) Bioprinting of Polycaprolactone Scaffolds, Materials Science Forum, 923, 93-97.
3. Esra Altun ve ark. (2018) Drug Release Studies of Electrohydrodynamic (EHD) Bioprinted Bacterial Cellulose, Journal of Controlled Release (Dergiye Gönderildi)
4. Esra Altun ve ark. (2018) Sözlü Sunum. Electrohydrodynamic (EHD) Bioprinting of Bacterial Cellulose/Polycaprolactone Scaffolds, 4th International Society for Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials (ISBPPB), Krakov, Polonya.
5. Esra Altun ve ark. (2017) Sözlü Sunum. Electrohydrodynamic (EHD) Bioprinting of Polycaprolactone Scaffolds, 2nd International Conference on Frontiers of Composite Materials Melbourne, Avustralya.

Ekim 2018 **Esra ALTUN**

İÇİNDEKİLER SAYFA

ÖNSÖZ i
İÇİNDEKİLER ii
ÖZET iv
ABSTRACT v
SEMBOLLER vi
KISALTMALAR vii
ŞEKİLLER LİSTESİ viii
TABLOLAR LİSTESİ xi
1. GİRİŞ 1
1.1. Doku İskeleti Özellikleri 1
1.2. Doku İskeleti Üretim Teknikleri 3
1.2.1. Geleneksel üretim teknikleri 5
1.2.1.1. Faz ayırma 5
1.2.1.2. Dondurarak kurutma 5
1.2.1.3. Kendi kendine birleşme 5
1.2.1.4. Elektrohidrodinamik atomizasyon (EHD) 5
1.2.2. Modern üretim teknikleri 7
1.2.2.1. 3-boyutlu (3B) biyoyazıcı 7
1.2.3. Kombine üretim teknikleri 8
1.2.3.1. EHD-biyoyazım 8
1.2.3.1.1. Yöntem parametreleri 10
1.2.3.1.2. EHD-biyoyazım yönteminin ilaç salınım çalışmalarında kullanılması 10
1.2.3.1.3. EHD-biyoyazım çalışmalarında kullanılan biyomalzemeler 11
1.2.3.1.3.1. Sentetik polimerler 13
1.2.3.1.3.1.1. Polikaprolakton (PCL) 13
1.2.3.1.3.2. Doğal polimerler 15
1.2.3.1.3.2.1. Bakteriyel selüloz BC) 16
2. MATERYAL VE YÖNTEM 17
2.1. Malzemeler 17
2.1.1. Polimerler 17
2.1.2. Model ilaç 17

2.1.3. Kimyasal malzemeler 17
2.2. Cihazlar 18
2.2.1. EHD-biyoyazım sistemi 18
2.2.2. Viskozimetre 18
2.2.3. Elektriksel iletkenlik 19
2.2.4. Yüzey gerilimi 20
2.2.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) 20
2.2.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektroskopisi (FTIR) 22
2.2.7. Ultra viole–görünür bölge (UV) spektrofotometre 23
2.2.8. Diğer cihazlar 23
2.3. Deneysel Metodlar 24
2.3.1. Polimer çözeltisi hazırlama 24
2.3.2. EHD-biyoyazım 26
2.3.3. Doğrudan ilaç yükleme 27
2.3.4. İlaç salınım denemeleri 28
2.3.5. İlaç salınım verilerinin matematiksel modellere uygulanması 28
2.3.6. Hücre testi 30
2.3.7. Antibakteriyel aktivite analizi 32
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 33
3.1. Fiziksel Karakterizasyon 33
3.2. Morfolojik Karakterizasyon 35
3.3. Kimyasal Karakterizasyon 38
3.4. Hücre Testi Karakterizasyonu 39
3.5. Antimikrobiyal Aktivite Analizi 41
3.6. Doğrudan İlaç Yükleme 42
3.7. Doku İskeletlerinden İlaç Salınım Denemeleri 43
3.8. İlaç Salınım Verilerinin Matematiksel Modellere Uygulanması 45
4. SONUÇLAR 49
KAYNAKLAR 50

ÖZET

3 BOYUTLU BİYOYAZICI YÖNTEMİ İLE DOKU İSKELETİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Bu tez çalışmasında, elektrohidrodinamik atomizasyon ve 3-boyutlu yazıcı yöntemlerinin EHD-biyoyazım adı altında birleştirilmesi ile polikaprolakton ve bakteriyel selüloz polimerleri kullanılarak doku iskeletlerinin üretilmesi ve amoksisilin model ilacının doku iskeletlerinden salınımı araştırılmıştır.

EHD-biyoyazım parametreleri ve çalışma koşulları optimize edildikten sonra elde edilen numuneler, taramalı elektron mikroskobu, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve ultraviyole-gözle görünür spektroskopi kullanılarak karakterize edilmiştir.

Doku iskeletleri ayrıca, sitotoksisite ve mtt deneyleri içeren bir dizi teknik kullanılarak, toksisite, canlılık ve proliferasyon açısından değerlendirilmek üzere fare embriyo fibroblast hücreleri ile 24, 48 ve 72 saatlik *in vitro* teste tabi tutulmuştur. 72 saatlik periyot sonunda hücrelerin, doku iskeleti içerisinde bulunan mikrofiberlerin yönü boyunca yayılmaya ve uzmaya başladığı, mikrofiber aralıklarına da sızdığı ve doku iskeleti numunesi üzerinde kümeler oluşturmaya başladığı açıkça görülmüştür. Ayrıca, doku iskeletleri üzerinde büyüyen hücreler, literatürde yayınlanmış benzerlerinden ≥%100 olarak daha fazla hücre canlılığı göstermiş ve bu canlılığı 72 saat sonuna kadar korumayı başarabilmiştir.

Agar disk difüzyon testi, model ilaç yüklü doku iskeletlerinin antimikrobiyal özelliklerini incelemek için kullanılmış ve ilaç yüklü numunelerin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı oldukça yüksek antimikrobiyal özellik gösterdikleri belirlenmiştir.

Numuneler üzerinde yapılan ilaç salınım çalışmaları sonucu elde edilen ilaç salınım sonuçları sıfır derece, birinci derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modelleri üzerinden değerlendirilmiştir. Dört farklı kinetik modelde, ilaç yüklü doku iskeletleri en iyi Higuchi salınım modeline uymuş ve ilaç salınım şekli belirlenmesi için kullanılan Korsmeyer-Peppas modeline göre de amoksisilinin doku iskeletlerinden Fick tipi salınım gerçekleştiği tespit edilmiştir.

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF TISSUE SCAFFOLD WITH 3D BIOPRINTING METHOD

The work presented in this thesis investigates the combining and use of electrohydrodynamic atomisation and 3D printing methods namely, EHD-bioprinting for the fabrication of blended polycaprolactone and bacterial cellulose scaffolds designed for tissue engineering and delivery of model drug amoxicillin.

After subsequent optimisation studies of the relevant EHD-bioprinting parameters, prepared samples are characterised using scanning electron microscopy, fourier transform infrared spectroscopy and ultraviolet–visible spectroscopy.

Scaffolds are further tested *in vitro* for their interactions with mice embryo fibroblast cells in terms of toxicity, viability and proliferation, by using a range of techniques that include cytotoxicity testing and mtt assays for 24, 48 and 72 hours period. At the end of the period, it was clear that the cells began to spread along the direction of the microfibers within the tissue scaffold, infiltrated the microfiber gaps and began to form clusters on the tissue scaffold samples. Moreover, cells growing on tissue scaffolds is showed greater cell viability (≥100%) than the similar studies published in the literature and also managed to maintain this viability until the end of 72 hours.

Agar disc diffusion test was used to study the antimicrobial properties of model drug loaded tissue scaffolds and samples are showed highly antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria.

Drug release results are assessed according to zero order, first order, Higuchi and Korsmeyer-Peppas kinetic models with drug loaded scaffolds. Among the four different kinetic models, drug loaded scaffolds were fitted Higuchi release model the best and according to Korsmeyer-Peppas model, it is observed that release of amoxicillin from scaffolds occurred with Fickian release model.

SEMBOLLER

%T: % geçirgenlik değeri

Au: Altın

CO_2: Karbondioksit

kPa: Kilo paskal

kV: Kilo voltaj

NaCl: Sodyum klorür

R: Regresyon katsayısı

RH: Bağıl nem

rpm: Dakikadaki devir sayısı

KISALTMALAR

2B: 2-boyutlu

3B : 3-boyutlu

AMX: Amoksisilin

BC: Bakteriyel selüloz

DCM: Diklorometan

DMEM: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri

DMF: Dimetilformamid

DNA: Deoksiribo nükleik asit

ECM: Hücre dışı matriks

EHD: Elektrohidrodinamik atomizasyon

FBS: Fetal bovin serumu

FTIR: Fourier dönüşümlü kızılötesi

İTS: İlaç taşıyıcı sistemler

LB: Luria-Bertani

MTT: Metiltiazol difenil tetrazolyum

NIH/3T3: Fare embriyo fibroblast

PBS: Fosfat tampon çözeltisi çözeltisi

PCL: Polikaprolakton

PLA: Polilaktik asit

PLLA: Poli-L-laktik asit

PU: Poliüretan

PVP: Polivinil pirolidon

RNA: Ribo nükleik asit

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

UV: Ultra viole

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için 3B akıllı iskeletler geliştirmede genel gereksinimleri gösteren şematik..... 2
Şekil 1.2. Biyomalzemelerden işlevsel dokular oluşturmak için akış şeması..... 3
Şekil 1.3. Doku iskeleti yapım tekniklerinin sınıflandırılması..... 4
Şekil 1.4. EHD cihazı şematik gösterimi: (i) yüksek voltajlı güç kaynağı, (ii) paslanmaz çelik nozul, (iii) ayarlanabilir yüksek voltajlı güç kaynağı, (iv) paslanmaz çelik kollektör, (v) birikmiş nanofiberlerin şematik çizimi, (vi) dijital kamera ve (vii) kamera görüntüleri ile deneyi gözlemlemek için kullanılan bilgisayar..... 6
Şekil 1.5. (A) Elektrohidrodinamik (EHD)-biyoyazım sisteminin şeması ve (A) EHD-biyoyazım sisteminin dijital görüntüsü..... 9
Şekil 1.6. EHD biyoyazım için ana işlem parametreleri..... 10
Şekil 1.7. Polikaprolakton (PCL) kimyasal açılımı..... 14
Şekil 1.8. EHD-biyoyazım sisteminin kavramsal diyagramı..... 15
Şekil 1.9. Bakteriyel selüloz (BC) kimyasal açılımı..... 16
Şekil 2.1. EHD-biyoyazım sisteminin şematik çizimi ve parçaları: (A) programlanabilir şırınga pompası, (B) yüksek voltaj güç kaynağı, (C) laboratuvarda yeniden düzenlenmiş bir X-Y ekseni hareketi sağlayan kontrol kafası, cam alt tabaka tutucu, Z ekseni doğrultusunda hareket eden nozul tutucusundan oluşan EHD-biyoyazım sistemi ve (D) 1 mm çalışma mesafesinde EHD-biyoyazım gösterimi..... 18
Şekil 2.2. Analizlerde kullanılan viskozimetre..... 19
Şekil 2.3. Analizlerde kullanılan elektriksel iletkenlik ölçüm cihazı..... 19
Şekil 2.4. Analizlerde kullanılan yüzey gerilimi ölçüm cihazı..... 20
Şekil 2.5. Analizlerde kullanılan taramalı elektron mikroskobu (SEM)..... 21
Şekil 2.6. SEM görüntülemesi öncesinde kullanılan kaplama cihazı..... 21
Şekil 2.7. Analizlerde kullanılan fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FTIR) cihazı..... 22
Şekil 2.8. Analizlerde kullanılan ultraviyole-gözle görünür (UV) spektrofotometre cihazı..... 23

Şekil 2.9. Parçalanmış BC hazırlama aşamaları: (a) BC, (b) DMF içerisine alınan BC'nin homojenizatörde parçalanması, (c) BC solüsyonunun santrifüj edilmesi, (d) santrifüj edilen solüsyondan supernatant kısmın alınması ve (e) parçalanmış BC elde edilmesi...24
Şekil 2.10. Ağırlıkça %10'luk PCL çözeltisi hazırlanma aşamaları: (A) PCL tartımı ve (B) Manyetik karıştıcı kullanarak PCL polimerinden DCM içerisinde solüsyon hazırlama..... 25
Şekil 2.11. Hazırlanmış BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) polimer çözeltisi..... 25
Şekil 2.12. EHD 3D-biyoyazım işlemi gerçekleştirilecek örnek için önceden SolidWorks programında tasarlanan iki katmanlı doku iskeleti formu..... 26
Şekil 2.13. EHD-biyoyazım sistemi ile deneysel EHD-biyoyazım kurulumu (A) ve EHD biyoyazım işlemine daha yakın bir bakış (B) 26
Şekil 3.1. (A) Farklı konsantrasyonda PCL solüsyonları ile hazırlanmış EHD-biyoyazılmış fiberlerin boyut grafiği fiber çap grafiği (a) ve örneklerin optik mikroskop görüntüleri (b-f). (B) Ağırlıkça %10 PCL solüsyonu ile EHD-biyoyazımı yapılmış örneklerin çeşitli voltaj değerleri (1-6 kV) uygulandığında elde edilen optik mikroskop görüntüleri ve (C) farklı konsantrasyonlarda karıştırılmış BC:PCL solüsyonlarının EHD-biyoyazım sonrası elde edilen fiber çap boyutlarını gösteren grafik (a) ve optik mikroskop görüntüleri (b-f). (Tüm ölçek çubukları 100 μm dir.) 36
Şekil 3.2. A) EHD-biyoyazım ile üretilen BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti görüntüsü ile B) Saf PCL (i) ve BC:PCL (ii, 5:95 ağırlık oranı) solüsyonlarından elde edilen yapı iskeletlerinin SEM görüntüleri ile BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) örneğinin katmanlarına (iii) ve mikrofiberlerinin gözenekli yüzeyine (iv) yakından bir bakış..... 37
Şekil 3.3. EHD-biyoyazılmış AMX yüklü BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti örneğinin kamera görüntüsü (A) ve fiber arası boşlukları ile fiberler üzeri porlu yapının SEM görüntüsü (B) 38
Şekil 3.4. Saf PCL, Saf BC, AMX, BC:PCL (5:95 ağırlık oranı), BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) + AMX örneklerinin FTIR grafiği..... 39
Şekil 3.5. NIH/3T3 hücrelerinin EHD-biyoyazılmış doku iskeletleri üzerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonlarında hücre tutunması ve yayılmalarının gösterildiği SEM görüntüleri ile aynı saatler sonunda hücre canlılıklarının gösterildiği grafikler. (Kontrol hücrelerinin sayısı, grafiklerde %100 olarak ifade edilmiştir.) 40
Şekil 3.6. Amoksisilin standart eğrisi..... 42

Şekil 3.7. Üretilen doku iskeletinden amoksisilin salım grafiği..... 44
Şekil 3.8. Amoksisilinin sıfır derece kinetik salınımı..... 46
Şekil 3.9. Amoksisilinin birinci derece kinetik salınımı..... 46
Şekil 3.10. Amoksisilinin Higuchi kinetik salınımı..... 47
Şekil 3.11. Amoksisilinin Korsmeyer-Peppas kinetik salınımı..... 48

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. EHD-biyoyazımı yapılan solüsyonların fiziksel özellikleri..... 33
Tablo 3.2. Proses parametrelerinin EHD-biyoyazılmış fiber çapına etkileri..... 34
Tablo 3.3. İlaç yüklenmemiş BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeletlerinin ve AMX ile yüklenen BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeletlerinin *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel özellikleri. (Tüm ölçek çubukları 10 mm gösterir)..... 41
Tablo 3.4. DCM içerisinde çözülen doku iskeletleri içinde tespit edilen ilaç verimleri. 43
Tablo 3.5. Amoksisilin ilaç salınım profili..... 45
Tablo 3.6. Farklı salım mekanizmaları..... 48

1. GİRİŞ

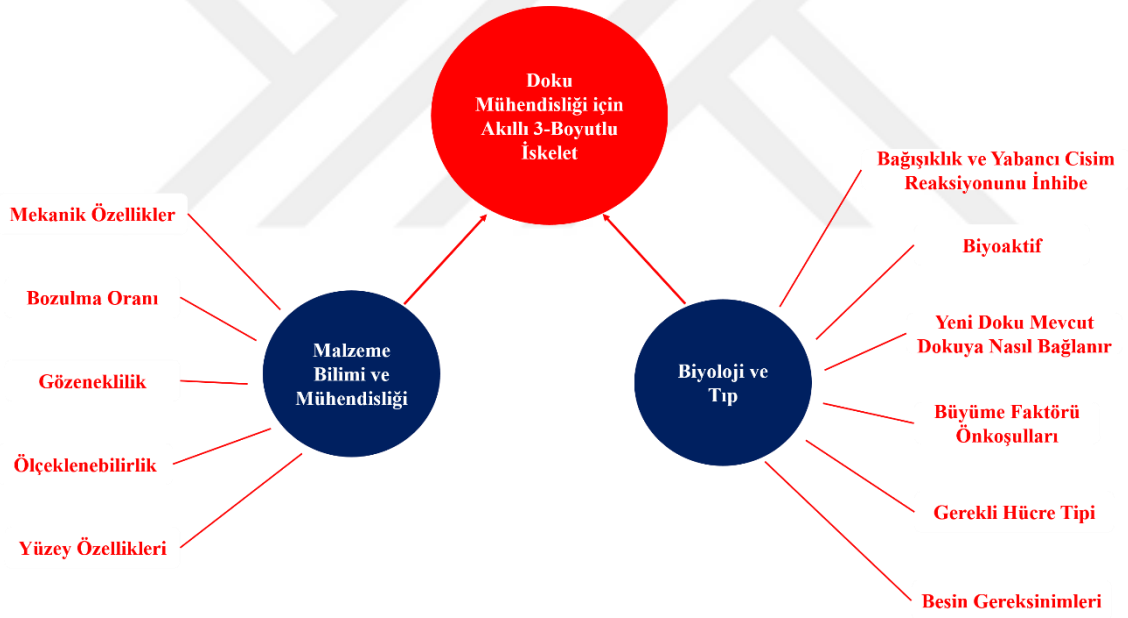
Kazalar ve hastalıklar yaşamı tehdit edebilen yıkıcı doku kayıplarına ve organ bozukluklarına yol açmaktadır. Otolog hücre/doku transplantasyonu ile doku onarımı, doku rejenerasyonu için en umut verici tekniklerden biridir. Otogreft ve allogreftleme, hasarlı veya kayıp doku ve organları onarmak veya değiştirmek için günümüzde kullanılan iki ana yöntemdir (Lutolf ve ark., 2005). Son yıllarda biyomalzemelerden üretilen farklı doku iskeletleri çeşitli üretim teknikleri ile doku ve organları rejenere etmek için kullanılmıştır (O'Brien, 2011; Aydogdu ve ark., 2018a). Bu 3-boyutlu (3B) doku iskeletleri, hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması için uygun bir ortam sağlamak ve hücre kendi hücre dışı matrisini (ECM) oluşturuncaya kadar aynı fonksiyonel role sahip olmak için ECM rolünü üstlenmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca doku mühendisliği iskeletine entegre edilmiş kontrollü ilaç salınım fonksiyonu, doku gelişimi veya rejenerasyonu için oldukça elverişlidir.

1.1. Doku İskeleti Özellikleri

Mevcut doku mühendisliği tekniklerinin en büyük zorluğu doğal doku ortamının taklit edilmesidir. Geleneksel doku mühendisliği yöntemleri, hücre kültürü ve doku yapımı için 2-boyutlu (2B) malzemeler veya doku iskeletleri kullanır. 2B iskeletlerin temel dezavantajı, hücreye kendi doğal mimarisini sağlamada başarısız olmasıdır. Doğal doku mikro mimarisi, 3B ortamı nedeniyle son derece karmaşık yapıdadır. Bu nedenle, 2B veya 2,5B yerine 3B bir ortam sağlandığında, hücreler büyür, çoğalır ve doğal dokuya daha benzer şekilde farklılaşırlar (Cukierman ve ark., 2001; Cukierman ve ark., 2002; Edelman ve ark., 2005).

Doku tiplerine bakılmaksızın, doku mühendisliğinde kullanılmak üzere bir iskeletin uygunluğunu tasarlarken veya belirlerken bir takım parametreler önemlidir. **Şekil 1.1**, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için akıllı 3B doku iskeletleri geliştirmeden önce dikkate alınması gereken bazı temel gereksinimleri göstermektedir (Moroni ve ark., 2008). Öncelikle doku iskeleti yapısı biyolojik olarak uyumlu ve muhtemelen hücre yapışması, göçü ve normal işlevselliği için istenen yüzey özellikleri ile biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır. İkinci olarak, insan vücudunun dokuları yumuşak (beyin,

yaklaşık 0,5 kPa), orta derecede sert (deri ve kaslar, yaklaşık 10 kPa) ve sert (ön kireçlenmiş kemik > 30 kPa) (Rehfeldt ve ark., 2007) arasında değişen seçici mekanik özelliklere sahip olduğundan, iskelet yapısını çevreleyen doku ile bütünleşebilmeleri için, doku iskeleti istenilen mekanik mukavemete ve gözeneklilige sahip olmalıdır. Ayrıca, üretilen doku iskeletlerinin büyüklüğü hasarlı dokunun alanına çok benzer olmalıdır. Ek olarak, küçük ilaç molekülü, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi biyolojik sinyallerin *in vitro* veya *in vivo* olarak gözenekli iskeletlerden kontrollü olarak verilmesinin, doku morfojenezi, canlılığı ve işlevselliğinin desteklenmesi ve arttırılmasında çok önemli olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Richardson ve ark., 2001; Quinlan ve ark., 2015). Bu nedenle üretimde kullanılan iskelet materyallerinin fiziko-kimyasal özelliklerini dikkate almalı ve böylece hücrelerin biyolojik tepkilerini spesifik dokuya yönlendirmek ve düzenlemek için istenen ilacı/biyomolekülü serbest bırakabilmelidir.



Şekil 1.1. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için 3B akıllı isketleler geliştirmede genel gereksinimleri gösteren şematik (Değiştirilmiş referans, Seal, 2001).

