MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

3 BOYUTLU BİYO-BASIM İLE GELMA TABANLI HİBRİT DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ZEKİYE AKDAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Songül ULAĞ

EŞ DANIŞMAN
Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

ISTANBUL, 2024

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Zekiye AKDAĞ'ın "**3 Boyutlu Biyo-Basım ile GelMA Tabanlı Hibrit Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu**" başlıklı tez çalışması, 22 Ocak 2024 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Songül ULAĞ (Danışman)
Marmara Üniversitesi ....

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Ceren ÇALIKOĞLU KOYUNCU (Üye)
Marmara Üniversitesi ....

Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN (Üye)
Yıldız Teknik Üniversitesi ....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …….. tarih ve ……. sayılı kararı ile Zekiye AKDAĞ' ın Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ



Aileme …

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPKO) Proje No: FYL-2023-11005 projesi ve Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından TÜBİTAK 1505 Üniversite-Sanayi İş Birliği Projesi kapsamında 5210020 no' lu proje ile finansal olarak desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca sevgisini, ilgisini ve bilgisini benimle her daim özenle paylaşan ve her anlamda bana yol gösteren çok değerli danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Songül ULAĞ' a çok teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince teorik ve deneysel tüm çalışmalarım için bana en iyi şartları sağlayan ve her koşulda beni dinleyen sayın Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ' e ve Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi' nde çalışmalarını gerçekleştiren ekibe teşekkür ederim.

Laboratuvardaki harici çalışmalarımda, tez çalışmamda ve tezimin her aşamasında benimle fikir alışverişinde bulunan değerli hocam Dr. Rıdvan YILDIRIM' a çok teşekkür ederim.

Dostluklarıyla ve destekleriyle her zaman yanımda olan, beni güldüren ve her koşulda arkamda olan Beyza TOPÇU' ya, Dilruba BAYKARA' ya, Elif Nur YILDIZ' a, Eray ALTAN' a, ve Esra PİLAVCI' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez sürecim boyunca bana anlayışla yaklaşan değerli 23AG008 numaralı TÜBİTAK 1004 projesindeki ekip arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca beni her daim ve her koşulda destekleyen biricik aileme çok teşekkür ederim. Bana gösterdikleri sevgi ve emek sayesinde her zaman moral ve motivasyonum hep yüksekti. Sizi çok seviyorum canım ailem. Anneme babama ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

İyi ki varsınız!

İÇİNDEKİLER

SEMBOL LİSTESİ vi
KISALTMA LİSTESİ vii
ŞEKİL LİSTESİ ix
TABLO LİSTESİ xi
ÖZET xii
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ 1
1.1. Derinin Yapısı 1
1.2. Yara Nedir? 2
1.3. Yara Çeşitleri 3
1.4. Deri Doku Mühendisliği 4
1.5. Deri Doku İskeleleri ve Özellikleri 5
1.6. Deri Doku İskeleleri Üretim Yöntemleri 6
1.6.1. Geleneksel Üretim Yöntemleri 7
1.6.1.1. Çözücü Döküm ve Partikül Liçi 7
1.6.1.2. Dondurarak Kurutma 7
1.6.1.3. Gaz Köpürtme 8
1.6.1.4. Eriyik Kalıplama 9
1.6.1.5. Termal Olarak İndüklenen Faz Ayrımı (TIPS) 10
1.6.1.6. Elektro Eğirme 10
1.6.2. İleri İmalat Yöntemleri 12
1.6.2.1. Eriyik Yığma Modelleme (FDM) 12
1.6.2.2. 3-Boyutlu Baskı (3B Baskı) 12
1.7. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler 18
1.7.1. Doğal Polimerler 18
1.7.2. Sentetik Polimerler 23
1.8. Deri Dokularının Hücre Kaynakları 23
1.8.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MSC'ler) 24
1.8.2. Embriyonik Kök Hücreler (ESC'ler) 25
1.8.3. Fibroblast Hücreleri 26
2. MALZEMELER VE YÖNTEM 27
2.1. Malzemeler 27
2.2. Yöntem 27
2.2.1. Keratin Ekstraksiyonu 27
2.2.2. Keratin Metakrilat (KerMA) Sentezi 28

2.2.3. GelMA Sentezi 29
2.2.4. Doku İskelesi Tasarımı ve Üretimi 31
2.3. Doku İskelelerin Karakterizasyonu 32
2.3.1. ^{1}H NMR Testi 32
2.3.2. 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) Analizi 32
2.3.3. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) 33
2.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 33
2.3.5. GelMA Tabanlı Doku İskelelerin Mekanik Testleri 33
2.3.6. Şişme ve Degradasyon Testleri 34
2.3.7. *In Vitro* Biyouyumluluk Testleri 34
2.3.8. Hücre Tutunma Deneyi 35
2.3.9. İstatistiksel Analiz 35
3. SONUÇ VE BULGULAR 36
3.1. KerMA ve GelMA Hidrojelinin ^{1}HNMR Analizi 36
3.3. FT-IR Analizi 37
3.4. SEM Analizi 39
3.5. GelMA Tabanlı Doku İskelelerin Mekanik Testleri 42
3.6. İskelelerin Şişme ve Bozunma Testleri 43
3.7. İskelelerin Biyouyumluluk Özellikleri 46
4. SONUÇLAR 50
5. KAYNAKLAR 52
ÖZGEÇMİŞ 71