Doku iskeleti üretim süreci, biyomalzemelerle başlar ve onu takiben doku iskeletleri üretilir. Bu iskeletler, biyobozunabilirlik, gözeneklilik, boyut, şekil ve biyoaktivite gibi spesifik ihtiyaçları karşılamak için imalat işlemi sırasında kimyasal ve fiziksel olarak modifiye edilir. Bu gereksinimler, biyomateryallerin yapısına, üretim sürecine ve hedef

dokuya bağlı olarak değişebilir. İskelet, istenilen özelliklere sahip hale getirildikten sonra, istenen özelliklerin yaratılması için hücre ekilebilir ve *in vitro* kültürlenebilir ya da konakçı hücrelerin vücuda yerleştirilebilmesini ve konak hücrelerin iskelet içine sızmasını ve nüfuz etmesini sağlayabilir. Büyüme faktörleri, hormonlar ve ilaçlar her iki yaklaşımda da kültürün dokusunun hücre farklılaşmasını ve işlevselliğini tanımladıkları için önemlidir. Bu süreç, **Şekil 1.2**'de bir akış şeması olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Biyomalzemelerden işlevsel dokular oluşturmak için akış şeması.

1.2. Doku İskeleti Üretim Teknikleri

Doku mühendisliğinin klinik uygulamaya çevrilmesindeki başlıca zorluklardan biri, karmaşık, biyolojik etkili dokuları ve organları insan için uygun boyuta ölçeklemenin zorluğudur (Rustad ve ark., 2010). Dokuları *in vitro* olarak yapılandırırken, hücre büyümesini destekleyebilen ve aynı zamanda hedeflenen dokunun geometrik, topografik ve fiziksel özelliklerini içeren fizyolojik ortamı taklit eden yapılar veya iskeletler için bir gereksinim vardır.

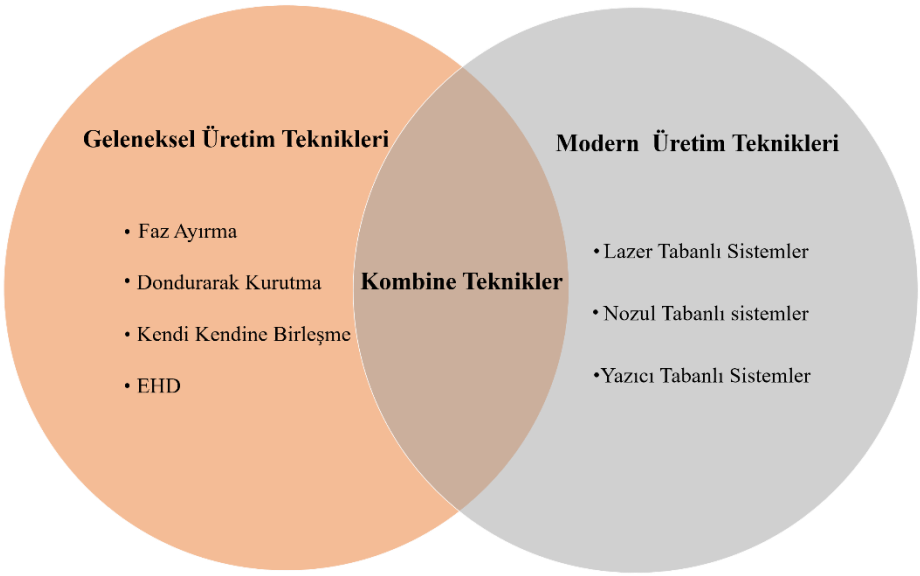
Yüksek yüzey ve hacim oranlı yapılarda yüksek bir hücre yoğunluğuna uyum sağlamakta 3B doku iskeletleri oluşturmak için çok sayıda yaklaşım mevcuttur (Almeida ve ark., 2014). Bu yaklaşımlardan biri, hücrelerin doku iskeletine yapışması ve büyümesi için alan ve aktif malzeme taşınımları için olanak sağlayan, birbirine bağlı gözenekler/mikro

kanallarla yüksek gözenekli yapılar kullanmak olmuştur (Guillemette ve ark., 2010). Bu tür iskeletlerin yapısal, mekanik ve kütle taşıma özellikleri, gözenek boyutu, gözenek şekli, gözenek yapısı, gözenek ara bağlantıları, geçirgenlik, iskelet yüzey alanı, iskelet sertliği ve iskelet malzemesi gibi parametreler ile belirlenir (Jeong ve ark., 2010). Bu özellikler büyük ölçüde doku iskeleti üretim tekniği ile belirlenir.

Doku iskeleti üretimi için çeşitli teknikler vardır. Bu üretim teknikleri, doku mühendisliği için kullanılabilir hale getirmek üzere biyomalzemeler üzerinde gerçekleştirilen fiziksel ve/veya kimyasal işlemlerdir. Her biyomalzeme belirli bir üretim metodu için uygun değildir. Günümüze kadar, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılmak üzere 3B polimerik iskeletlere farklı doğal ve sentetik biyomalzemelerin işlenmesi için çeşitli başarılı üretim teknikleri geliştirilmiştir. Bu teknikler, **Şekil 1.3**'de gösterildiği gibi iki ana gruba ve bunların birleşimi olan bir ara gruba ayrılabilir:

I) Temel olarak stokastik, düzensiz veya rastgele mikro gözenekli yapılara sahip olan polimerik iskeletler üreten "Tasarımsız kontrollü iskelet imalatı" olarak adlandırılan **geleneksel üretim teknikleri**;

II) 3B yapısal mikro gözenekli iskeletler oluşturmak için kesin olarak tanımlanmış boyutlar, konum ve geometri ile kanalların/gözeneklerin oluşumunu sağlayan ve "Tasarım Kontrollü İskele Üretimi" olarak adlandırılan **modern üretim teknikleri** (Hollister, 2009).



Şekil 1.3. Doku iskeleti üretim tekniklerinin sınıflandırılması.

1.2.1. Geleneksel üretim teknikleri

Geleneksel üretim teknikleri faz ayırma, dondurarak kurutma, kendi kendine birleşme ve Elektrohidrodinamik atomizasyon (EHD) yöntemlerinden oluşur. Bu yöntemler ne kadar hızlı, ölçeklenebilir ve ekonomik olsa da, fiber boyutu, geometrisi, ara bağlantıları ve iskelet içindeki dağılım gibi mikro detayların doğru kontrolünü sağlamazlar (Yeong ve ark., 2004).

1.2.1.1. Faz ayırma

Son derece gözenekli ve karmaşık 3B doku iskeletleri, faz ayırma yöntemi kullanılarak imal edilebilir. Bu iskelet üretim yönteminde, farklı çözücü sistemlere sahip bir çözelti kullanılır. Termal veya çözücüler kullanılmadan, fazlardan biri sadece arzu edilen polimer çözeltisinden ayrılarak ayrılır. Bu yöntem kullanılarak, iskeletlerin gözenekliliği kontrol edilebilir, ancak yöntem polimer çeşitliliği ve yüksek çözünürlüklü iskeletler üretememesi ile sınırlıdır.

1.2.1.2. Dondurarak kurutma

Dondurarak kurutma, gözenekli iskelet elde etmek için su veya çözücünün bir sistemden çıkarılması için süblimasyon prensibini kullanır. Bu yöntem aynı zamanda faz ayrımı ile benzer sınırlamalara sahiptir.

1.2.1.3. Kendi kendine birleşme

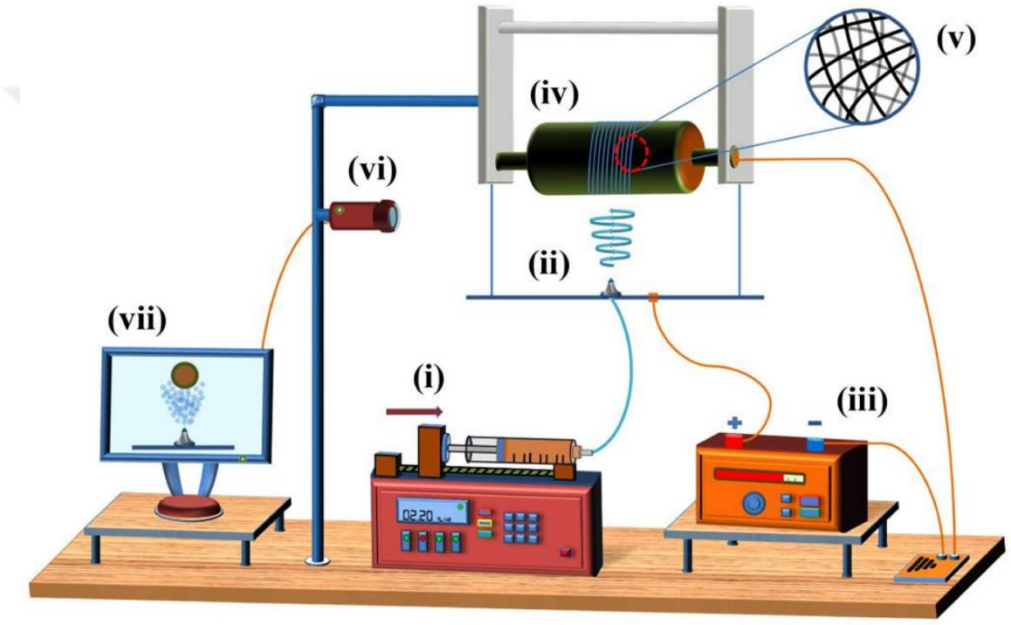
Kendi kendine birleşme yöntemi, bir iskelet oluşturmak için kendilerini organize etmekte olan polimerler arasındaki iyonik etkileşimlere dayanır. Bu yöntem kullanılarak oluşturulan iskeletler 3B iskeletler için çok zayıf mekanik özelliklere sahiptir. Ek olarak, bu iskeletlerin üretimi için gereken maliyet yüksektir.

1.2.1.4. Elektrohidrodinamik atomizasyon (EHD)

Yirminci yüzyılın başlarına yakın Zeleny (Zeleny ve ark., 1914) tarafından elektrik stresinin etkisi altında bir sıvının konik şekilli menisküsünden damlacıklar oluşabildiği açıklanmıştır. Zeleny, elektrostatik kuvvetlerin ince sıvı jetlerin davranışını bir kılcal plaka deneysel konfigürasyonu kullanarak nasıl etkilediğini incelediyse de daha ileri

araştırmalar, elektrohidrodinamik atomizasyonun (EHD) sıvı atomizasyonu için çok yönlü bir yöntem olduğunu doğrulamıştır (Jaworek ve ark., 2008). 1934 yılında, Formhals (Anton, 1934) fiberlerin EHD yöntemi ile üretildiği çeşitli sistemler icat etmiştir.

Son yıllarda yapılan EHD çalışmaları ile bu yöntemin hem mikro hem de nanometre yapılarının geliştirilmesinde kullanılabilecek çok yönlü bir teknik olduğu kanıtlanmıştır ve deney sırasında değişkenlerin ayarlanmasıyla çok çeşitli yapıların (küresel homojen parçacıklardan ve kapsüllerden tabakalı liflere kadar) üretilmesi mümkün hale gelmiştir (Altun ve ark., 2018a; Aydogdu ve ark., 2018b; Sill ve ark., 2008).



Şekil 1.4. EHD cihazı şematik gösterimi: (i) yüksek voltajlı güç kaynağı, (ii) paslanmaz çelik nozul, (iii) ayarlanabilir yüksek voltajlı güç kaynağı, (iv) paslanmaz çelik kollektör, (v) birikmiş nanofiberlerin şematik çizimi, (vi) dijital kamera ve (vii) kamera görüntüleri ile deneyi gözlemlemek için kullanılan bilgisayar (Aydogdu ve ark., 2018a).

EHD (**Şekil 1.4**), tek adımda, normal koşullar altında ve uygulanan çözeltilerle uyumlu çözücülerle uygulanabilme özelliğinden ötürü, ilaç taşınımı dahil bir dizi uygulamada birçok kullanım göstermiştir. Ayrıca, EHD teknolojisi, rastlantısal olarak yönlendirilmiş fiberlerin sınırlandırılmasından ve kontrollü, muntazam gözenekli bir iskeletin üretilememesinden dolayı dezavantajlıdır. Ancak, modern üretim teknikleri kontrollü 3B gözenekli iskeletler imal etmek için potansiyel bir çözüm olarak görülmektedir (Mironov ve ark., 2003; Hollister, 2005; Boland ve ark., 2006).

1.2.2. Modern üretim teknikleri

Genellikle 3B yazıcı olarak adlandırılan modern üretim teknikleri, stereolitografi, mürekkep püskürtmeli yazım, biyoyazım, erimiş çökeltme modelleme, ekstrüzyon, lazer ışını eritme, seçici lazer sinterleme, dijital lazer yazım, elektron ışını eritme ve polijet tekniklerden oluşur (Wong ve ark., 2012; Khatiwala ve ark., 2012).

3B yazıcı için kullanılan tüm teknikler, katman katman yazım yaparak 3B nesnelerin oluşturulmasını içerir, istenen karmaşıklıklara sahip mikro ölçekli gözenekli yapıları imal etmek için hızlı bir prototipleme tekniği olarak uygulanma yönünde kullanılmaya başlanmıştır ve bu yöntemlerden biyofabrikasyon/biyoyazım yöntemi son yıllarda doku mühendisliği çalışmaları için ön plana çıkmıştır (Wüst ve ark., 2011). Bu yöntemlerle ilgili doku veya vücut kısmının bilgisayar destekli bir tasarım modeline göre katman katman üretimi gerçekleştirilir (Melchels ve ark., 2012).

1.2.2.1. 3-boyutlu (3B) biyoyazıcı

3-boyutlu (3B) biyoyazıcı ilk olarak 1986 yılında "stereolitografi" yöntemini tanıtan Charles W. Hull tarafından tanıtılmıştır (Hull, 1986). Bu yöntemle, bilgisayar ile bir prototip dizaynı yapılır ve bir malzemenin ince katmanlarını üst üste yazmak suretiyle 3B bir yapı oluşturulur. Yöntemin kullanımı ile tasarım aşamasından üretim aşamasına hızlı, doğru ve güvenilir 3B nesneler oluşturularak üretimler kolaylaştırılır (Altun ve ark., 2018b).

3B yazıcı teknikleri, üretim, sanat da dahil olmak üzere doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanları dahil çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp araştırmalarının odak noktasını, belirli 3B yazıcıların ve malzemelerin sürekli gelişimi yoluyla büyüme faktörleri veya canlı hücreler ile 3B doku iskeletlerinin üretimi oluşturur. Bu iskeletler potansiyel olarak sadece hasarlı dokuyu değiştirmekle kalmayıp aynı zamanda ilaç veya toksisite testi için *in vitro* tarama modelleri olarak hareket edebilmektedir ve farklı hücre tipi etkileşimleri hakkında daha fazla bilgi sağlayabilmektedir (Malda ve ark., 2013; Groll ve ark., 2016).

1.2.3. Kombine üretim teknikleri

3B elastomerik doku iskeletlerinin tanımlanmış mikro yapısal özellikleri ile düşük maliyetli ve ölçeklenebilir üretim sorununu aşmak için son zamanlarda, kombine üretim teknikleri olarak kategorize edilebilen geleneksel ve modern üretim yöntemlerini birleştiren yeni tip doku iskeleti üretimine başlanmıştır (Mohanty ve ark., 2016; Wray ve ark., 2012; Sang ve ark., 2014). Bu kombine tekniklerden olan EHD-biyoyazım tekniği geleneksel üretim tekniklerinden elektrohidrodinamik atomizasyon ve hızlı prototipleme tekniklerinden 3B yazıcı sistemlerinin birleştirilmesi ile ortaya çıkmış bir tekniktir (Altun ve ark., 2018b).

Bu tez çalışmasında, doku mühendisliği ve ilaçların verilmesi için tasarlanan harmanlanmış polikaprolakton (PCL) ve bakteriyel selüloz (BC) doku iskeletlerinin üretilmesi için EHD-biyoyazım yönteminin kullanılması araştırılmıştır.

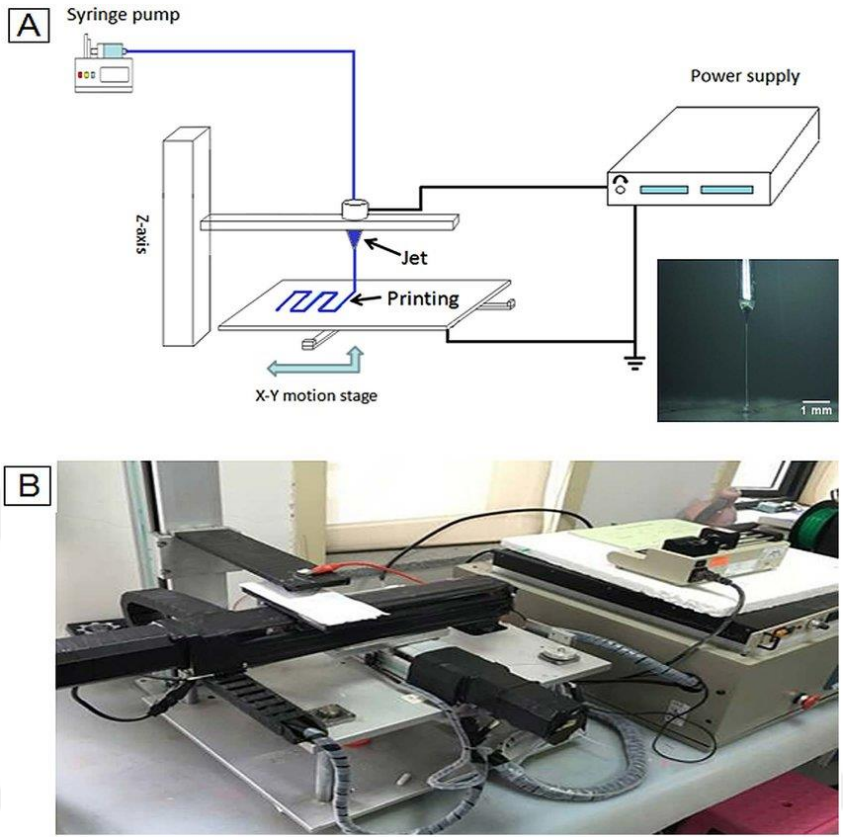
1.2.3.1. EHD-biyoyazım

EHD-biyoyazım, hem mikro hem de nano ölçekli yazım sağlayan bir üretim sürecidir ve EHD yöntemi ile 3B yazıcı yöntemlerinin birleştirildiği bir tekniktir. EHD-biyoyazımda mikro/nano ölçekli nozullar kullanılarak polimer solüsyonu üzerine bir elektrik alanı kullanır (Meier, 2000; Zhang ve ark., 2006). Bu yöntem, nozul ile kollektör arasındaki voltaj potansiyelini değiştirerek kontrol edilir (Barton ve ark., 2010) ve polimer akışını zorlamak için ısı veya basınç kullanan geleneksel mürekkep püskürtmeli yazım işlemlerinden farklıdır.

EHD-biyoyazım için kullanılan işlem geleneksel EHD ile aynıdır; ancak numune, çapı oldukça küçük olan nozula yakın bir şekilde toplanır. Numune, istenildiği gibi spesifik bir tasarım oluşturmak için iğneden dışarı istenilen şekilde yönlendirilebilir. **Şekil 1.5** EHD-biyoyazım tekniğinin şematik bir çizimini göstermektedir.

EHD-biyoyazım, nozul tıkanıklıklarını en aza indirgeme ve daha yüksek viskoziteye sahip polimer solüsyonlarının işlenmesini kolaylaştırma gibi özelliklere sahip olmasıyla, geleneksel 3B yazıcı yöntemlerine kıyasla daha avantajlıdır. Kullanılan voltaj potansiyeli ile yazılan fiber çapı, nozulun çapından birkaç kat daha küçük olabilir. Bu nedenle, yüksek oranda viskoz kolloidal çözeltiler veya viskoz polimerik sıvıların yazımında özellikle

faydalı olarak yazımda kullanılan nozulu daha küçük çaplı bir nozul ile değiştirmeden çok daha ince çözünürlükte basım yapılmasını sağlar (Altun ve ark., 2018b).



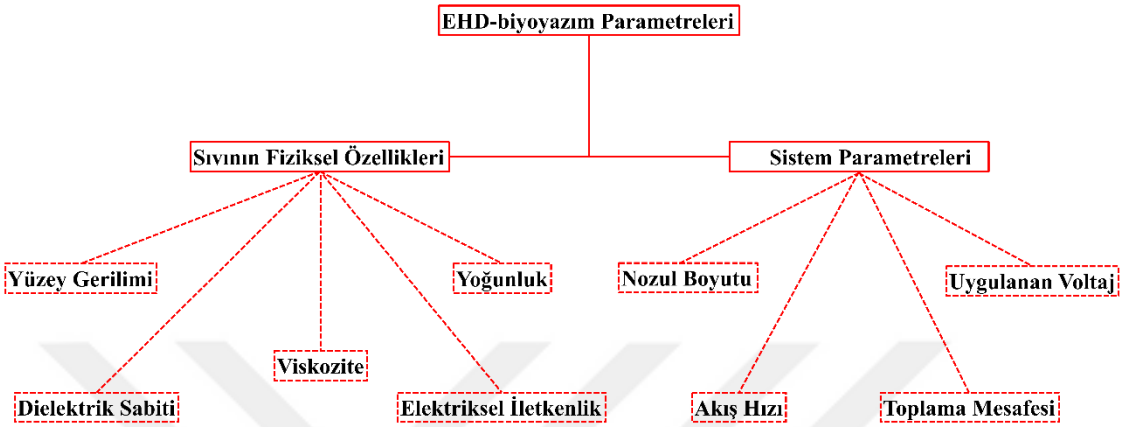
Şekil 1.5. (A) Elektrohidrodinamik (EHD)-biyoyazım sisteminin şeması ve (A) EHD-biyoyazım sisteminin dijital görüntüsü (Wang ve ark., 2017).

Bu teknik, aynı zamanda, daha küçük doku iskeleti boyutlarının üretilmesine de olanak tanır, çünkü mikro boyuttaki ince nozullar, işlem süresi boyunca kontrol edilerek çok küçük hacimlerin taşınmasına yardımcı olarak düşük bir polimer akış hızı ile üretim sağlanabilir (Youn ve ark., 2009).

EHD-biyoyazımın kontrol edilebilir bir şekilde belirli numune deseni birikmesine izin verdiği yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır (Meier, 2000). Bu yüzden yöntem, karmaşık ve yüksek çözünürlüklü doku iskeleti yapımında için büyük bir potansiyele sahip olduğundan ve nanoteknolojiye yeni yollar açtığından son yıllarda biyomedikal çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (Ahn ve ark., 2011; Rasekh ve ark, 2011; Youn ve ark., 2009).

1.2.3.1.1. Yöntem parametreleri

EHD-biyoyazım sürecini etkileyebilecek birçok parametre arasında en kritik olanlar **Şekil 1.6**'da özetlenmiştir.



Şekil 1.6. EHD biyoyazım için ana işlem parametreleri.

1.2.3.1.2. EHD-biyoyazım yönteminin ilaç salınım çalışmalarında kullanılması

İlaç taşıyıcı sistemler (İTS), hastalıklardan muzdarip hastalara daha etkili ve yan etkisiz tedaviler sağlamak için son birkaç yılda kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. En yaygın İTS formları oral tabletler, sıvı enjeksiyon, yamalar, mikroküreler, hidrojeller, lipozomlar, miseller ve nanopartiküllerdir (Langer, 1990). Bununla birlikte, bu tür ilerlemelere rağmen, ilaç salım hızı ve süresinin kesin kontrolünde hala zorluklar yaşanmaktadır. Ağızdan alınan ilaçlar, enjeksiyon veya yama sistemleri gibi geleneksel uygulama yöntemleri, insan vücudunda kısa süreli ilaçlara yol açmakta ve terapötik etkilerin elde edilmesi için tekrarlı uygulama gerektirmektedir (Saltzman, 2001). Mikroküreler veya hidrojeller gibi yeni geliştirilen İTS, ilacın erken salınımına sebebiyet verme ve hala çeşitli modifikasyonlarla sıfır dereceli salım elde etmek için araştırma aşamasındadırlar (Berchane ve ark., 2010; Wei ve ark., 2009; Ranganath ve ark., 2009). Nanoparçacık tabanlı İTS, gelişmiş hedefli ve hücre içi dağıtım göstermiş olmasına rağmen, bu tür nanoparçacık sistemlerinin uzun vadeli sıfır dereceli salım özellikleri hala araştırılmaktadır (Bhattacharyya ve ark., 2012).

İlaçlar ayrıca, polimer solüsyonunda çözünme veya dispersiyon yoluyla üretilen fiber içine gömülebilir. Doku mühendisliği iskeletine entegre edilmiş kontrollü ilaç bırakma fonksiyonu, doku gelişimi veya rejenerasyonu ve karmaşık doku mikroçevresini taklit

etmek için oldukça etkilidir (Quaglia, 2008; Saltzman ve ark., 2002). Mürekkep püskürtmeli yazıcılar gibi yazım sistemleri, termal veya mekanik harekete geçirme mekanizmalarını kullanarak yüksek yerleştirme doğruluğu ile küçük boyutlu doku iskeleti üretimi gerçekleştirebilir. Bu tür mürekkep püskürtmeli tekniklerinin kullanılmasıyla, uygun bir ortamda çözünmüş ilaç molekülleri, ilaç dağıtım sistemlerinin haznelerine de basılabilir. Bununla birlikte, mürekkep püskürtmeli baskı, onlarca mikrometreden daha küçük olan yazım işlemlerinde sınırlıdır ve onlarca mikrometreye ölçeklendiğinde ilaç dağıtım sistemi işlevi için gereken ürünü veremez (Park ve ark., 2008). Öte yandan, EHD-biyoyazım teknolojisi, mikrometre ölçeğinin altındaki desen boyutuna ulaşmak için üretilmiş bir tekniktir ve nispeten yüksek çözünürlük, ortam sıcaklığında çalışabilme, tek adımlı üretim ve potansiyel karmaşık 3B yapı hazırlanması için uygun bir yöntemdir (Huang ve ark., 2013).

Wang ve ark. (Wang ve ark., 2017) EHD-biyoyazım yöntemi ile polikaprolakton (PCL), polivinil pirolidon (PVP) ve bunların kompozit sistemi (PVP-PCL) kullanılarak antibiyotik yüklü (tetrasiklin hidroklorür, TE-HCL) doku iskeletleri imal etmişlerdir. PCL-PVP dozaj formlarından antibiyotik ilaç salınımını 5 gün boyunca incelediklerinde, bu örneklerden saf PCL veya PVP'ye kıyasla daha yavaş antibiyotik salınımı yapıldığını ve yazdırılan doku iskeletlerinde fiberler arası boşluk büyüklüğünün de antibiyotik malzeme salınım davranışını etkilediğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmanın sonucu olarak araştırmacılar, EHD-biyoyazım yönteminin dozaj formlarını minimum yardımcı maddeler ve işlemler ile tek adımda uyarlamak için umut vaadeden bir yöntem olduğu yargısına varmıştır.

1.2.3.1.3. EHD-biyoyazım çalışmalarında kullanılan biyomalzemeler

Daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi, biyoyazım ilkesi, sıvı formundaki biyomateryalin, tüm doku iskeleti üretilinceye kadar katman katman şeklinde basılmasıdır. Sıvı formdaki biyomalzeme, baskı kafasından ayrıldıktan hemen sonra, üretilen şekli korumak için katılaşır. Soldan jele veya faza geçiş prosesine dönüştürme prosesi, biyomalzemenin biyoyazım işleminde kullanılmasında en önemli özelliktir. Polimerler ve kompozitler bu yöntemde yaygın olarak kullanılmaktadır, çünkü bunlar çeşitli yöntemlerle polimerize edilebilmekte ve “3B yazdırılabilir” hale getirilmektedir. Seramik malzemeler de 3B yazıcıda kullanılan bir diğer biyomalzeme grubudur.

Biyomalzemeleri 3B yazıcı işlemleri için uygun hale getirmede önemli faktörler, reolojik özellikler ve çapraz bağlama metodudur.

Doku mühendisliği çalışmalarında biyomalzeme kullanımı için temel kısıtlama, hücre canlılığını ve hücre işlevselliğini destekleyen ECM'yi taklit etme kabiliyetidir. Bu nedenle çalışmalarda biyomalzemelerin yüzey kimyası, yüzey reaktivitesi, yüzey pürüzlülüğü, yüzey yükü, temas açısı ve sertlik gibi özellikleri göz önüne alınmalıdır (John ve ark., 2015). Bu özellikler, sırasıyla, hücre-biyomalzeme etkileşimlerini ve hücre-hücre etkileşimlerini belirler. Bu hücre etkileşimleri, doku iskeletinin başarısını belirleyen hücre tutunması, canlılık ve farklılaşmanın anahtarıdır.

Biyomalzemeler sadece hücre tutunması için fiziksel destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda ilaçlar, proteinler, büyüme faktörleri ve kimyasal ajanlar gibi terapötik maddelerin de taşınımını sağlarlar. Biyomalzemeler olarak kullanılan polimerik yapıların, ilaçların ve proteinlerin stabilitesini artırma ve serbest bırakmayı kontrol etme yetenekleri nedeniyle ilaç salınımında avantajlı olduğu gösterildiğinden, çeşitli polimerler hedef bölgeye etkili ilaç verilmesi için araştırılmıştır (Béduneau ve ark., 2006). Bu amaçla kullanılan birçok polimerin genellikle biyolojik olarak parçalanabilir (vücut için zehirli olmayan parçalanma ürünleri ile) ve mükemmel bir biyolojik uyumluluk sunduğu bilinmektedir.

Hem biyo-hem de sentetik polimerler hücre yapışmasını iyileştirmek için doku iskeletleri, çoğalmayı engellemeden farklılaşmış hücre fonksiyonunun korunması, hücrelerin büyümesinin uyarılması ve desen olarak düzenlenmesi ve hücre dışı matrisin (ECM) işlevine yardımcı olması için kullanılabilir (Anderson, 1988; Thomson ve ark., 2000). Bu polimerlere örnek olarak kollajen, bakteriyel selüloz, poli (kaprolakton) (PCL), poli-L-laktik asit (PLLA), poliüretan (PU) gibi doğal ve sentetik biyomalzemeler örnek verilebilir. Bu polimerlerin avantajlı özelliklerinin bir araya getirilmesi ile oluşturulan polimer karışımları, doku mühendisliği uygulamalarında yeni, cazip biyokompozitlerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Cheng ve ark., 2003).

Bu tez çalışmasında sentetik polimer ve doğal polimerler kompozisyonu EHD biyoyazım işleminde kullanılmıştır.

1.2.3.1.3.1. Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, 3B yazıcı için çoğunlukla kullanılan biyomalzemelerdir. Hem biyobozunur hem de bozunabilir polimerler 3B yazıcı için mevcuttur, fakat biyo-bozunabilir polimerler daha avantajlıdır ve bu nedenle yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda birçok sentetik polimer geliştirilmiştir ve bu polimerler ayarlanabilir degradasyon oranlarına sahiptir. Degradasyon oranı yeni doku formasyonunun hızına (her doku için farklı bir süre) uyması gerektiğinden kritik öneme sahiptir (Metcalfe ve ark., 2007). Bunun yanında doğal ve sentetik polimerlerin kombinasyonları da doku iskeleti üretiminde kullanılır. Biyoyazımda kullanılan polimerler genellikle iki fiziksel fazdan, katı veya sıvıdan oluşurlar. Katı polimerler erimiş çökeltme modelleme yapan yazıcılarda kullanılırken, sıvı polimerler ekstrüzyon ve mürekkep püskürtmeli yazıcılarda kullanılır.

Sentetik polimerler, biyo-bozunur polimerlerin en önemli kısmını içerir. Hasarlı dokunun yapısını ve işlevini tamir etmesine yardımcı olurlar. Sentetik polimerler kontrollü yapıya, yüksek işleme esnekliğine, immünolojik kullanıma uygun olmaları ve uzun raf süresine sahip olmalarından dolayı, doğal polimerlere kıyasla doku iskeleti olarak kullanımda avantaj sağlarlar. Ayrıca, gerilme mukavemeti, elastik modül ve degradasyon oranı gibi mekanik ve fiziksel özellikler, sentetik polimer kullanımı ile istenilen dokunun özelliklerine bağlı olarak değiştirilebilir (BaoLin ve ark., 2014).

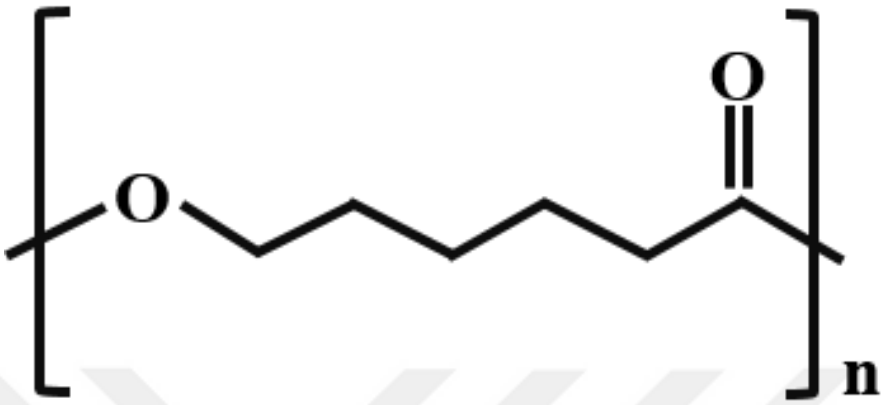
En yaygın olarak kullanılan sentetik ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, poliesterlerdir ve bunlara örnek olarak Polilaktik asit (PLA) ve polikaprolakton (PCL) polimerleri örnek verilebilir (Gunatillake ve ark., 2003). Bu tez çalışmasında bu polimerlerden PCL, sentetik polimer olarak kullanılmıştır.

1.2.3.1.3.1.1. Polikaprolakton (PCL)

Kimyasal yapısı **Şekil 1.7**'de gösterilen polikaprolakton (PCL), heksanoat tekrar birimlerinden oluşan ve hidrofobik davranış sergileyen alifatik, yarı kristal ve biyo-bozunur polyesterdir. İyi çözünürlüğü, yavaş degradasyon oranı ve düşük erime sıcaklığı, PCL'nin diğer biyopolimerlere göre avantajlarından sadece birkaçıdır.

PCL, çeşitli alanlarda, özellikle iyi biyolojik ve fiziksel özellikleri nedeniyle doku mühendisliğinde doku isketleri olarak geniş uygulanabilirliğe sahiptir. Çoğu polimerin aksine PCL, iskelet yapısını geliştirirken son derece güvenilirdir (Kim ve ark., 2006).

Ayrıca, canlı hücrelerin doku iskeleti yapısına başarılı bir şekilde entegre edilmesi için biyouyumluluk gibi kritik tasarım gereksinimlerini karşılar (Labet ve ark., 2010; Albrecht ve ark., 2016).



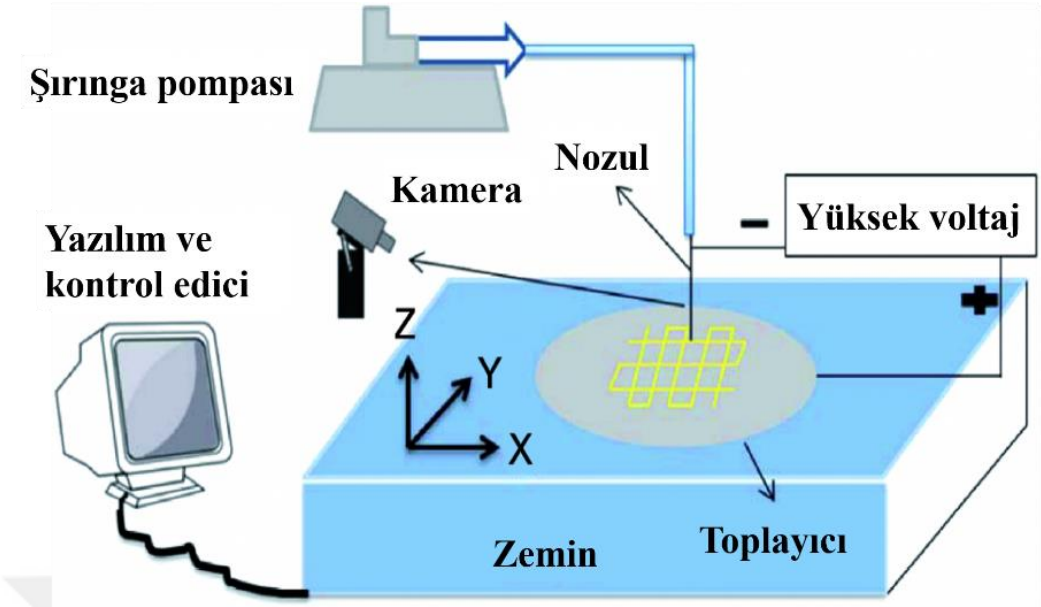
Şekil 1.7. Polikaprolakton (PCL) kimyasal açılımı.

İdeal olarak doku mühendisliğinde, bir doku iskeleti aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

- Hücre büyümesine ve besin maddelerinin taşınmasına izin verecek yüksek gözeneklilik ve birbirine bağlılık,
- Kontrollü bozunma ve rezorpsiyon hızı ile ilişkili biyo-uyumluluk ve biyo-çözünürlük,
- Hücre gelişim süreçleri için uygun yüzey kimyası tutma yeteneği,
- İlgili dokuların mekanik özelliklerine uygunluk (Hutmacher ve ark., 2001).

Bu nedenle, PCL doku iskeleti üretimi çalışmalarında aşağıdaki temel özellikleri ile kullanılır:

- Diğer polimerlere kıyasla esnekliği ve tıbbi uygulamalarda kullanılan polimer karışımlarında uygunluğu,
- 280-330°C arasında değişen bir bozunma sıcaklığı içeren iyi termal stabilitesi,
- FDA onayına sahip olmasının yanı sıra yumuşak ve sert dokularla uyumluluk göstermesi ve 24-36 ay arasında insan vücudunda bir degradasyon hızı ortaya koyması,
- Düşük maliyetli olması (Ragaert ve ark., 2014).



Şekil 1.8. EHD-biyoyazım sisteminin kavramsal diyagramı (Wang ve ark., 2016).

Wang ve arkadaşları (Wang ve ark., 2016) **Şekil. 1.8**'de gösterildiği gibi EHD-biyoyazım işlemini PCL polimeri üzerinde denemişler, üretilen fiber çapına çeşitli parametrelerin etkilerini ayrıntılı olarak incelemişler ve bu parametreler arasındaki ilişkinin oldukça karmaşık olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu nedenle, kararlı, düzenli, sürekli fiberler ve dolayısıyla iyi yapısal ve uzamsal özelliklere sahip doku iskeletlerinin yazımı için EHD-biyoyazımın optimum parametrelerinin ayrıntılı bir biçimde çalışılması gerektiği yargısına varmışlardır.

1.2.3.1.3.2. Doğal polimerler

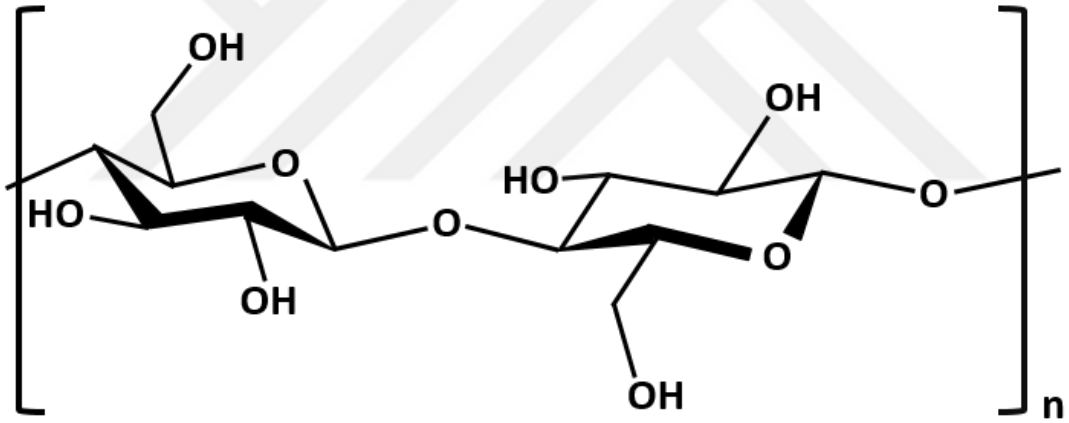
Doğal polimerler, biyo-bozunur biyomalzemeler olarak kullanılırlar ve biyo-uyumlulukları, biyo-bozunmaları, minimal antijenisite ve enflamatuar yanıtları ile doku iskeleti olarak kullanıma uygun olurlar. Öte yandan, doğal polimerlerin dezavantajları, mikrobiyal kontaminasyon ve kontrolsüz biyodegradasyon riskidir.

Doğal polimerler proteinler (kollajen, ipek, jelatin, fibrinojen, elastin, keratin, aktin ve miyozin), polisakkaritler (kitosan, selüloz, amiloz, dekstran ve glikosaminoglikan) ve polinükleotitler (DNA ve RNA) olmak üzere üç ana gruptan oluşur (Mitra ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında polisakkaritlerden bakteriyel selüloz (BC) doğal polimer olarak kullanılmıştır.

1.2.3.1.3.2.1. Bakteriyel selüloz (BC)

Kimyasal yapısı **Şekil 1.9**'da gösterilen bakteriyel selüloz (BC) genellikle suda çözünmeyen, esnek, biyolojik olarak parçalanabilir, yüksek gerilme mukavemeti olan elastik bir biyopolimerdir. Ek olarak, kristalinite, biyouyumluluk ve yüksek geçirgenlik gibi benzersiz fiziksel ve mekanik özelliklere sahiptir. Bu özel özelliklerin tümü, doku mühendisliği uygulamaları için BC'yi yararlı kılmaktadır (Qiu ve ark., 2016; Altun ve ark., 2018c)

BC, ayrıca, biyouyumluluk, hidrofiliklik ve toksik olmama, doku mühendisliği uygulamalarında iskelet için gerekli olan mekanik özellikleri sağlama (Hutmacher, 2000) gibi özellikleri ile çeşitli alanlarda, özellikle biyomedikal ve biyoteknolojide (Dahman, 2009) diğer biyobozunur polimerlerle karşılaştırıldığında geniş bir uygulama yelpazesi için potansiyel bir adaydır.



Şekil 1.9. Bakteriyel selüloz (BC) kimyasal açılımı.

BC yüksek gözenekliliği ve yüzey alanı ile antimikrobiyal ajanların, ilaçların ve diğer biyo-fonksiyonel materyallerin giriş ve salınımını sağlar (Shah ve ark., 2013). Tüm bunlara ek olarak BC, hücre dışı matris bileşenleri ile ortak özellikleri paylaşır (Altun ve ark., 2018d).

Tüm bunların yanında, BC polimerinin EHD-biyoyazımda kullanıldığı örnek bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışması literatüre yenilik sağlayacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Malzemeler

2.1.1. Polimerler

- Polikaprolakton (PCL, Sigma - Aldrich):

Polikaprolakton ($C_{6n}H_{10n}O_{2n}$) ağırlıkça molekül ağırlığı (M_w): 80000 g/mol. Doku iskeletlerinin üretimi için kullanılmıştır.

- Bakteriyel selüloz (BC, Medipol Üniversitesi (İstanbul, Türkiye) Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü):

Bakteriyel selüloz ($C_{6n}H_{10n}O_{5n}$) doku iskeletlerinin üretiminde kullanılmıştır.

2.1.2. Model ilaç

- Amoksisilin (AMX, Sigma - Aldrich):

Amoksisilin ($C_{16n}H_{19n}N_{3n}O_{5n}S_n$) ağırlıkça molekül ağırlığı (M_w): 365,4 g/mol. Model ilaç olarak deney çalışmaları süresince kullanılmıştır.

2.1.3. Kimyasal malzemeler

- Dimetilformamid (DMF, MERCK):

Dimetilformamid ($HCON(CH_3)_2$) molekül ağırlığı 73,09 g/mol'dür. Bakteriyel selüloz'dan çözelti hazırlanması aşamalarında kullanılmıştır.

- Diklorometan (DCM, MERCK):

Diklorometan ($(CH_2)Cl_2$) molekül ağırlığı 84,93 g/mol'dür. PCL çözeltisi hazırlanması aşamalarında kullanılmıştır.

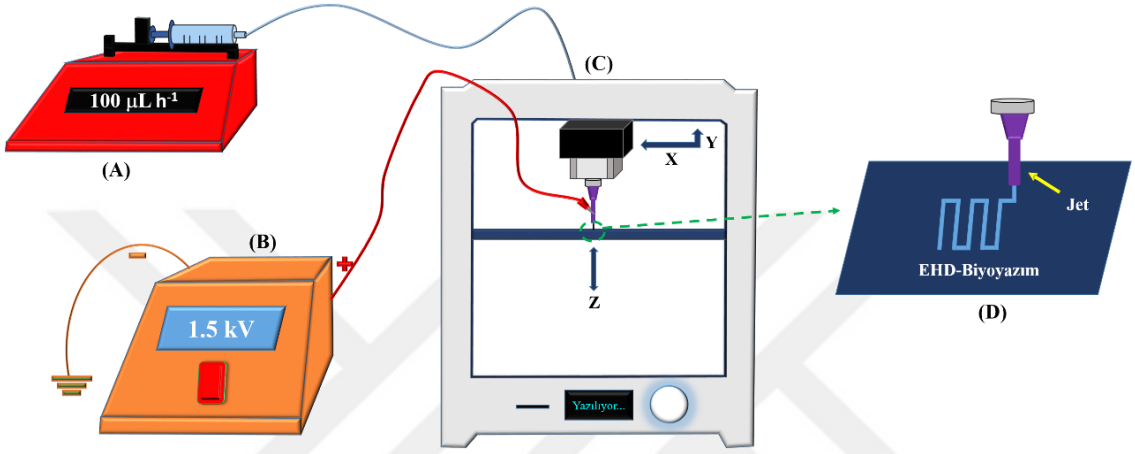
- Fosfat Tampon Çözeltisi Çözeltisi (PBS, Sigma - Aldrich):

Fosfat tampon çözeltisi çözeltisi, pH 7,4 derecesine sahiptir ve ilaç salınım deneylerinde kullanılmıştır.

2.2. Cihazlar

2.2.1. EHD-biyoyazım sistemi

Çalışmalarda kullanılan EHD-biyoyazım sisteminde bulunan 3B yazıcı Ultimaker 2+ modeldir. **Şekil 2.1**'de bu tez çalışması için özelleştirilmiş EHD-biyoyazım sisteminin şematik çizimi gösterilmiştir.



Şekil 2.1. EHD-biyoyazım sisteminin şematik çizimi ve parçaları: (A) programlanabilir şırınga pompası, (B) yüksek voltaj güç kaynağı, (C) laboratuvarda yeniden düzenlenmiş bir X-Y ekseni hareketi sağlayan kontrol kafası, cam alt tabaka tutucu, Z ekseni doğrultusunda hareket eden nozul tutucusundan oluşan EHD-biyoyazım sistemi ve (D) 1 mm çalışma mesafesinde EHD-biyoyazım gösterimi.

2.2.2. Viskozimetre

Viskozite, akışkan malzemelerin akmaya karşı gösterdikleri dirençtir. Viskozite analizi için Brookfield markalı, DV-E modelli cihaz kullanılmıştır (**Şekil 2.2**). Solüsyonların viskozite değerleri 100 rpm'de belirlenmiştir ve analizler esnasında ortam sıcaklığı 24°C, ortam nemi ise %52 RH değerlerinde sabit tutulmuştur.



Şekil 2.2. Analizlerde kullanılan viskozimetre.

2.2.3. Elektriksel iletkenlik

Elektriksel iletkenlik maddelerin elektrik akımı iletebilirliklerinin bir ölçüsüdür. Elektrik iletkenliği analizi için WTW markalı, Cond 3110 SET1 modelli cihaz kullanılmıştır (**Şekil 2.3**) ve analizler esnasında ortam sıcaklığı 24ºC, ortam nemi ise %52 RH değerlerinde sabit tutulmuştur.



Şekil 2.3. Analizlerde kullanılan elektriksel iletkenlik ölçüm cihazı.

2.2.4. Yüzey gerilimi

Sıvı yüzeyini 1 m^2 veya 1 cm^2 büyütmek için sabit sıcaklık ve basınçta uygulanması gereken enerjiye, başka bir deyişle sıvının yüzeyindeki birim uzunluğu gergin tutan kuvvete yüzey gerilimi adı verilir. Bu çalışmada yüzey gerilimi ölçümleri Du Noüy Halka yöntemi kullanılarak Kruss markalı, Kruss K100SF modelli cihaz kullanılarak ölçülmüştür (**Şekil 2.4**) ve analizler esnasında ortam sıcaklığı 24ºC, ortam ise %52 RH değerlerinde sabit tutulmuştur.



Şekil 2.4. Analizlerde kullanılan yüzey gerilimi ölçüm cihazı.

2.2.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu, vakum ortamında katı malzeme yüzeylerinin 3-boyutlu morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan, yüksek çözünürlüklü görüntü elde etmeyi sağlayan bir cihazdır. Deney çalışmaları esnasında EHD-biyoyazım ile üretilen doku iskeleti örneklerinin morfolojik tespitleri için ve hücre testi deneylerinden sonra elde edilen örnekler üzerinde hücre tutunması ve yayılmalarını göstermek için kullanılmıştır**. Şekil 2.5**'de çalışmada kullanılan ZEISS markalı, MA/EVO10 modelli SEM cihazı gösterilmektedir. SEM incelemelerinden önce malzemelerin elektrik iletkenliği kazanabilmeleri için numuneler mikroskobik cam slaytlara yerleştirilmiş, çift

taraflı iletken bant ile bir örnek saplama üzerine monte edilmiş ve daha sonra örnekler SEM görüntüleme öncesinde bir Quorum markalı, SC7620 modelli cihaz (**Şekil 2.6)** ile 60 saniye Altın (Au) ile kaplanmıştır.



Şekil 2.5. Analizlerde kullanılan taramalı elektron mikroskobu (SEM).



Şekil 2.6. SEM görüntülemesi öncesinde kullanılan kaplama cihazı.

2.2.6. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektroskopisi (FTIR), incelenmek istenen numunelerin bağlarının ışığın geçirgenlik değerlerinin ölçülmesiyle numune yapısında bulunan bileşimsel özelliklerin ortaya çıkarılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Bu analiz ile örnek yapısındaki bağların ışık geçirim (%T) değerleri ölçülür.

EHD-biyoyazım ile üretilen numunelerin FTIR analizi yapılarak yapıları incelenmiş, PCL, BC ve AMX malzemelerinin doku iskeleti yapısına katılıp katılmadığı belirlenmiştir.

FTIR cihazı JASCO markasına aittir, FT/IR-4000 modeldir ve örnek incelemelerinde cihaz ATR ünitesi ile kullanılmıştır (**Şekil 2.7**). Numunelerin her bir FTIR spektrası, 4000-400 cm^{-1} aralığında olup, çözünürlük değeri ise 4 cm^{-1} alınmıştır.



Şekil 2.7. Analizlerde kullanılan fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FTIR) cihazı.

2.2.7. Ultra viole–görünür bölge (UV)spektrofotometre

UV spektrofotometre analizi, sıvı solüsyondan ışık geçirilmesiyle, geçirilen ışığın çözelti tarafından absorblanan miktarının belirlenmesi ve neticesinde kantitatif bilgi edinilmesi esasına dayanır.

Bu çalışmada, üretilen doku iskeletlerinden Amoksisilin salınımının belirlenmesi için UV spektrofotometre testi yapılmıştır. Deney çalışmalarında Shimadzu UV Mini 1280 UV-VIS Spektrofotometre cihazından yaralanılmıştır (**Şekil 2.8**).



Şekil 2.8. Analizlerde kullanılan ultraviyole-gözle görünür (UV) spektrofotometre cihazı.

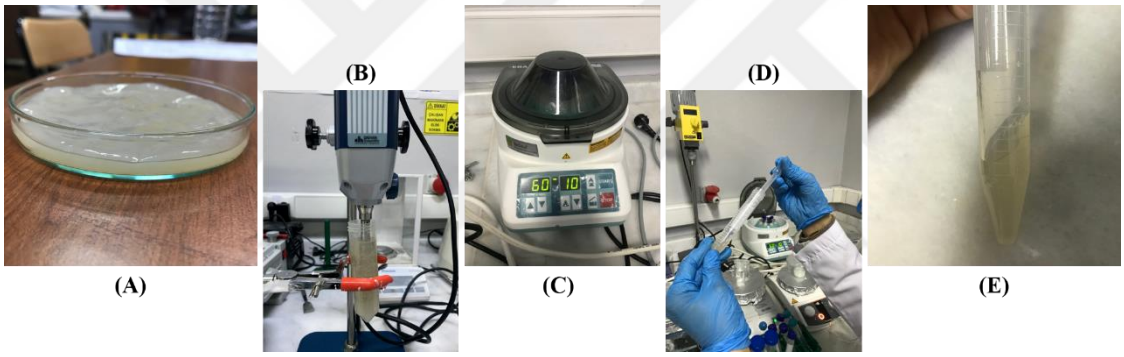
2.2.8. Diğer cihazlar

- Hassas Terazi, XB 220A, Precisa
- Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı), MSH-20A, WiseStir
- Yoğunluk ölçümü, Standart 25 ml piknometre
- Homojenizatör, Branson Sonifier 250, Branson
- Santrifüj, EBA 20, Hettich
- Programlanabilir bir şırınga pompası, NE-1000, New Era
- Güç kaynağı, 0-40 kV, Inovenso
- 3-boyutlu yazıcı, Ultimaker 2+, Ultimaker

2.3. Deneysel Metodlar

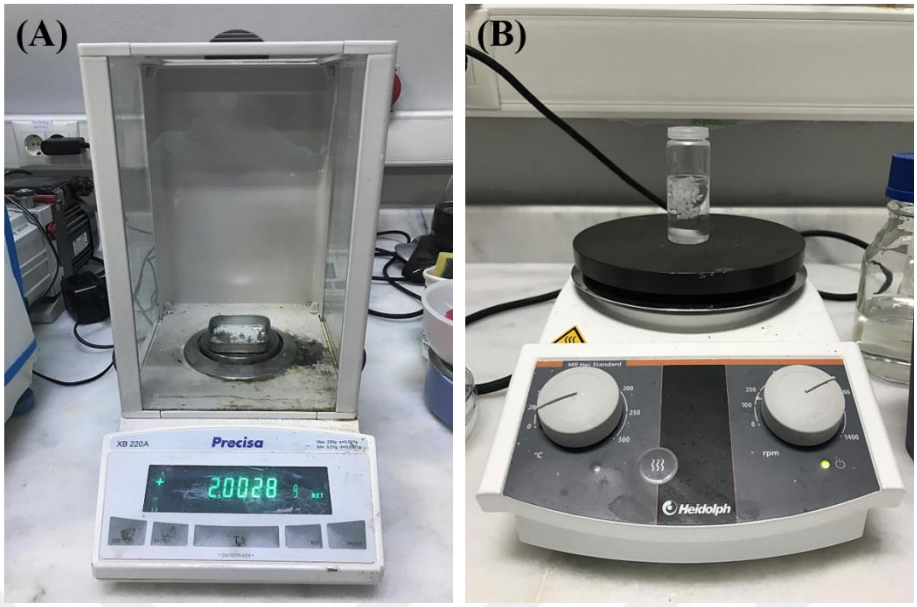
2.3.1. Polimer çözeltisi hazırlama

- BC (**Şekil 2.9A**), homojenizatör kullanılarak 1 saat boyunca DMF içerisinde sonike edilmiştir (**Şekil 2.9B**).
- Daha sonra homojenizatörde parçalanan BC santrifüj tüpüne alınmış ve 60 saniye 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir (**Şekil 2.9C**).
- Santrifüj basamağı 3 kez tekrarlanmış, her santrifüj basamağından sonra süpernatant alınmış (**Şekil 2.9D**).
- Son olarak, neredeyse hiç DMF kalıntısı ile parçalanmış BC (**Şekil 2.9E**) elde edilmiştir.



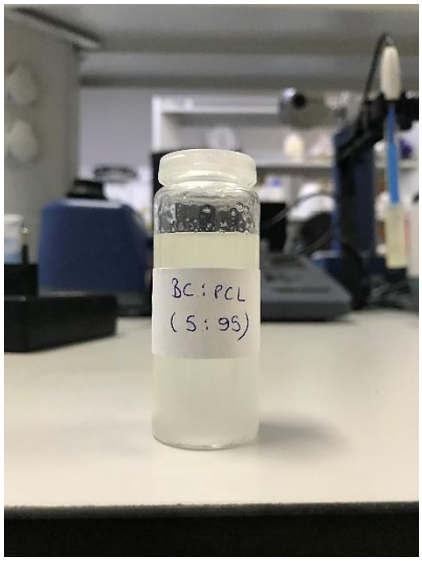
Şekil 2.9. Parçalanmış BC hazırlama aşamaları: (A) BC, (B) DMF içerisine alınan BC'nin homojenizatörde parçalanması, (C) BC solüsyonunun santrifüj edilmesi, (D) santrifüj edilen solüsyondan supernatant kısmın alınması ve (E) parçalanmış BC elde edilmesi.

Daha sonra, ağırlıkça %10'luk PCL çözeltisi, 2 saat boyunca sürekli manyetik karıştırmayla DCM kullanılarak ortam sıcaklığında (23°C) hazırlanmıştır (**Şekil 2.10**).



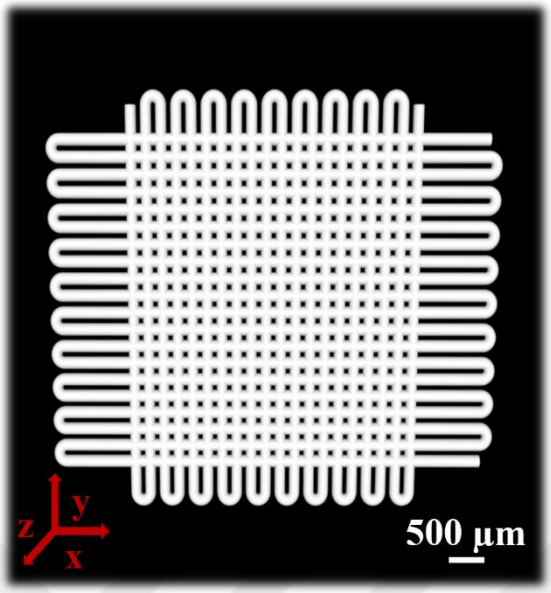
Şekil 2.10. Ağırlıkça %10'luk PCL çözeltisi hazırlanma aşamaları: (A) PCL tartımı ve (B) Manyetik karıştıcı kullanarak PCL polimerinden DCM içerisinde solüsyon hazırlama.

Son adım olarak, parçalanmış BC, ağırlıkça %10'luk PCL çözeltisi ile daha önce yapılan ön çalışmada optimum oran olarak bulunan 5:95 oranında karıştırılmıştır (Altun ve ark., 2018b) ve nihai karışım 1 saat boyunca ortam sıcaklığında (23°C) manyetik olarak karıştırılmıştır (**Şekil 2.11**). Hazırlanan solüsyonlar EHD-biyoyazım aşamasında doku iskeleti örneklerini üretmek için kullanılmıştır.



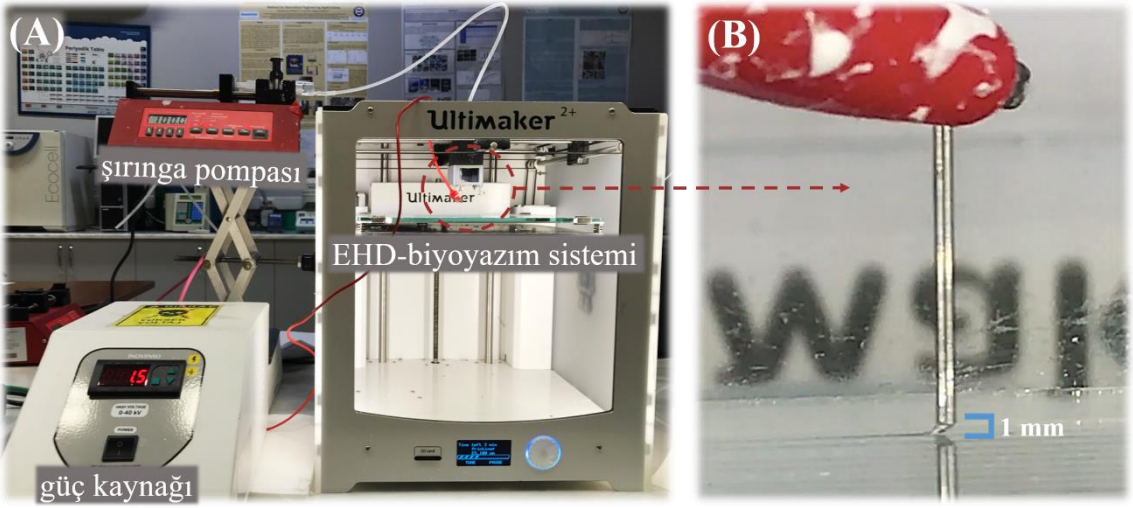
Şekil 2.11. Hazırlanmış BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) polimer çözeltisi.

2.3.2. EHD-biyoyazım



Şekil 2.12. EHD 3D-biyoyazım işlemi gerçekleştirilecek örnek için önceden SolidWorks programında tasarlanan iki katmanlı doku iskeleti formu.

EHD-biyoyazım işlemi hazırlanan solüsyonlar üzerinde önceden SolidWorks programında dizaynı yapılan iki katmanlı şekil (**Şekil 2.12**) ile gerçekleştirilmiştir ve katmanlar, tasarlanan şekilde üst üste 0°/90° açı ile istiflenmiştir.



Şekil 2.13. EHD-biyoyazım sistemi ile deneysel EHD-biyoyazım kurulumu (A) ve EHD biyoyazım işlemine daha yakın bir bakış (B).

Doku iskeletleri EHD-biyoyazımı, laboratuvarda değiştirilmiş EHD-biyoyazım sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu değişiklik için, nozul ve ısıtma kartuşu, Ultimaker 2+ yazıcıda hali hazırda bulunan baskı kafasından sökülerek çıkarılmıştır. **Şekil 2.13**'de gösterildiği gibi EHD-biyoyazım için kullanılan sistem, paslanmaz çelik nozul (21G ölçü), yüksek voltaj güç kaynağı, programlanabilir bir şırınga pompası, X-Y eksen hareketi kontrol kafası, cam substrat tutucudan ve kontrollü Z ekseni nozul tutucusundan oluşur. Nozul ve substrat arasındaki mesafe deney düzeneği için 1 mm'ye sabitlenmiştir. Çözelti akış hızı 100µL h^{-1}'de tutulmuş ve bu kurulumda uygulanan voltajın optimum değeri tüm örnekler için 1,5 kV bulunmuştur (Altun ve ark., 2018d). Tüm deneyler 24°C ortam sıcaklığı ve %52 RH ortam nemi değerleri altında gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen numuneler SEM, FTIR spektrometresi, UV ilaç salınım testi ve MTT hücre testleri ile karakterize edilmiştir. Üretim işleminden elde edilen verim **Denklem 2.1** ile hesaplanmıştır (Altun ve ark., 2018a):

$$\% \text{ Üretim verimi} = \frac{\text{Üretilen ürün ağırlığı}}{\text{Beslenen katı ağırlığı}} \times 100 \qquad \textbf{(2.1)}$$

2.3.3. Doğrudan ilaç yükleme

Bu yöntem ile, 50 mg/ml AMX doğrudan BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) polimer çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım 1 saat boyunca ortam sıcaklığında (23°C) manyetik olarak karıştırılmıştır. Hazırlanan AMX yüklü solüsyon EHD-biyoyazım aşamasında doku iskeleti örneklerini üretmek için kullanılmıştır. EHD-biyoyazımı gerçekleştirilen AMX yüklü örnekler fosfat tampon salin (PBS, pH = 7,4) içerisine konularak zamanla salınan AMX *in vitro* salım kinetiği UV spektrofotometre yöntemi ile ortaya konmuştur. Doku iskeletlerine ilaç yüklenme verimi **Denklem 2.2** ve ilaç yüklenme yüzdesi ise **Denklem 2.3** ile hesaplanmıştır (Altun ve ark., 2018a):

$$\% \text{ Yüklenme verimi} = \frac{\text{Yüklenen AMX kütlesi}}{\text{Eklenen AMX kütlesi}} \times 100 \qquad \textbf{(2.2)}$$

$$\% \text{ İlaç yüklenme} = \frac{\text{Yüklenen AMX kütlesi}}{\text{Doku iskeleti kütlesi}} \times 100 \qquad \textbf{(2.3)}$$

2.3.4. İlaç salınım denemeleri

Kütlece 50 mg/ml AMX ile doğrudan karıştırılmış BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) polimer çözeltisinin, 1 mm çalışma mesafesi, 100 µL h^{-1} çözelti akış hızı ve 1,5 kV voltaj operasyon koşullarında EHD-biyoyazımı yapılan ilaç yüklü doku iskeletleri, 50 rpm hız altında 20 ml'lik nötral (pH 7,4) ortamlara eklenerek sabit inkübasyon sıcaklığında (37°C±0,2) karıştırılmıştır. 14 gün süresince, 24 saatlik periyotlarla, 2 ml numune alınmış ve ortama yeniden 20 ml'ye tamamlanacak şekilde taze tampon çözelti eklenmiştir. Alınan numune 10 dakika boyunca 4200 rpm'de santrifüjlenerek numune içerisinde askıda kalmış olabilecek maddelerin ayrılması gerçekleştirilmiştir. Numunenin içerdiği AMX miktarı UV cihazı ile ortaya çıkarılmıştır. *In vitro* ilaç salınım kinetik parametreleri ve ilaç salınım profilleri, belirlenen periyotlarda alınan numunelerin miktarları üzerinden hesaplanmıştır. Bu profil belirlenmesinde öncelikle 229 nm'de absorbansları kaydedilerek içerisinde çözülmüş 5–200 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlara sahip AMX standart çözeltilerine dayalı bir lineer kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

2.3.5. İlaç salınım verilerinin matematiksel modellere uygulanması

İlaç salınım verilerinin matematiksel modellere uygulanması, genellikle çözünme profilini tanımlayan birkaç matematiksel denklemdir. Uygun bir fonksiyon seçildikten sonra, çözünme profilinin değerlendirilmesi gerçekleştirilebilir ve bu nedenle ilaç salım profili, ilaç salma kinetik modelleri ile korele edilebilir. Aşağıda açıklanmış olan ilaç salım kinetiklerini anlamak için çeşitli matematiksel modeller kullanılmaktadır.

Sıfır derece salım modeli (Dash ve ark., 2010): Farmakokinetik prensiplerine göre, dozaj formundan ilaç salımı **Denklem 2.4** ile temsil edilebilir.

$$C_0 - C_t = K_0 t \qquad \textbf{(2.4)}$$
$$C_t = C_0 + K_0 t$$

Denklemde C_t belirli bir t zamanda salınan ilaç miktarı, C_0 ilacın başlangıç konsantrasyonunu, K_0 ise sıfır derece oran sabitini göstermektedir.

Sıfır derece kinetikleri, bir ilaç verme sisteminden sürekli ilaç salımı sürecini tanımlar ve kandaki ilaç seviyesi, ilaç salınımı boyunca sabit kalır. Bu nedenle *in vitro* salınım çalışmasından elde edilen ilaç salınım kinetiği verileri incelemek için zamana karşı çizilir.

Birinci derece salım modeli (Dash ve ark., 2010): Birinci derece salım kinetiğini takip eden ilacın salınımı **Denklem 2.5** ile temsil edilebilir.

$$dC/dt=k\ (C_t-C_0) \quad \textbf{(2.5)}$$

Denklemde k, t^{-1} zaman ya da saat cinsinden ifade edilen birinci derece oran sabitini temsil etmektedir.

Dolayısıyla, birinci derece prosesi, reaksiyona giren ilacın konsantrasyonu ile doğrudan doğruya orantılı olduğu, yani konsantrasyonun reaksiyonu hızlandıracağı şekilde tanımlanabilir. Bu nedenle, doğrusal kinetik izler.

Birinci derece kinetikleri, *in vitro* çözünme çalışmasından elde edilen ilaç salma kinetiği verilerini incelemek için zamana karşı çizilir, yani, kalan ilacın zamana karşı logaritması ve bölge eğimi, birinci derece oranı sabitini verir.

Higuchi model (Siepmann ve ark., 2011): Higuchi kinetiğini takip eden ilacın salınımı **Denklem 2.6** ile temsil edilebilir.

$$Q=K_H \times t^{1/2} \quad \textbf{(2.6)}$$

Denklemde Q, birim alan başına t zamanında salınan kümülatif ilaç miktarı iken K_H, Higuchi çözünme sabitini temsil etmektedir.

Bir ilaç taşınım sisteminden (İTS) bir ilacın salınması hem çözünmeyi hem de difüzyonu içerir. Çeşitli matematiksel denklem modelleri, ilaç çözünmesini ve/veya İTS'den salınımı tanımlar. Kontrollü salım yapan oral formülasyonların modern çağında, "Higuchi denklemi", ilaç salınım gelişiminde önemli bir unsur olarak kabul edilen ilaç çözünme çalışmaları kullanılarak kanıtlandığı gibi, kendi başına önemli bir kinetik denklem haline gelmiştir. Bugün, Higuchi denklemi yaygın olarak kullanılan ve en iyi bilinen kontrollü salınım denklemlerinden biri olarak kabul edilir.

Korsmeyer-Peppas model (Korsmeyer, 1983): Korsmeyer-Peppas kinetiğini takip eden ilacın salınımı **Denklem 2.7** ile temsil edilebilir.

İlaç salımının temel mekanizmasının, Higuchi çizimi ile difüzyon yolu ile olduğu belirlendikten sonra, bu salınımın hangi difüzyon ile gerçekleştiğini anlamak gereklidir. Doku iskeletinden ilaç difüzyonu mekanizmasını anlamak için, serbest bırakma verileri Korsmeyer ve Peppas tarafından önerilen iyi bilinen ampirik denklem kullanılarak tespit edilmektedir. Korsmeyer ve Peppas, bir polimerik sistemden ilaç salınımını açıklayan basit bir ilişkiyi, hangi tür bir çözünmeyi izlediklerini ve bunun denklemi şu şekilde açıklarlar:

$$M_t/M_\infty = K_{kp} t^n \quad \textbf{(2.7)}$$

M_t/M_∞, t zamanında salınan ilacın fraksiyonudur,

$\log (M_t/M_\infty) = \log K_{kp} + n \log t$,

M_t, t zamanında salınan ilacın miktarı, M_∞, ∞ süre sonra salınan ilaç miktarı, n, yayılma üssü veya ilaç salma üssü, K_{kp} ise Korsmeyer serbest bırakma oranı sabitidir.

Difüzyon biçimini incelemek için, log % kümülatif ilaç salım profili (M_t / M_∞) ile log süresi (log t) arasında bir Korsmeyer ve Peppas grafiği çizilir.

2.3.6. Hücre testi

Hücre canlılık testleri için NIH/3T3 (Fare Embriyo Fibroblast) hücre dizisi (Amerikan Tip Kültür Koleksiyon (ATCC)) kullanılmıştır. Hücreler, nemlendirilmiş %5 CO_2 hava inkübatöründe %10 Fetal bovin serumu (FBS, Gibco) ve %1 penisilin/streptomisin ile Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri (DMEM, Gibco) 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücre çoğalması %80'e ulaştıktan sonra kültürler fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkanmış ve her seferinde pasaj ve hücre ekimi için %0,25 Tripsin-EDTA ile tripsinize edilmiştir. Bundan sonra, şartlandırılmış ortam, numunelerden ortam içerisine olası iyonik süzme ürünü tarafından indüklenen olası toksik etkiyi anlamak için hazırlanmıştır. Çoğalan hücreler sitotoksisite testlerinde ve elektron mikroskobu incelemelerinde kullanılmıştır.

Başlangıçta, numunelerden ortam içerisine olası iyonik süzme ürünü tarafından indüklenen olası toksik etkiyi anlamak için çalışılmıştır. Bu amaçla, 5 ml'lik taze ortam, inkübatörde tutulan PCL ve BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti numuneleri (~0,05 g) ile tüplere eklenmiştir. Koşullandırılmış ortam ekstrakte edildikten bir hafta sonra sitotoksisite testlerinde kullanılmıştır.

MTT deneyleri 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. NIH/3T3 hücreleri (kuyucuk başına yaklaşık 10^5 hücre), 2 saat boyunca UV ile sterilize edilmiş olan doku iskeletleri üzerine ekilmiş ve 24, 48 ve 72 saat sonra incelenmek üzere inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı, mitokondriyal NADH/NADHP'ye bağlı dehidrojenaz aktivitesinin belirlenmesiyle ölçülmüş olup, bu da 3-(4, 5-dimetiltiyazol-2-gl)-5-(3-karboksimetoksilfenil)-2-(4-)'sülfofenil-2H) tetrazolyum tuzunun çözünür bir formazan boyası içine hücresel dönüşümüyle sonuçlanmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonra süpernatantlar çıkarılmış ve 10 µl 3-{4, 5-dimetiltiyazol-2-il}-2,5-difenil-2H-tetrazolyum-bromür (MTT-5mg/ml-Sigma) çözeltisi her bir kuyuya eklenmiştir. 37°C'de 4 saat süreyle inkübasyonu takiben ve havada %5 CO_2 ile nemlendirilmiş atmosferde, karanlıkta tutulduktan sonra MTT aktif hücreler tarafından alınmış ve mitokondriyada çözünmeyen mor formazan granüllere indirgenmiştir (Mosmann, 1983). Daha sonra, süpernatant atılıp ve çökeltilmiş formazan, dimetil sülfoksit (kuyucuk başına 100 µL) içinde çözülmüş ve çözeltinin optik yoğunluğu, 570 nm dalga boyunda bir mikroplak spektrofotometre (Kayto RT-2100C) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Hücresel testlerden sonra, hücreler ve doku iskeletleri arasındaki etkileşimleri göstermek amacıyla, örneklerin taramalı elektron mikroskobu analizi yapılmıştır. Bu analiz için öncelikle örnekler 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının kuyucuklarına yerleştirilmiş ve iki saat süreyle sterilize edilmiştir. NIH/3T3 hücreleri bu plastik kaplara ekilmiş ve %95 hava ve %5 CO_2 ile 37°C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Her bir 24 saatlik döngü sonunda ortam çıkarılmış ve örnekler %3 hacimdeki glutaraldehit ile fikse edilip, yükselen dereceli (%30-100) alkol dehidrasyonuna tabi tutulduktan sonra elektron mikroskobu uygulamalarına kadar 20°C'de saklanmıştır.

2.3.7. Antibakteriyel aktivite analizi

Model organizmalar olarak gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*) ve gram-negatif (*Escherishia coli*) bakteriyel suşlarına karşı üretilen doku iskeleti örneklerinin antibakteriyel aktivitesini araştırmak için üretilen doku iskeletleri üzerinde agar disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

Farklı bireysel kolonilerden elde edilen bakteriyel kültürler, 37°C'de bir gece boyunca Luria-Bertani (LB) et suyunda (10 g/l bakto-tripton, 5 g/l maya özütü, 5 g/l NaCl) yetiştirilmiştir. Bakteriyel suşlar (10^7 cfu/ml koloni), steril pamuklu çubuklar kullanılarak LB-agar (15 g/l agarlı LB et suyu) levhası üzerinde inoküle edilmiştir.

Örneklerin aynı ağırlığı, bakteri ekilmiş agar plakaları üzerine yerleştirilmiş ve 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Doku iskeleti numunelerinin inhibisyon bölgeleri, her bir örneğin etrafında oluşan açık alan ölçülerek değerlendirilmiştir.

Deneyler üç kopya halinde tekrar edilmiş ve inhibisyon bölgelerinin ortalama çapı ölçülmüştür.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Fiziksel Karakterizasyon

Bu çalışmada elde edilen fiziksel karakterizasyon sonuçları **Tablo 3.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. EHD-biyoyazımı yapılan solüsyonların fiziksel özellikleri.

Örnek adı (ağırlık oranı)	**Viskozite (Pa.S)**	**Elektriksel iletkenlik (μ.S cm^{-1})**	**Yoğunluk (kg m^{-3})**	**Yüzey gerilimi (mN m^{-1})**
PCL (%10)	156±1,6	1,10±0,05	1250±0,1	29,2±0,6
BC:PCL (5:95)	363±0,5	1,20±0,06	1445±2,0	52,8±0,1
BC:PCL (5:95) + AMX	368±0,3	1,20±0,09	1448±5,0	52,9±0,1

EHD yöntemlerinde üretilen fiberlerin morfolojisini ve çapını etkileyen, çözeltiye bağlı özellikler (örneğin, polimerin türü, viskozite/konsantrasyon, elektriksel iletkenlik ve çözücünün yüzey gerilimi) ve çalışma koşulları gibi özellikler (örneğin, uygulanan elektrik alanın gücü, nozul ve toplayıcı arasındaki mesafe ve polimer çözeltisi için besleme oranı) ile çevrenin nem ve sıcaklığının dahil olduğu çeşitli parametreler vardır (Sun ve ark., 2014). Bu parametrelerin üretimi nasıl etkilediği **Tablo 3.2**'de gösterilmiştir. EHD-biyoyazımda bu parametrelerin etkileri hala araştırılmaktadır.

Tablo 3.2. Proses parametrelerinin EHD-biyoyazılmış fiber çapına etkileri.

Parametre	Fiber Çapı Etkisi	Referans
Nozul yarıçapı	Nozul yarıçapı azaldıkça ortalama fiber çapı azalır.	Katti ve ark., 2004
Akış hızı	Akış hızı azaldıkça ortalama fiber çapı azalır.	Zuo ve ark., 2005
Çalışma mesafesi	Çalışma mesafesi arttıkça ortalama fiber çapı azalır.	Chase ve ark., 2004
Polimer konsantrasyonu	Polimer konsantrasyonu arttıkça ortalama fiber çapı artar.	Zheng ve ark., 2012
Uygulanan gerilim	Genellikle, uygulanan voltajın artmasıyla fiber çapı artar.	Meechaisue ve ark., 2006
Çözücü buharlaşması	Düşük buharlaşan çözücü, fiber çapını azaltır.	Thompson ve ark., 2007
Bağıl nem	Artan bağıl nem, fiber çapını azaltır.	Tripatanasuwan ve ark., 2007
Çözücü iletkenliği	Artan iletkenlik, fiber çapını azaltır.	Zhang ve ark., 2005
Yüzey gerilimi	Yüzey geriliminin fiber çapı üzerindeki etkisi ihmal edilebilir derecede küçüktür.	Thompson ve ark., 2007

EHD-biyoyazım ile **Bölüm 2.3.2**' de verilen koşullarında ilaç yüklü doku iskeleti üretimi için verim değeri **Denklem 2.1** ile hesaplanmıştır. Denkleme göre EHD-biyoyazım altında BC:PCL (5:95) + AMX doku iskeleti üretim verimi %87,3±6,4 bulunmuştur.

3.2. Morfolojik Karakterizasyon

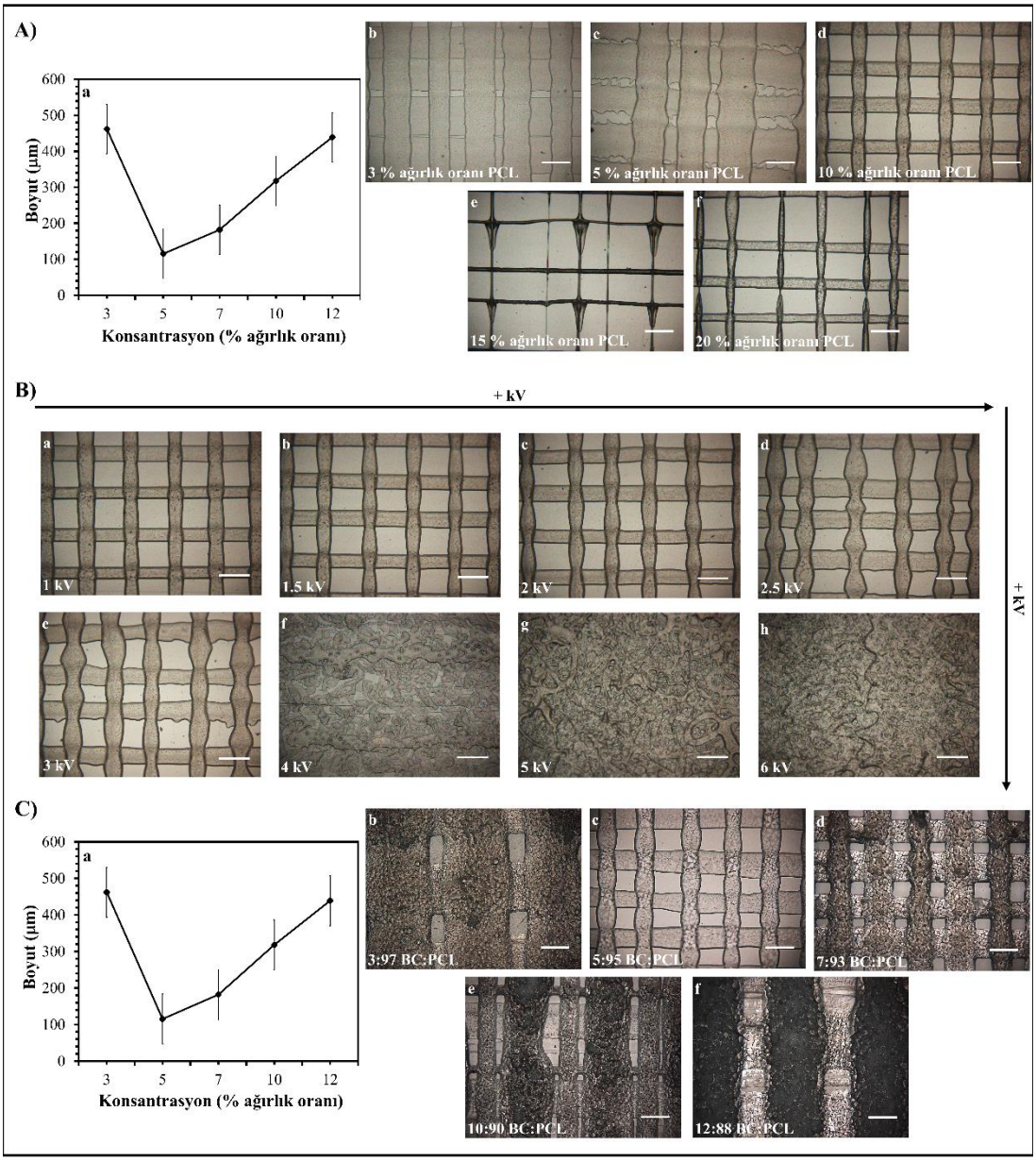
Bu çalışmanın ön çalışmalarında, EHD-biyoyazım işleminin yazımı yapılacak solüsyonun konsantrasyonundan ve solüsyon üzerine uygulanan uygulanan gerilimden etkilenebileceği bulunmuştur (Altun ve ark., 2018b).

Şekil 3.1 'de görülebileceği gibi, ağırlıkça %3 ve %10 arasında değişen PCL konsantrasyonları üzerine 1,5 kV voltaj uygulandığında EHD-biyoyazım sonucu elde edilen örneklerden %10 PCL örneği, fiber yönelimi ve malzeme üretilebilirliği ile en iyi örnek bulunmuştur (**Şekil 3.1A**)

Ayrıca, bu örnek (ağırlıkça %10 PCL) farklı voltaj değerleri altında (1-6 kV) EHD-biyoyazım işlemine tabi tutulduğunda morfolojik ve üretilebilirlik açısından en iyi sonucu 1,5 kV voltaj değeri uygulanan örnek vermiştir (**Şekil 3.1B**).

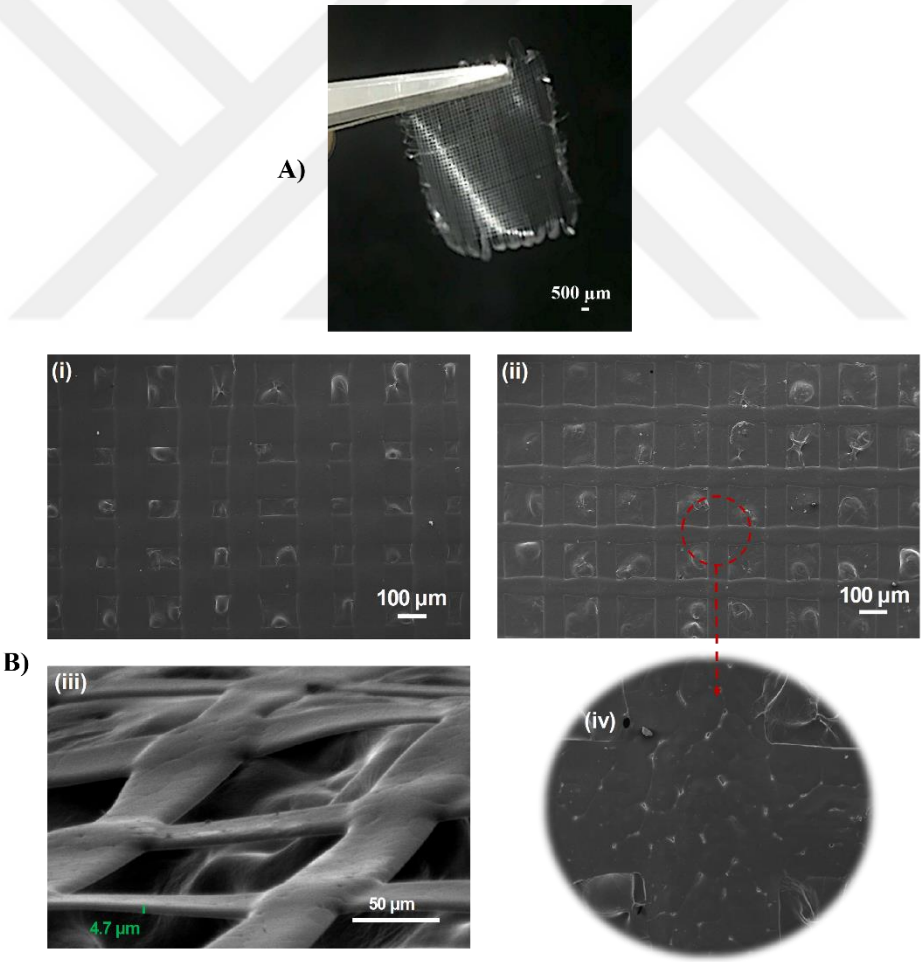
Sonuç olarak, 1,5 kV voltaj değeri ve ağırlıkça %10 PCL çözeltisi EHD-biyoyazım işlemi için optimum bulunmuştur.

Başka bir ön çalışmada ise, BC farklı miktarlarda (ağırlıkça 3,5,7,10 ve %12) olacak şekiklde PCL solüsyonu ile karıştırıldığında, 5:95 (ağırlık oranı) BC:PCL solüsyonunun ile en iyi fiber yapısı ve 100x100 μm^2 ile en iyi fiber arası boşluk boyutunu verdiği belirlenmiştir (**Şekil 3.1C**) (Altun ve ark., 2018d).



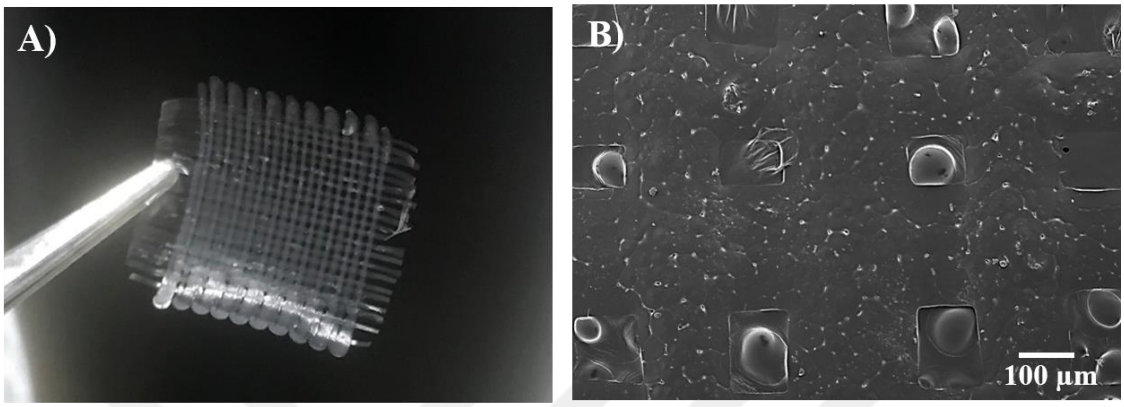
Şekil 3.1. (A) Farklı konsantrasyonda PCL solüsyonları ile hazırlanmış EHD-biyoyazılmış fiberlerin boyut grafiği fiber çap grafiği (a) ve örneklerin optik mikroskop görüntüleri (b-f). **(B)** Ağırlıkça %10 PCL solüsyonu ile EHD-biyoyazımı yapılmış örneklerin çeşitli voltaj değerleri (1-6 kV) uygulandığında elde edilen optik mikroskop görüntüleri ve **(C)** farklı konsantrasyonlarda karıştırılmış BC:PCL solüsyonlarının EHD-biyoyazım sonrası elde edilen fiber çap boyutlarını gösteren grafik (a) ve optik mikroskop görüntüleri (b-f). (Tüm ölçek çubukları 100 µm dir.)

EHD-biyoyazımı gerçekleştirilen Saf PCL (ağırlıkça %10) ve BC:PCL (**Şekil 3.2A**, 5:95 ağırlık oranı) örneklerinden ağırlıkça %10 PCL örneği için fiber arası boşlukların 40 ila 100 µm arasında değişirken (**Şekil 3.2B(i)**), BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) örneğinin 100 µm eşit dağılmış fiber aralığına sahip olduğu bulunmuştur (**Şekil 3.2.B(ii)**). Ayrıca BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti örneğinin mikrofiber derinliği 4,7±1,03 µm olarak hesaplanmıştır (**Şekil 3.2B(iii)**). SEM görüntüleri ayrıca BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti örneğinin mikrofiber yapıları üzerinde poroz yüzey bulunduğunu da ortaya çıkarmıştır (**Şekil 3.2B(iv)**). Raphael ve arkadaşları (Raphael ve ark., 2017) tarafından yapılan bir çalışmada doku iskeletlerinin gözenek yapısının ve bütünlüğünün, *in vitro* testlerde hücre hizalanmalarını, proliferasyonlarını ve canlılılıklarını önemli ölçüde etkilediği belirtilmiştir.



Şekil 3.2. **A)** EHD-biyoyazım ile üretilen BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti görüntüsü ile **B)** Saf PCL (i) ve BC:PCL (ii, 5:95 ağırlık oranı) solüsyonlarından elde edilen doku iskeletlerinin SEM görüntüleri ile BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) örneğinin katmanlarına (iii) ve mikrofiberlerinin gözenekli yüzeyine (iv) yakından bir bakış.

Çalışmanın diğer basamağı olan model ilaç AMX yüklenmiş, BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) örneği (**Şekil 3.3A**) incelendiğinde, fiber üzerinde bulunan por yapılarının hala varolduğu ve üstelik fiber arası 100x100 μm^2'lik boyutların hala korunduğu saptanmıştır (**Şekil 3.3B**).

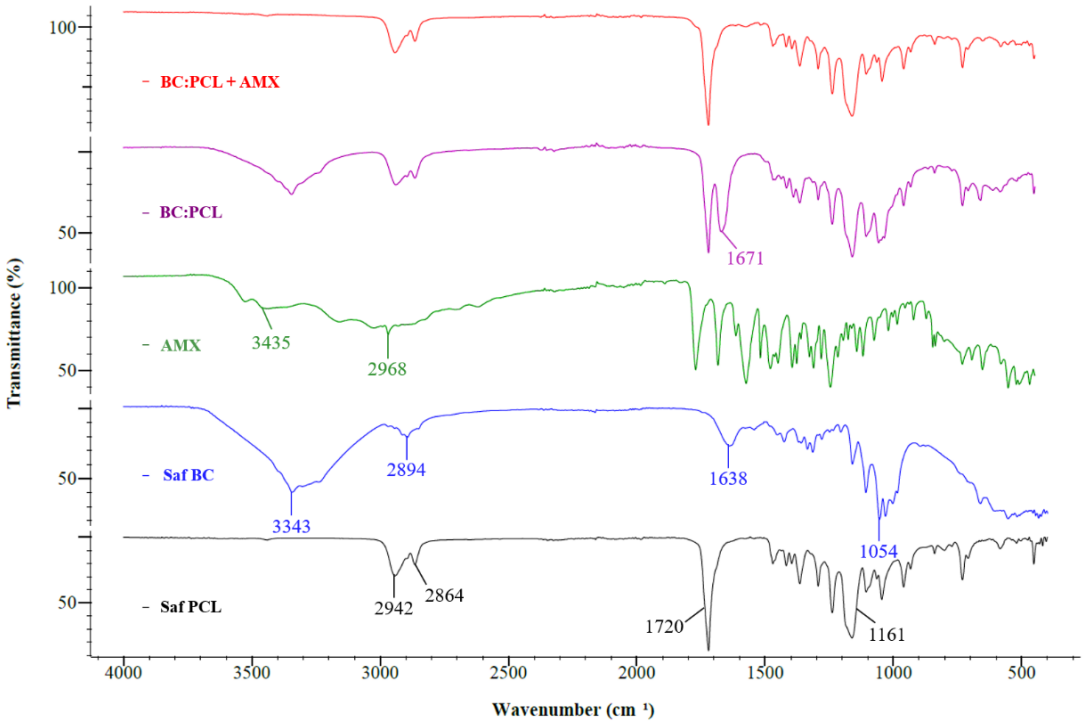


Şekil 3.3. EHD-biyoyazılmış AMX yüklü BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti örneğinin kamera görüntüsü **(A)** ve fiber arası boşlukları ile fiberler üzeri porlu yapının SEM görüntüsü **(B)**.

3.3. Kimyasal Karakterizasyon

BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) ve AMX yüklenmiş BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti örnekleri arasındaki kimyasal bağlar, **Şekil 3.4**'de gösterildiği gibi FTIR spektrumları kullanılarak analiz edilmiştir. BC, PCL ve BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskelet örneklerinin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeletinde tipik BC (3343, 2894,1638 ve 1054 cm^{-1}) ve tipik PCL (2942, 2864, 1720 ve 1161 cm^{-1}) absorpsiyon bantları gözlenmiştir (Altun ve ark., 2018d; Elzein ve ark., 2004). Ek olarak, saf BC ve PCL spektrumları ile karşılaştırıldığında, BC:PCL spektrumundaki 1638 cm^{-1}'deki absorpsiyon pikinin BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) kompozit iskelet spektrumunda 1671 cm^{-1}'e kaydığı görülebilir. Bu BC ve PCL malzemelerinin hidroksil grupları arasındaki etkileşimi göstermektedir (Aydogdu ve ark., 2018b). İlaç ve polimerin fonksiyonel grupları kimyasal olarak etkileştiği zaman, FTIR spektrumlarının saf ilaç ve polimerin spektrumlarıyla karşılaştırıldığında spektrumda bant kaymaları ve genişlemeleri göstermesi beklenir (Silverstein ve ark., 1991). AMX yüklenmiş BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti örneği incelendiğinde AMX ile BC ya da PCL arasında hiçbir kimyasal bağlanma gerçekleşmediği görülmektedir. AMX,

BC'nin hidrojen bağlarına ya da PCL'in karbonil gruplarına kimyasal olarak bağlanmamıştır. Sonuç olarak AMX, fiziksel olarak BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti örneklerine fiziksel olarak bağlanmıştır. Fiziksel olarak bağlanmış AMX, bir yarada bakterileri öldürmek için iskeletlerden kolayca ayrılabilir (Altun ve ark., 2018a).

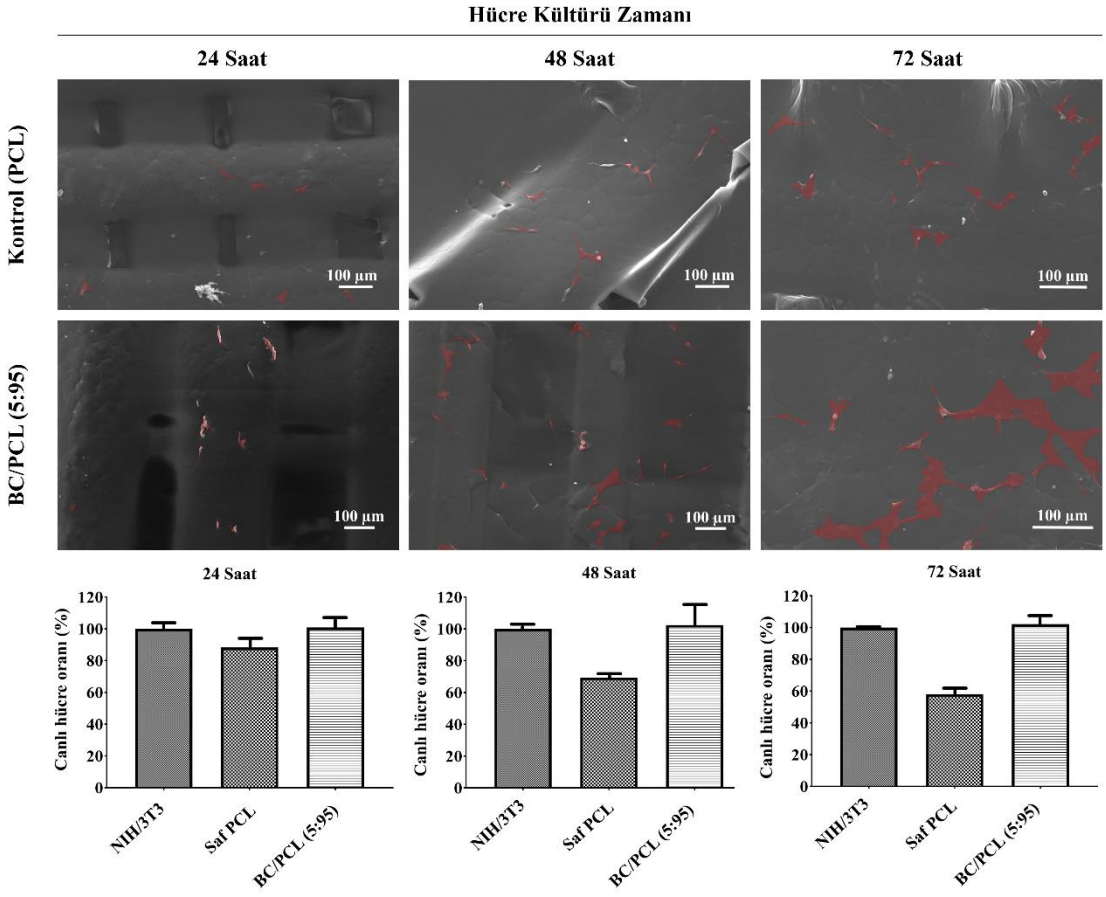


Şekil 3.4. Saf PCL, Saf BC, AMX, BC:PCL (5:95 ağırlık oranı), BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) + AMX örneklerinin FTIR grafiği.

3.4. Hücre Testi Karakterizasyonu

Doku iskeletlerinin biyouyumluluğu NIH/3T3 (Fare Embriyo Fibroblast) hücre proliferasyonu ve morfolojisi üzerinde değerlendirilmiştir (**Şekil 3.5**). 24 saat kültürden sonra, NIH/3T3 hücrelerin, BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti içerisinde bulunan mikrofiberlerin yönü boyunca yayılmaya ve uzmaya başladığı görülmüştür. 48 saat sonunda, çoğalan hücreler sadece EHD-biyoyazılmış mikrofiberlerin tüm yüzeyini kaplamakla kalmamış, aynı zamanda fiber aralıklarına da sızmıştır. 72 saatin sonunda, kültürlenmiş hücrelerin çoğaldığı ve BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti numunesi üzerinde kümeler oluşturmaya başladığı da SEM görüntülerinde açıkça görülmüştür.

Belirlenen tüm zamanlar için, BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) örneği, 24 saatlik ilk incelemeden 72 saatlik periyot sonuna kadar, saf PCL doku iskeleti örneğinden ve literatürde PCL ile yayınlanmış benzerlerinden ≥ % 100 olarak daha fazla hücre canlılığı göstermiş ve bu canlılığı 72 saat sonuna kadar korumayı başarabilmiştir (Kang ve ark., 2016; Merceron ve ark., 2015). Gözlenen yüksek hücre canlılığı düzeyi ve SEM görüntüleri incelenmesi ile gözlemlenebilen yoğun hücre proliferasyonu, BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) ile EHD-biyoyazım yönteminin hücre sağlığına zararlı olmadığını ve hücrelerin doku iskeleti üzerinde üzerindeki canlılıklarını artırabildiği gibi hücrelerin proliferasyonları için de uygun ortam oluşturduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 3.5. NIH/3T3 hücrelerinin EHD-biyoyazılmış doku iskeletleri üzerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonlarında hücre tutunması ve yayılmalarının gösterildiği SEM görüntüleri ile aynı saatler sonunda hücre canlılıklarının gösterildiği grafikler. (Kontrol hücrelerinin sayısı, grafiklerde %100 olarak ifade edilmiştir.)

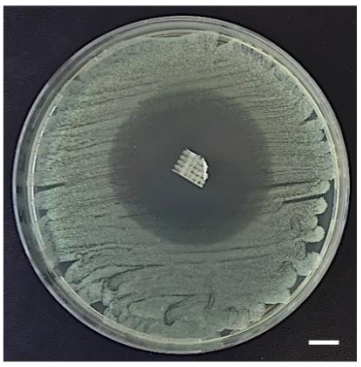
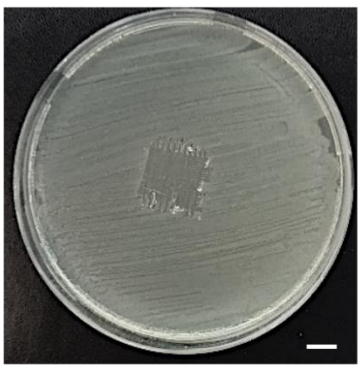
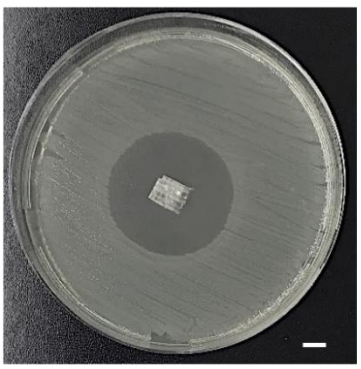
3.5. Antimikrobiyal Aktivite Analizi

Doku iskeleti örneklerinin antibakteriyel potansiyeli, EHD-biyoyazılmış iskeletlerin etrafındaki bakteriye karşı oluşturulmuş inhibisyon çapı ölçülerek değerlendirilmiştir.

Deney, üç kopya halinde gerçekleştirilmiş ve antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi için kullanılan inhibisyon bölgelerinin ortalaması alınmıştır. **Tablo 3.3**, 24 saatte örnekler etrafında oluşan inhibisyon bölgelerini göstermektedir.

İnhibisyon bölgeleri, yok edilen veya büyümesi engellenmiş olan bakteri bölgesini göstermektedir ve örnekleri çevreleyen açık bir dairesel alan olarak gözlenmiştir. BC:PCL (5:95 ağırlık oranı), negatif kontrol olarak kullanılmış ve bakterilere (*S. aureus* ve *E. coli*) karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği görülmüştür.

Tablo 3.3. İlaç yüklenmemiş BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeletlerinin ve AMX ile yüklenen BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeletlerinin *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel özellikleri. (Tüm ölçek çubukları 10 mm göstermektedir.)

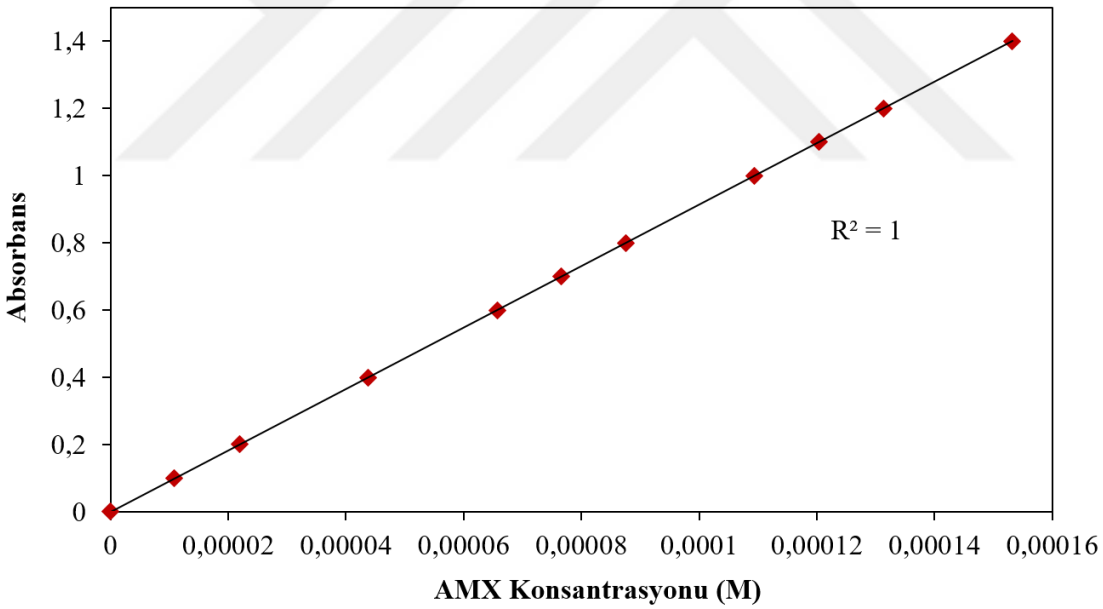
BC:PCL	BC:PCL+AMX	Örnek adı / Bakteri adı
		***S. aureus***
		***E. coli***

Tablo 3.3'deki sonuçlara göre, BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) + AMX örneği, *S. aureus*'a karşı 43 mm çapında inhibisyon bölgesi göstermiştir. Öte yandan, aynı doku iskeleti *E. coli*'ye karşı 35 mm'lik bir inhibisyon bölgesi göstermiştir. Sonuçlar, AMX 'in BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) EHD-biyoyazılmış doku iskeletlerine antimikrobiyal aktivite sağlamak için hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakteriler üzerinde etkili bir antibakteriyel malzeme olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

3.6. Doğrudan İlaç Yükleme

Doku iskeletlerinden ilaç salınım ölçümü UV metodu kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle amoksisilin standart eğrisi hazırlanmıştır.

Konsantrasyonu önceden belirlenmiş olan amoksisilin çözeltileri ile 229 nm'de absorbans değerleri, **Bölüm 2.3.4**'de açıklandığı şekilde ölçülmüş ve **Şekil 3.6**'da verilen amoksisilin standart eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 3.6. Amoksisilin standart eğrisi.

Regresyon eğrisinin denklemi grafiğe göre elde edilmiş ve **Denklem 4.1**'de verilmiştir. Bu eğrisinin R^2 (regresyon katsayısı) değeri 1'dir ve bu değer amoksisilin konsantrasyonunu hesaplamada kullanılabilir.

$$y = 9138{,}5x - 1 \quad \textbf{(3.1)}$$

Denklem 3.1'de x molar (mol/litre) türünden konsantrasyonu gösterirken, y değeri ise sıfırlama çözeltisinin absorbansı ile ölçülen numune çözeltinin absorbansı arasındaki farkı göstermektedir.

BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti örneklerine **Bölüm 2.3.3**'de anlatıldığı gibi doğrudan AMX yükleme işlemi gerçekleştirildikten sonra, **Denklem 2.2** ile ilaç yüklenme verimi ve **Denklem 2.3** ile ilaç yükleme yüzdesi hesaplanmıştır.

İlaç yükleme verimliliği, doku iskeletleri çözücüde çözdürülerek yüklenen ilaç miktarı belirlenmiştir. Elde edilen AMX yüklü doku iskeletleri DCM içerisinde çözdürülmüş ve elde edilen değerler **Tablo 3.4**'de verilmiştir.

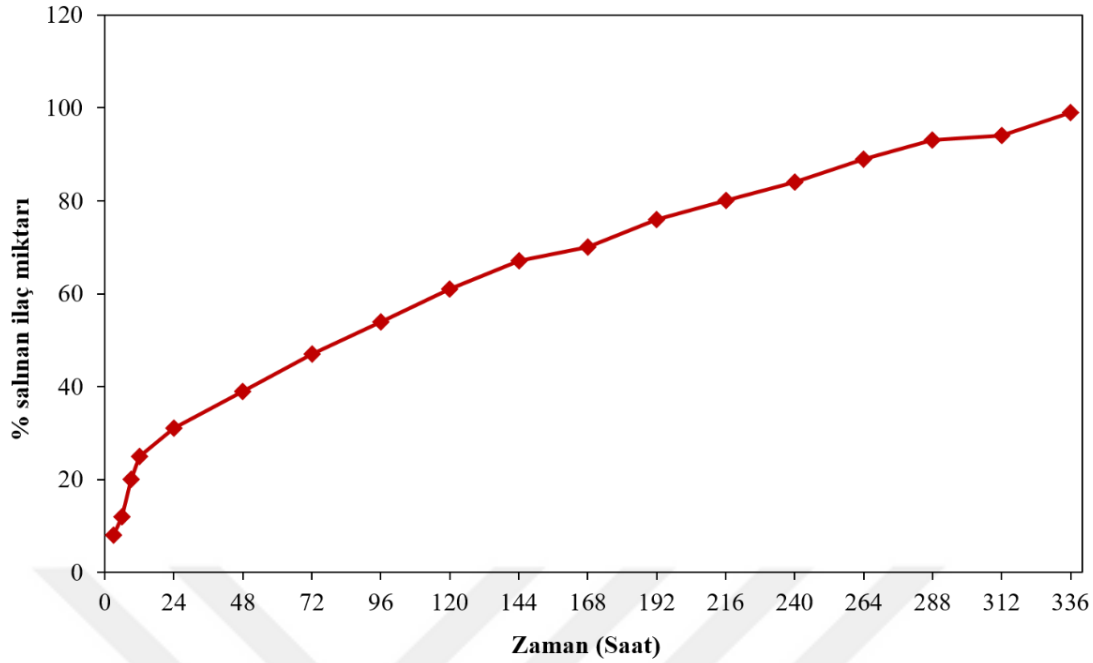
Tablo 3.4. DCM içerisinde çözülen doku iskeletleri içinde tespit edilen ilaç verimleri.

Yüklenen Miktar (mg/ml)	**Yüklenme Verimi (%)**	**İlaç Yüklenme (%)**
50	80,5±6,6	21,3±1,4

Tablo 3.4'te verilen değerler, doku iskeletlerinin AMX ilacı yüklenmesine uygun olduğunu göstermektedir. Doku iskeletlerine ilaç yüklenme verimliliği %80,5±6,6 ve ilaç yüklenme yüzdesi ise %80,5±6,6 bulunmuştur.

3.7. Doku İskeletlerinden İlaç Salınım Denemeleri

İlaçların ve ilaç etkinliğinin arttırılması, yan etkilerin azaltılması ve bu ilaçların uygulanma sıklığının azaltılması gibi avantajları nedeniyle günlerce süren ilaç salım profillerini araştırmak oldukça önemlidir (Valarezo ve ark., 2013). **Şekil 3.7**'de AMX'in üretilmiş doku iskeletlerinden salınması, 14 güne kadar izlenmiştir.



Şekil 3.7. Üretilen doku iskeletinden amoksisilin salım grafiği.

Tüm eğriler esas olarak iki aşamadan oluşur: ilk aşama, bir "ani salınım" olarak hızlı, ardından da gerçekleşen yavaş ikinci aşama. AMX salınımında ilk ani salınımın, yüzey desorpsiyonu, gözenek difüzyonu veya difüzyon sürecini düzenleyen bir difüzyon ön bariyeri içermemesi gibi bir takım mekanizmalar neticesinde olduğu literatürde açıklanmıştır (Joshy ve ark., 2011).

AMX gibi antibiyotik ilaçların salınması için, ilk ani salınım salınım aslında idealdir, çünkü yayılmaya başlayan bakterileri çoğalmaya başlamadan önce ortadan kaldırmak önemlidir. Bununla birlikte, ilk ani salınımda hayatta kalabilen birkaç organizma için arta kalan popülasyonun önlenmesi amacıyla sürekli antibiyotik salınımı gereklidir (Shin ve ark., 2001).

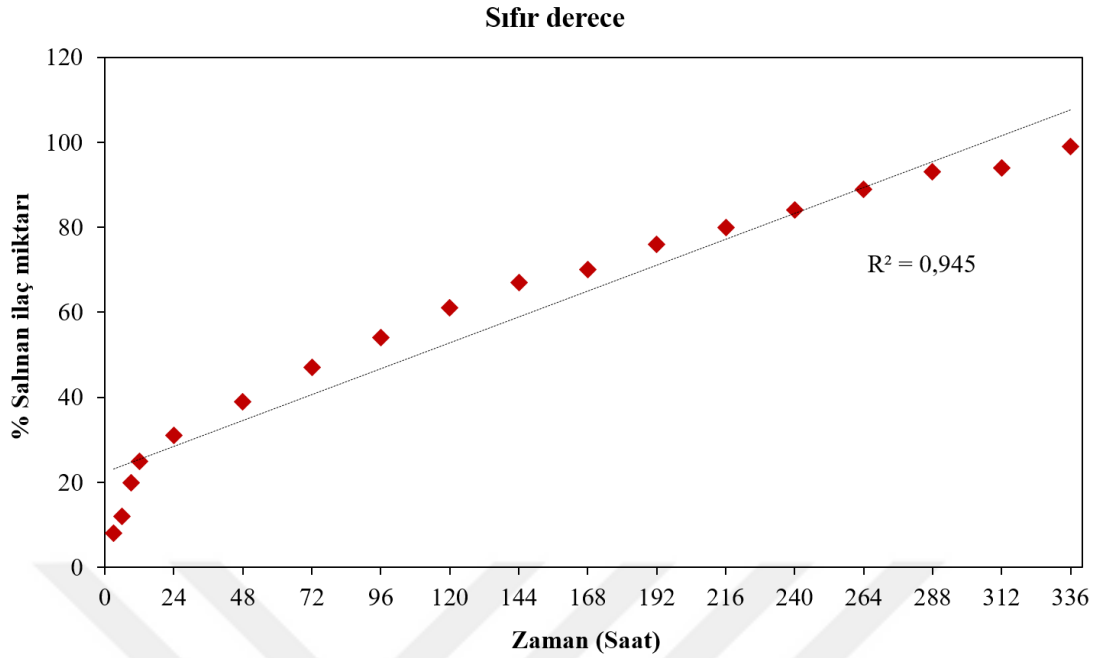
İlk ani salınımdan sonra, doku iskeleti içindeki AMX konsantrasyonuna bağlı olarak, AMX salınımında bir artış gözlenmiş, daha sonra bu artışın zamanla doğrusal ve birçok gün boyunca uzadığı görülmüştür. Örneğin, 14 gün (336 saat) sonunda (**Tablo 3.5**), BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeletinden AMX'in neredeyse tamamen salındığı (%99) gözlenmiştir.

Tablo 3.5. Amoksisilin ilaç salınım profili.

Zaman (Saat)	% salınan ilaç miktarı
3	8
6	12
9	20
12	25
24	31
48	39
72	47
96	54
120	61
144	67
168	70
192	76
216	80
240	84
264	89
288	93
312	94
336	99

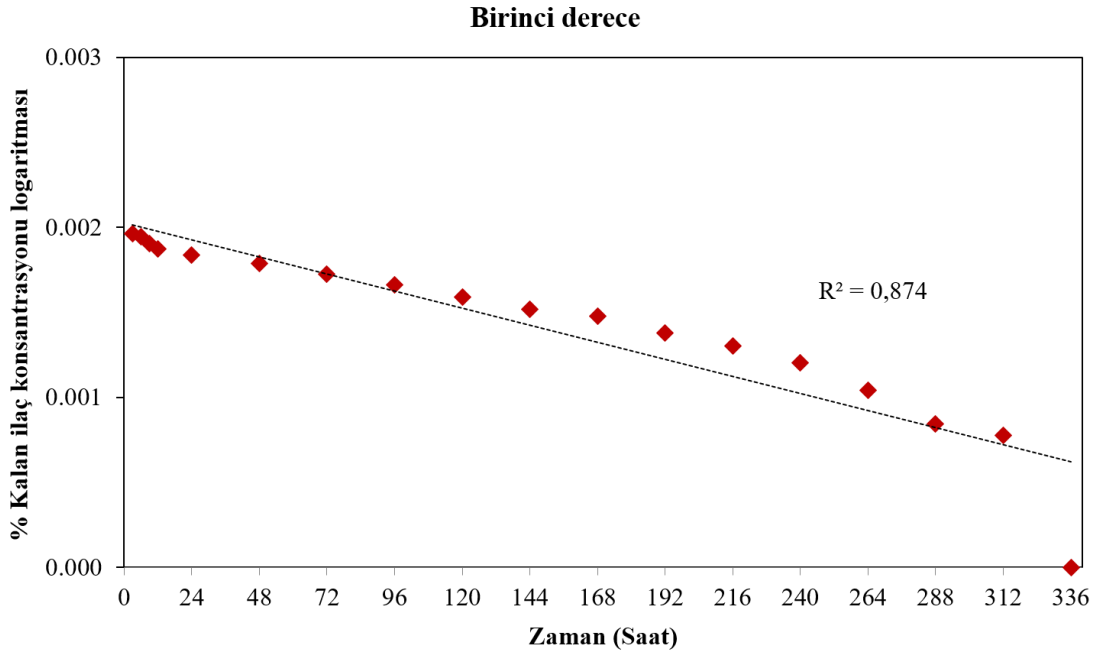
3.8. İlaç Salınım Verilerinin Matematiksel Modellere Uygulanması

Sıfır derece modeli, AMX yüklü BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti salınım profilinde uygulanmış ve grafik üzerinden değerlendirme yapılmıştır (**Şekil 4.8**). Zamana karşı ilaç salımının kümülatif yüzdesinin grafiksel temsili, doku iskeletinden AMX ilaç salımının, sıfır derece salınım kinetiği ilkesini hafifçe yaklaşmasına rağmen mükemmel bir şekilde takip etmediğini (R^2=0,945) göstermektedir.



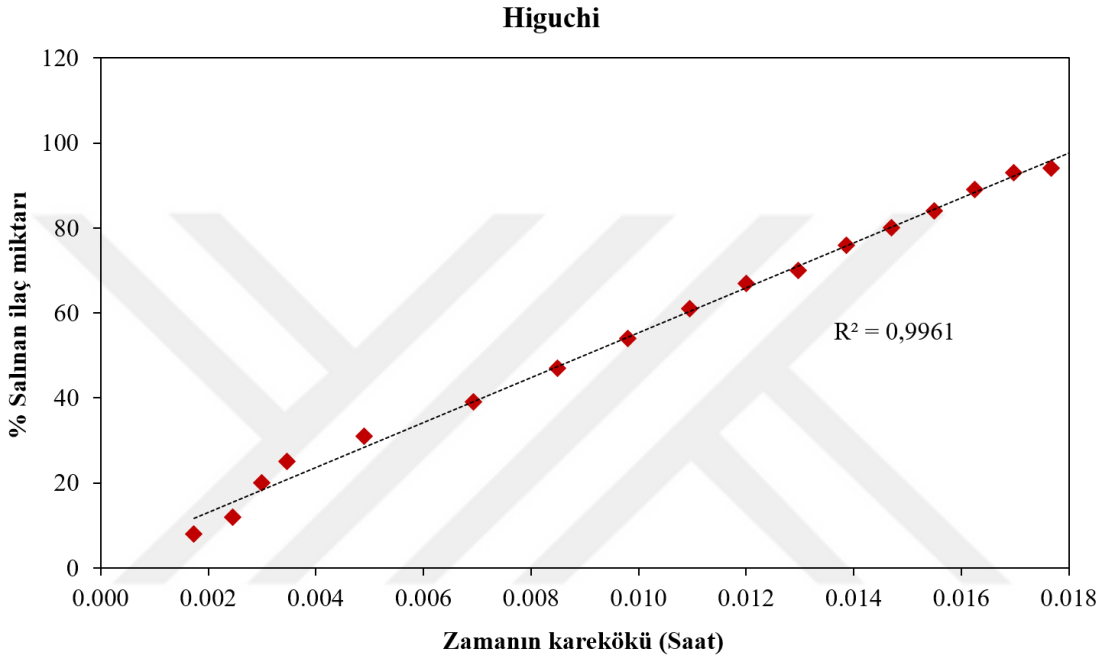
Şekil 3.8. Amoksisilinin sıfır derece kinetik salınımı.

Birinci derece modeli, AMX yüklü BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti salınım profilinde uygulanmış ve grafik üzerinden değerlendirme yapılmıştır (**Şekil 3.9**). Zamana karşı ilaç salımının kümülatif yüzdesinin grafiksel temsili, doku iskeletinden AMX ilaç salımının, birinci derece salınım kinetiği ilkesine hafifçe yaklaştığını (R^2=0,874) göstermektedir.



Şekil 3.9. Amoksisilinin birinci derece kinetik salınımı.

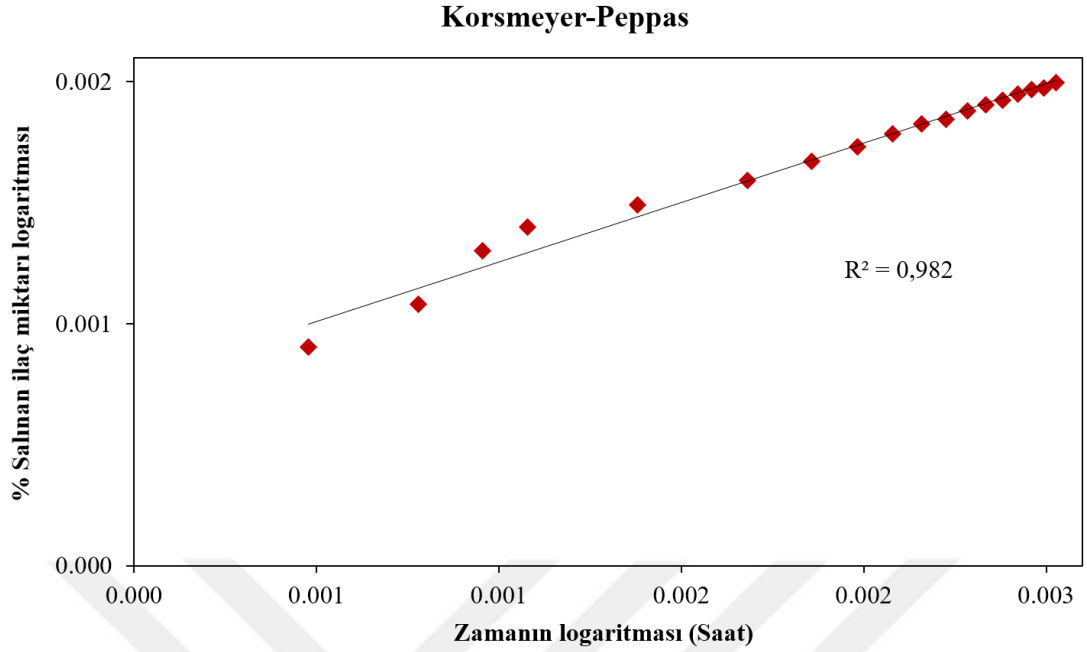
Higuchi modeli, AMX yüklü BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti salınım profilinde uygulanmış ve grafik üzerinden değerlendirme yapılmıştır (**Şekil 3.10**). Zamana karşı ilaç salınımının kümülatif yüzdesinin grafiksel gösterimi, ilaç salım profilinin trend çizgisine ya da regresyon hattına çok yakın olması ve katsayı değerinin en yüksek değeri olması nedeniyle, AMX'in doku iskeletinden salımının mükemmel bir şekilde, Higuchi ilaç salım modelini takip ettiğini (R^2=0,9961) göstermektedir.



Şekil 3.10. Amoksisilinin Higuchi kinetik salınımı.

Higuchi grafiğinden ile ilaç salınımının difüzyon yolu ile gerçekleştiği belirlendikten sonra bu salınımın difüzyon tipini tespit etmek için Korsmeyer-Peppas modeli AMX yüklü BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti salınım profilinde uygulanmış, grafik üzerinden değerlendirme yapılmış (**Şekil 3.11**) ve n değeri (salınım/difüzyon üssü) bu grafik üzerinden 0,49 olarak belirlenmiştir.

Şekil 3.11'de verilen grafiğin eğimi ile **Tablo 3.6**'da gösterilen salınım mekanizmaları karşılaştırılmış n=0,49 değerinin 0,45>n=0,89 aralığında kalarak Fick tipi salınım (Peppas ve ark., 2014) izlediğini göstermiştir.



Şekil 3.11. Amoksisilinin Korsmeyer-Peppas kinetik salınımı.

Tablo 3.6. Farklı salım mekanizmaları.

Salınım üssü (n)	İlaç taşınım mekanizması	Zamanın fonksiyonu olarak oran
0,45	Fickian difüzyonu	$t^{-0,5}$
0,45<n<1,00	Fickian olmayan taşınım	t^{n-1}
1,0	Case II taşınım	Sıfır derece salım

4. SONUÇLAR

BC:PCL polimer çözeltisi ile 3B ultra ince fiberli doku iskeletlerinin üretimi için, EHD metodu ve 3B yazıcı yöntemlerinin kombinasyonu olan EHD-biyoyazım metodu kullanımı bu tez altında önerilmiştir. EHD-biyoyazım için en uygun parametreler şu şekilde tanımlanmıştır: 1,5 kV uygulama voltajı, 100 μL h^{-1} akış hızı ve 1 mm çalışma mesafesi. Bu optimal işlem koşulları ile, 3B fiber yapılı doku iskeletlerinin 100x100 μm^2 gözenek büyüklükleri ve istenen desen (0°/90°) ile imal edilebilirliği kanıtlanmıştır.

Biyolojik testler, EHD-biyoyazılmış iskeletlerindeki NIH/3T3 (Fare Embriyo Fibroblast) hücrelerin canlılığının, penetrasyonunun ve proliferasyonunun, geleneksel EHD metodlarında elde edilen doku iskeletleri üzerinde büyüyen hücrelere kıyasla önemli ölçüde daha gelişmiş olduğunu göstermektedir.

Ayrıca gerçekleştirilen AMX salınım çalışmaları üretilen BC:PCL doku iskeletlerinin ilaç salınımı için elverişli olduğunu ve AMX gibi antimikrobiyal ilaç ya da malzeme eklenmesiyle antimikrobiyal özelliğe kavuşturulmalarının da mümkün olduğunu göstermiştir.

Model ilaç olarak AMX yüklenen doku iskeletlerinde, ilaç yüklenme verimliliği %80,5±6,6 ve ilaç yüklenme yüzdesi ise %80,5±6,6 olarak belirlenmiştir. Matematiksel modeller, bir dozaj formundan ilaç salınım mekanizmasının yorumlanmasında hayati rol oynamakta ve bir dozaj formunun ilaç salma kinetiğini anlamak için önemli bir araç olmaktadır. Bu tez çalışmasında, 50 mg AMX yüklü BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeleti üretilmiş olup, doku iskeletleri uzatılmış bir ilaç salım profili sergilemiştir. İlaç salımının en iyi şekilde Higuchi kare kök modeli (R^2=0,9961) ile uyum sağladığı bulunmuştur; ki bu da AMX ilacının doku iskeletinden zamana bağlı ve difüzyon kontrollü bir salınım gerçekleştirdiğini kanıtlamıştır. Ayrıca, Korsmeyer-Peppas enerji yasası denklemi ile difüzyon tipi hesaplanan n=0,49 değeri sistemden ilaç salınımının Fick tipi salınım takip ettiğini göstermiştir.

Sonuç olarak, bu tür EHD-biyoyazımı gerçekleştirilmiş ultra ince fiberli BC:PCL (5:95 ağırlık oranı) doku iskeletlerinin doku mühendisliği ve ilaç salınım çalışmalarında gelecek vaadedici olduğuna karar verilmiştir. Bu tez çalışması üzerine yapılacak gelecek çalışmalarda ise doku iskeleti katmanları üzerine yeni katman eklemeleri yapılarak doku iskeleti etkinliği arttırılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Ahn, S. H., Lee, H. J., Kim, G. H. (2011) Polycaprolactone Scaffolds Fabricated with an Advanced Electrohydrodynamic Direct-Printing Method for Bone Tissue Regeneration. Biomacromolecules, 12(12), 4256-4263.

Albrecht, L. D., Sawyer, S. W., Soman, P. (2016) Developing 3D Scaffolds in the Field of Tissue Engineering to Treat Complex Bone Defects. 3D Printing and Additive Manufacturing, 3(2), 106-112.

Almeida, H., Bártolo, P. J. (2014) Design of tissue engineering scaffolds based on hyperbolic surfaces: Structural numerical evaluation. Medical Engineering & Physics, 36, 1033–1040.

Altun, E., Aydogdu, M. O., Koc, F., Kutlu, O., Gozuacik, D., Yucel, S., Gunduz, O. (2018a) Amoxicillin Loaded Hollow Microparticles in the Treatment of Osteomyelitis Disease Using Single-Nozzle Electrospinning. BioNanoScience, 7, 1-12.

Altun, E., Akyol, S., Ekren, N., Kilic, O., Gunduz, O. (2018b) Electrohydrodynamic (EHD) Bioprinting of Polycaprolactone Scaffolds. Materials Science Forum, 923, 93-97.

Altun, E., Aydogdu, M. O., Koc, F., Crabbe-Mann, M., Brako, F., Kaur-Matharu, R., Ozen, G., Kuruca, S. E., Edirisinghe, U., Gunduz, O., Edirisinghe, M. (2018c) Novel Making of Bacterial Cellulose Blended Polymeric Fiber Bandages. Macromolecular Materials and Engineering, 303, 1700607, 1-7.

Altun, E., Ekren, N., Kuruca, S. E., Gunduz O. (2018d) Cell Studies on Electrohydrodynamic (EHD)-3D-Bioprinted Bacterial Cellulose\Polycaprolactone Scaffolds for Tissue Engineering. Materials Letters, 234, 163-167.

Anderson, J. M. (1988) Frontiers in Tissue Engineering, 1st Edition., Editors.; Patrick Jr, C. W., Mikos, A. G., McIntire, L. V., Pergamon Press, Oxford, İngiltere.

Anton, F. (1934) Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent 1975504 A, Oct 2.

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

Aydogdu, M. O., Altun, E., Crabbe-Mann, M., Brako, F., Koc, F., Ozen, G., Kuruca, S. E., Edirisinghe, U., Luo, C. J., Gunduz, O., Edirisinghe, M. (2018b) Cellular interactions

with bacterial cellulose: Polycaprolactone nanofibrous scaffolds produced by a portable electrohydrodynamic gun for point-of-need wound dressing. International Wound Journal, 15(5):789-797.

BaoLin, G., Ma, P. X. (2014) Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: A brief review. Science China Chemistry, 57(4), 490–500.

Barton, K., Mishra, S., Shorter, K. A., Alleyne A., Ferreira, P., Rogers J. (2010) A desktop electrohydrodynamic jet printing system. Mechatronics, 20, 611–616.

Béduneau, A., Saulnier, P., Anton, N., Hindré, F., Passirani, C., Rajerison, H., Noiret, N., Benoit. J-P. (2006) Pegylated Nanocapsules Produced by an Organic Solvent-Free Method: Evaluation of their Stealth Properties. Pharmaceutical Research, 23, 2190–2199.

Berchane, N. S., Jebrail, F. F., Andrews, M. J. (2010) Optimization of PLG microspheres for tailored drug release. International Journal of Pharmaceutics, 383, 81–88.

Bhattacharyya, S., Wang, H., Ducheyne, P. (2012) Polymer-coated mesoporous silica nanoparticles for the controlled release of macromolecules. Acta Biomaterialia, 8, 3429-3435.

Boland, T., Xu, T., Damon, B., Cui, X. (2006) Application of inkjet printing to tissue engineering. Biotechnology Journal, 1(9), 910–917.

Chase, G. G., Reneker, D. H. (2004) Nanofibers in filter media. Fluid/ParticleSeparation Journal, 16, 105–117.

Cheng, M., Deng, J., Yang, F., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X. (2003) Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. Biomaterials, 24(17), 2871-2880.

Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., Yamada, K. M. (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science, 294(5547), 1708–1712.

Cukierman, E., Pankov, R., Yamada, K. M. (2002) Cell interactions with three-dimensional matrices. Current Opinion in Cell Biology, 14(5), 633–640.

Dahman, Y. (2009) Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 9(9), 5105-5122.

Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., Chowdhury, P. (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. Acta Poloniae Pharmaceutica, 67, 217-223.

Edelman, D. B., Keefer E. W. (2005) A cultural renaissance: In vitro cell biology embraces three-dimensional context. Experimental Neurology, 192(1), 1–6.

Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S., Dumas, P. (2004) FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. Journal of Colloid and Interface Science, 73(2), 381-387.

Groll, J., Boland, T., Blunk, T., Burdick, J. A., Cho, D-W., Dalton, P. D., Derby, B., Forgacs, G., Li, Q., Mironov V. A. (2016) Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. Biofabrication, 8(1), 1-5.

Guillemette, M. D., Park, H., Hsiao, J. C., Jain, S. R., Larson, B. L., Langer, R., Freed, L. E. (2010) Combined Technologies for Microfabricating Elastomeric Cardiac Tissue Engineering Scaffolds. Macromolecular Bioscience, 10, 1330–1337.

Gunatillake, P. A., Adhikari, R. (2003) Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. European Cell and Materials, 5, 1-16.

Hollister, S. J. (2005) Porous scaffold design for tissue engineering. Nature Materials, 4(7), 518–524.

Hollister, S. J. (2009) Scaffold design and manufacturing: from concept to clinic. Advanced Materials, 21, 3330–3342.

Huang, Y. A., Bu, N., Duan, Y., Pan, Y., Liu, H., Yin Z., Huang, Y. X. (2013) Electrohydrodynamic direct-writing. Nanoscale, 5, 12007–12017.

Hull, C. W. (1986) Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. US Patent 4575330A, Mar 11.

Hutmacher, D. W. (2000) Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, 21(24), 2529-2543.

Hutmacher, D. W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K. W., Teoh, s. H., Tan, K. C. (2001) Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modelling. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 55(2), 203-216.

Jaworek, A., Sobczyk, A. T. (2008) Electrospraying route to nanotechnology: An overview. Journal of Electrostatics 66, 197–219.

Jeong, C. G., Hollister, S. J. (2010) Mechanical and Biochemical Assessments of Three-Dimensional Poly(1,8-Octanediol-co-Citrate) Scaffold Pore Shape and Permeability Effects on In Vitro Chondrogenesis Using Primary Chondrocytes. Tissue Engineering Part A, 16, 3759–3768.

John, A. A., Subramanian, A. P., Vellayappan, M. V., Balaji, A., Jaganathan, S. K.,

Mohandas, H., Paramalinggam, T., Supriyanto, E., Yusof, M. (2015) Review: Physico-chemical modification as a versatile strategy for the biocompatibility enhancement of biomaterials. RSC Advances, 5, 39232–39244.

Joshy, M. I. A., Elayaraja, K., Suganthi, R. V., Chandra Veerla, S., Kalkura, S. N. (2011) In vitro sustained release of amoxicillin from lanthanum hydroxyapatite nano rods. Current Applied Physics, 11, 1100–1106.

Kang, H-W., Lee, S. J., Ko, I. K., Kengla, C., Yoo, J. J., Atala, A. (2016) A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. Nature Biotechnology, 34, 312-319.

Katti, D. S., Robinson, K. W., Ko, F. K., Laurencin, C. T. (2004) Bioresorbablenanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 70, 286–296.

Khatiwala, C., Law, R., Shepherd, B., Dorfman, S., Csete, M. (2012) 3D Cell Bioprinting for Regenerative Medicine Research and Therapies. Gene Therapy and Regulation, 7, 1-19.

Kim, C. H., Khil, M. S., Kim, H. Y., Lee, H. U., Jahng, K. Y. (2006) An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 78(2), 283-290.

Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E. M., Buri, P., Peppas, N. A. (1983) Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. International Journal of Pharmaceutics, 15(1), 25-35.

Labet, M., Thielemans, W. (2010) Synthesis of polycaprolactone: a review. Synthesis of polycaprolactone: a review. Chemical Society Reviews, 38, 3484-3504.

Langer, R. (1990) New methods of drug delivery. Science, 249, 1527–1533.

Lutolf, M. P., Hubbell J. (2005) Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. Nature Biotechnology, 23, 47–55.

Malda, J., Visser, J. (2013) 25th Anniversary article: Engineering Hydrogels for Biofabrication Advanced Materials, 25, 5011-5028.

Meechaisue, C., Dubin, R., Supaphol, P., Hoven, V. P., Kohn, J. (2006) Electrospunmat of tyrosine-derived polycarbonate fibers for potential use astissue scaffolding material.

Journal of Biomaterial Science, PolymerEdition, 17, 1039–1056.

Meier, W. (2000) Polymer nanocapsules. Chemical Society Reviews, 29, 295–303.

Melchels, F. P. W., Domingos, M. A. N., Klein, T. J, Malda, J., Bartolo, P.J., Hutmacher, D.W. (2012) Additive manufacturing of tissues and organs. Progress in Polymer Science, 37(8), 1079-1104.

Merceron, T. K., Burt, M., Seol, Y-J., Kang, H-W., Lee, S. J., Yoo, J. J., Atala, A. (2015) A 3D bioprinted complex structure for engineering the muscle-tendon unit. Biofabrication, 7(3), 035003.

Metcalfe, A. D., Ferguson, M. W. J. (2007) Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. Journal of The Royal Society Interface, 4(14), 413–437.

Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G., Markwald, R. R. (2003) Organ printing: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends in Biotechnology, 21(4), 157–161.

Mitra, J., Tripathi, G., Saharma, A., & Basu, B. (2013) Scaffolds for bone tissue engineering: Role of surface patterning on osteoblast response. Royal Society of Chemistry Advances, 3, 11073-11094.

Mohanty, S., Sanger, K., Heiskanen, A., Trifol, J., Szabo, P., Dufva, M., Emnéus, J., Wolff, A. (2016) Fabrication of scalable tissue engineering scaffolds with dual-pore microarchitecture by combining 3D printing and particle leaching. Materials Science and Engineering C, 61, 180–189.

Moroni, L., de Wijn, J. R., van Blitterswijk C. (2008) Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 19(5), 543-572.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65, 55-63.

O'Brien, F. J. (2011) Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materials Today, 14, 88–95.

Park, J-U., Lee, J. H., Paik, U., Lu, Y., Rogers, J. A. (2008) Nanoscale patterns of oligonucleotides formed by electrohydrodynamic jet printing with applications in biosensing and nanomaterials assembly. Nano Letters, 8, 4210–4216.

Peppas, N. A., Duncan, R., Wnek, G., Hoffman, A., Gao, G. H., Kim, S. W., Lee, D. S., Hadjiargyrou, M., Touitou, E., Ainbinder, D., Mumper, R., Rolland, A., Niidome, T., Labhasetawar, V., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., Jjing, X., Csaba, N., Alonso, M. J., Ali, O., Mooney, D. J., Lönn, P., Dowdy, S. F., Feng, S-S., Gao, J., Lee, E. S., Na, K., Bae, Y. H., Zentner, G. M., Kim, H., Yoo, H. S., Nakayama, M., Okano, T., Liao, Z-X., Chuang, E-Y., Hsiao, C-W., Sung, H-W., Cabral, H., Kataoka, K., Nair, P. R., Discher, D., Mitragotri, S. (2014) Highly cited research articles in Journal of Controlled Release: Commentaries and perspectives by authors. Journal of Controlled Release, 190, 29-74.

Qiu, Y., Qiu, L., Cui, J., Wei, Q. (2016) Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. Materials Science and Engineering C, 59, 303-309.

Quaglia, F. (2008) Bioinspired tissue engineering: the great promise of protein delivery technologies. International Journal of Pharmaceutics, 364, 281-297.

Quinlan, E., López-Noriega, A., Thompson, E., Kelly, H. M., Cryan, S. A., O'Brien, F. J. (2015) Development of collagen–hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering. Journal of Controlled Release, 198, 71–79.

Ragaert, K., Baere, I. D., Cardon, L., Degrieck, J. (2014) Bulk Mechanical Properties of Thermoplastic PCL, 6th Polymers&Moulds Innovations Conference, 10-12 September Guimaraes, Portugal.

Ranganath, S. H., Kee, I., Krantz, W. B., Chow, P. K-H., Wang, C-H. (2009) Hydrogel matrix entrapping PLGA-Paclitaxel microspheres: drug delivery with near zero-order release and implantability advantages for malignant brain tumour chemotherapy. Pharmaceutical Research, 26, 2101–2114.

Raphael, B., Khalil, T., Workman, V. L., Smith, A., Brown, C. P., Streuli, C., Saiani, A., Domingos, M. (2017) 3D cell bioprinting of self-assembling peptide-based hydrogels. Materials Letters, 190, 103-106.

Rasekh, M., Ahmad, Z., Day, R., Wickam A., Edirisinghe, M. (2011) Direct writing of polycaprolactone polymer for potential biomedical engineering applications. Advanced Engineering Materials, 13, 296–305.

Rehfeldt, F., Engler, A. J., Eckhardt, A., Ahmed, F., Discher, D. E. (2007) Cell responses to the mechanochemical microenvironment-Implications for regenerative medicine and

drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 59, 1329–1339.

Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B., Mooney, D. J. (2001) Polymeric system for dual growth factor delivery. Nature Biotechnology, 19, 1029–1034.

Rustad, K. C., Sorkin, M., Levi, B., Longaker, M. T., Gurtner, G. C. (2010) Strategies for organ level tissue engineering. Organogenesis, 6, 151–157.

Saltzman, W. M. (2001) Drug Delivery–Engineering Principles for Drug Therapy, Oxford University Press, Oxford, İngiltere.

Saltzman, W. M., Olbricht, W. L. (2002) Building drug delivery into tissue engineering. Nature Reviews Drug Discovery, 1, 177-186.

Sang, Y., Wha, M., Kim, S., Lee, S., Hee, J., Yul, Y., Cho, Y. (2014) Fabrication of dual-pore scaffolds using SLUP (salt leaching using powder) and WNM (wirenetwork molding) techniques. Materials Science and Engineering C, 45, 546–555.

Seal, B. (2001) Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. Materials Science & Engineering R: Reports, 34, 147–230.

Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., Park, J. K. (2013) Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. Carbohydrate Polymers, 98(2), 1585-1598.

Shin, Y. M., Hohman, M. M., Brenner, M. P., Rutledge, G. C. (2001) Electrospinning: a whipping fluid jet generates submicron polymer fibers. Applied Physics Letters, 78, 1149–1151.

Siepmann, J., Peppas, N. A. (2011) Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. International Journal of Pharmaceutics, 418(1), 6-12.

Sill, T. J., von Recum, H. A. (2008) Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials, 29(13), 1989–2006.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morril, T. C. (1991). Spectrometric identification of organic compound. Wiley, New York, ABD.

Sun, B., Long, Y. Z., Zhang, H. D., Li, M. M., Duvail, J. L., Jiang, X. Y., Yin, H. L. (2014) Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructuresvia electrospinning. Progress in Polymer Science, 39, 862–890.

Thompson, C. J., Chase, G. G., Yarin, A. L., Reneker, D. H. (2007) Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. Polymer, 48, 6913–6922.

Thomson, R. C., Shung, A. K., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. (2000) Principles of Tissue Engineering, 2nd Edition., Editors.; Lanza R. P., Academic Press, San Diego, ABD.

Tripatanasuwan, S., Zhong, Z. X., Reneker, D. H. (2007) Effect of evaporation andsolidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethyleneoxide) aqueous solution. Polymer, 48, 5742–5746.

Valarezo, E., Tammaro, L., González, S., Malagón, O., Vittoria, V. (2013) Fabrication and sustained release properties of poly(ε-caprolactone) electrospun fibers loaded with layered double hydroxide nanoparticles intercalated with amoxicillin. Applied Clay Science, 72, 104–109.

Wang, H., Vijayavenkataraman, S., Wu, Y., Shu, Z., Sun, J., Hsi, J. F. Y. (2016) Investigation of process parameters of electrohydrodynamic jetting for 3D printed PCL fibrous scaffolds with complex geometries. International Journal of Bioprinting, 2(1), 63–71.

Wang, J. C., Zheng, H., Chang, M-W., Ahmad, Z., Li, J-S. (2017) Preparation of active 3D film patches via aligned fiber electrohydrodynamic (EHD) printing. Scientific Reports, 7, 1-13.

Wei, L., Cai, C., Lin, J., Chen, T. (2009) Dual-drug delivery system based on hydrogel/micelle composites. Biomaterials, 30, 2606–2613.

Wong, K.V., Hernandez, A. A (2012) A Review of Additive Manufacturing. ISRN Mechanical Engineering, 2012, 1-10.

Wray, L. S., Rnjak-Kovacina, J., Mandal, B. B., Schmidt, D. F., Gil, E. S., Kaplan, D. L. (2012) A silk-based scaffold platform with tunable architecture for engineering critically-sized tissue constructs. Biomaterials, 33, 9214–9224.

Wüst, S., Müller, R., Hofmann, S. (2011) Controlled Positioning of Cells in Biomaterials-Approaches Towards 3D Tissue Printing. Journal of Functional Biomaterials, 2(3), 119-154.

Yeong, W-Y., Chua, C-K., Leong, K-F., Chandrasekaran, M. (2004) Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. Trends in Biotechnology, 22, 643–652.

Youn, D. H., Kim, S. H., Yang, Y. S., Lim, S. C., Kim, S. J., Ahn, S. H., Sim, H. S., Ryu, S. M., Shin, D. W., Yoo, J-B. (2009) Electrohydrodynamic micropatterning of silver ink using nearfield electrohydrodynamic jet printing with tilted-outlet nozzle. Applied Physics A, 96, 933–938.

Zeleny, J. (1914) The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. Physical Review 3, 69–91.

Zhang, C. X., Yuan, X. Y., Wu, L. L., Han, Y., Sheng, J. (2005) Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. European Polymer Journal, 41, 423–432.

Zhang, H. B., Jayasinghe, S. N., Edirisinghe, M. J. (2006) Electrically forced microthreading of highly viscous dielectric liquids. Journal of Electrostatics, 64, 355–360.

Zheng, J., Long, Y. Z., Sun, B., Zhang, Z. H., Shao, F., Zhang, H. D., Zhang, Z. M., Huang J. Y. (2012) Polymer nanofibers prepared by low-voltage near-fieldelectrospinning. Chinese Physics B, 21, 048102, 1-6.

Zuo, W., Zhu, M., Yang, W., Yu, H., Chen, Y., Zhang Y. (2005) Experimental study on relationship between jet instability and formation ofbeaded fibers during electrospinning. Polymer Engineering & Science, 45, 704–709.

ÖZGEÇMİŞ



Adı ve Soyadı: ESRA ALTUN

Doğum Yeri: İstanbul

E-postası: z.esraaltun@gmail.com

Bildiği Yabancı Diller (Puan ve Yılı): İngilizce (IELTS = 7, 2018)

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

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2014

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Lisansüstü Araştırmacı	University College London, Londra	2017-2018
Proje Asistanı	Biyomedikal Görüntüleme ve Tanı sistemleri Geliştirme Laboratuvarı, Marmara Üniversitesi	2016-2018
Asistan Öğrenci	Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi	2015-2018

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

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

A1. Altun Esra, Ekren N., Kuruca S. E., Gunduz O. (2018) Cell Studies on Electrohydrodynamic (EHD)-3D-Bioprinted Bacterial Cellulose\Polycaprolactone Scaffolds for Tissue Engineering. Materials Letters, 1-8.

A2. Yeniay E., Ocal L., **Altun Esra**, Giray B., Oktar F. N., Inan A. T., Ekren N., Kilic O., Gunduz O. (2018) Nanofibrous wound dressing material by electrospinning method. The International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. 1-8.

A3. Altun Esra, Aydogdu M. O., Koc F., Kutlu O., Gozuacik D., Yucel S., Gunduz O. (2018) Amoxicillin Loaded Hollow Microparticles in the Treatment of Osteomyelitis Disease Using Single-Nozzle Electrospinning. BioNanoScience, 1-12.

A4. Topsakal A., Uzun M., Ugar G., Ozcan E., **Altun Esra**, Oktar F. N., Ikram F., Ozkan O., Sasmazel H. T., Gunduz O. (2018) Development of Amoxicillin-Loaded Electrospun Polyurethane/Chitosan/- Tricalcium Phosphate Scaffold for Bone Tissue Regeneration. IEEE transactions on nanobioscience, 321-328.

A5. Aydogdu M. O., **Altun Esra**, Crabbe-Mann M., Brako F., Koc F., Ozen G., Kuruca S. E., Edirisinghe U., Luo C. J., Gunduz O., Edirisinghe M. (2018) Cellular interactions with bacterial cellulose: Polycaprolactone nanofibrous scaffolds produced by a portable electrohydrodynamic gun for pointof- need wound dressing. International Wound Journal, 1-9.

A6. Cetin G., Catalgol Z., Aydogdu M. O., **Altun Esra**, Koc F., Lin C. C. Sengil A. Z., Gunduz O. (2018) A novel antibacterial nanofibers mat made of co-axial electrospun polycaprolactone / silver nitrate / zinc oxide composites. Nano-Bio-Materials and Devices, 2(2), 275-286.

A7. Aydogdu M. O., Chou J., **Altun Esra**, Ekren N., Cakmak S., Eroglu M., Osman A., Kutlu O., Oner E. T., Avsar G., Oktar F. N., Yilmaz I., Gunduz O. (2018). Production of the biomimetic small diameter blood vessels for cardiovascular tissue engineering. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 1-13.

A8. Altun Esra, Aydogdu M. O., Koc F., Crabbe-Mann M., Brako F., Kaur-Matharu R., Ozen G., Kuruca S. E., Edirisinghe U., Gunduz O., Edirisinghe M. (2018) Novel Making of Bacterial Cellulose Blended Polymeric Fiber Bandages. Macromolecular Materials and Engineering.

A9. Altun Esra, Akyol S., Ekren N., Kilic O., Gunduz O. (2017) Electrohydrodynamic (EHD) Bioprinting of Polycaprolactone Scaffolds. Mater. Sci. Forum, 923, 93-97.

A10. Aydogdu M. O., Oprea A. E., Trusca R., Surdu A. V., Ficai A., Holban A. M.,

Iordache F., Paduraru A. V., Filip D. G., **Altun Esra**, Ekren N., Oktar F. N., Gunduz O. (2017) Production and Characterization of Antimicrobial Electrospun Nanofibers Containing Polyurethane, Zirconium Oxide and Zeolite. BioNanoScience, 8(1), 154-165.

A11. Bozkurt Y., Sahin A., Sunulu A., Aydogdu M. O., **Altun Esra**, Oktar F. N., Ekren N, Gunduz O. (2017) Electrospun Nanocomposite Materials, A Novel Synergy of Polyurethane and Bovine Derived Hydroxyapatite. J. Phys. Conf. 829(1), 012015.

A12. Komur B., **Altun Esra**, Aydogdu M. O., Bilgic D., Gokce H., Ekren N., Salman S., Inan A. T., Oktar F. N., Gunduz O. (2017) Hydroxyapatite Synthesis from Fish Bones: Atlantic Salmon (Salmon Salar). Acta Physica Polonica A. 131(3), 400-402.

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

B1. Altun Esra, Ekren N., Kilic O., Gunduz O. (2018) Sözlü Sunum. Electrohydrodynamic (EHD) Bioprinting of Bacterial Cellulose / Polycaprolactone Scaffolds. 4th International Society for Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials (ISBPPB 2018), Krakow, Polonya.

B2. Yeniay E., Ocal L., **Altun Esra**, Ekren N., Oktar FN., ve ark. (2018) Poster Sunumu. Antibacterial nanofibrous wound dressing material by electrospinning method. 4th International Society for Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials (ISBPPB 2018), Krakow, Polonya.

B3. Altun Esra, Ekren N., Kilic O., Gunduz O. (2017) Sözlü Sunum. Electrohydrodynamic (EHD) Bioprinting of Polycaprolactone Scaffolds. 2nd International Conference on Frontiers of Composite Materials (ICFCM 2017), Melbourne, Avustralya.

B4. Gunduz O., Gokce H., Sahin Y.M., **Altun Esra**, ve ark. (2017) Poster Sunumu. Production of Natural Hydroxyapatite from Gilthead Seabream (Sparus aurata) Microstructural Characterization. 29th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine, (Bioceramics28), Toulouse, Fransa.

B5. Aydogdu M. O., Cetin G., **Altun Esra,** ve ark. (2017) Poster Sunumu. Production of

the PCL/Zinc Oxide/Silver Nitrate Nanofibrous Scaffolds with Enhanced Antimicrobial Activity Using Co-Axial Electrospinning Method. 13th International Conference on Materials Chemistry (MC 13), Liverpool, İngiltere.

B7. Inan A.T., **Altun Esra**, Ekren N., Gunduz O. (2017) Poster Sunumu. A New Microparticle Production Research via Electrospinning. Micro Nano Conference, Amsterdam, Hollanda.

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

B9. Altun Esra, Oral O., Eroglu M., Gunduz O. (2016) Sözlü Sunum. Hydroxyapatite/ Polymethylsilsesquioxane /Hexagonal Boron Nitride/Chitosan Nanofiber Composites for Bone Tissue Engineering Applications. 28th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics28), Charlotte, ABD.

B10. Aydogdu M. O., **Altun Esra,** Gunduz O. (2016) Poster Sunumu. Production of the Polyurethane/ Zeolite Nanocomposites with Electrospinning Method for Biomedical Engineering Applications. Annual Conference & Expo on Biomaterials (Biomaterials 2016), Londra, İngiltere.

B11. Altun Esra, Aydogdu M.O., Ekren N., ve ark. (2016) Sözlü Sunum. Production of the new bioinspired neuroregeneration structure. Annual Conference & Expo on Biomaterials (Biomaterials 2016), Londra, İngiltere.

B12. Altun Esra, Gunduz O., ve ark. (2015) Poster Sunumu. Production of Bacterial Cellulose Nanofibers for Tissue Engineering Applications. 27th Symposıum and Annual Meetıng of the International Society for Ceramics in Medicine, Bali, Endonezya.

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

C1. Topsakal A., Ugar G., Ozcan A., **Altun Esra,** ve ark. (2017) Sözlü Sunum. Production of Bone Tissue Engineering Nanofiber Scaffold by Electrospinning Method. 10th Japanese-Mediterranean Workshop on Applied Electromagnetic Engineering for

Magnetic, Superconducting, Multifunctional and Nanomaterials (JAPMED'10), İzmir, Türkiye**.**

C2. Komur B., **Altun Esra,** Aydogdu M. O., ve ark. (2016) Sözlü Sunum. Hydroxyapatite Synthesis from Fish Scale: Atlantic Salmon (Salmo salar). 6th International Advances in Applied Physics and Material Science Congress & Exhibition (APMAS 2016), İstanbul, Türkiye.

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

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

D. Sanat ve tasarım etkinlikleri:

D1. Altun Esra, Aydogdu M.O., Ekren N., ve ark. (2017) Poster Sunumu. Antidiabetic and Antioxidant Chocolate from Mulberry Tree Leaf. 5th International Food R&D Brokerage Event, İzmir, Türkiye**.**

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

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

D4. Altun Esra, Togay S.O., Salman S., ve ark. (2016) Poster Sunumu. Bacterial Cellulose Antimicrobial Food Packaging Which Obtained from Food Waste and New Generation Biosensor Food Packaging via Microchip - EHDA Methods. 3th International Food R&D Brokerage Event, Izmir, Turkey; 4th of Turkey Innovation Week Istanbul, İstanbul, Türkiye.