SEMBOL LİSTESİ

Sembol Adı	Açılımı
a/h	Ağırlık/Hacim
dk	Dakika
CB	Bikarbonat Tampon
cm	Santimetre
rpm	Dakikadaki Devir/Dönüş Sayısı
gr	Gram
µl	Mikrolitre
µl	Mikrometre
kDa	KiloDalton
kV	Kilovolt
l	Litre
M	Molarite
ml	Mililitre
MHz	MegaHertz
mm	Milimetre
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
V	Volt

KISALTMA LİSTESİ

Kısaltma adı	Açılımı
3B	3 Boyutlu
CAD	Bilgisayar Destekli Tasarım
DMD	Dijital Bir Mikromirror Cihazı
DLP	Dijital Işık İşleme
DS	Metakrilasyon Derecesi
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDS	Glutamik Asit-Serin
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
ESC	Embriyonik Kök Hücre
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDM	Eriyik Yığma Modellemesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GelMA	Jelatin Metakriloil
IFP	Filament Proteinleri
iPSC	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KerMA	Keratin Metakrilat
LAP	Lityum Fenil-2,4,6-Trimetil-Benzoil Fosfinat
LDS	Lösin-Aspartat-Serin
LDV	Lösin-Aspartat-Valin
MAA	Metakrilik Anhidrit
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat

NaOH	Sodyum Hidroksit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCL	Polikaprolakton
PEG	Polietilen Glikol
PLA	Poli-Laktik Asit
RGD	Arginin-Glisin-Aspartik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SLA	Stereolitografi
TCP	Trikalsiyum Fosfat
TIPS	Termal Olarak İndüklenen Faz Ayrımı
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzen Sülfonik Asit
UV	Ultraviyole
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2h-Tetrazolium-5-Carboxanilide

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Derinin yapısı [4] 2
Şekil 2. Doku iskelelerinin biyolojik özellikleri 6
Şekil 3. Elektro eğirme yöntemiyle nanofiber üretimi 11
Şekil 4. DLP 3B yazıcı ve cihazın iç mekanizması 17
Şekil 5. Yün keratin bazlı malzemelerin doku mühendisliği uygulamalarında şematik gösterimi [92] 21
Şekil 6. Koyun yününden keratin eldesinin şematik gösterimi 28
Şekil 7. KerMA sentezinin kimyasal gösterimi 29
Şekil 8. KerMA sentezi 29
Şekil 9. GelMA sentezinin kimyasal gösterimi 30
Şekil 10. GelMA sentezi 30
Şekil 11. GelMA tabanlı iskelelerin tasarım ve üretiminin şematik gösterimi, bilgisayarda CAD model tasarımı (a), iskeleleri oluşturmak için DLP cihazında hidrojelin kürlenmesi (b), 3B baskılı GelMA tabanlı iskeleler (c) 31
Şekil 12. Karakterizasyon cihazlarının görüntüleri, (A) Uv-vis cihazı, (B) Reometre cihazı, (C) Basma testi cihazı, (D) SEM cihazı ve (E) FT-IR cihazı 32
Şekil 13. Jelatin ve GelMA'nın ^{1}H-NMR spektrumları [143] 36
Şekil 14. Keratin ve KerMA'nın ^{1}H-NMR spektrumları 37
Şekil 15. FT-IR analizi a) jelatin, b) GelMA, c) keratin ve d) KerMA 39
Şekil 16. FT-IR analizi, a) %10 GelMA/%1 keratin, b) %10 GelMA/%3 keratin c) %10 GelMA/%5 keratin d) %10 GelMA/%10 keratin e) %10 GelMA/%1 KerMA f) %10 GelMA/%3 KerMA g) %10 GelMA/%5 KerMA h) %10 GelMA/%10 KerMA 39
Şekil 17. SEM görüntüleri, (A) %10 GelMA, (B) %10 GelMA/%1 keratin, (C) %10 GelMA/%3 keratin (D) %10 GelMA/%5 keratin (E) %10 GelMA/%10 keratin (F) %10 GelMA/%1 KerMA (G) %10 GelMA/%3 KerMA (H) %10 GelMA/%5 KerMA (I) %10 GelMA/%10 KerMA 41
Şekil 18. GelMA tabanlı iskelelerin mekanik test sonuçları, a) %10 GelMA, b) %10 GelMA/%1 keratin, c) %10 GelMA/%3 keratin, d) %10 GelMA/%10 keratin 42
Şekil 19. GelMA tabanlı iskelelerin mekanik test sonuçları, a) %10 GelMA, f) %10 GelMA/%1 KerMA, g) %10 GelMA/%3 KerMA, h) %10 GelMA/%5 KerMA, i) %10 GelMA/%10 KerMA 43
Şekil 20. GelMA, GelMA/keratin ve GelMA/KerMA iskelelerin şişme davranışları 45

Şekil 21. GelMA, GelMA/keratin ve GelMA/KerMA iskelelerin degredasyon oranları 46
Şekil 22. Farklı zaman aralıklarında farklı örneklerle inkübe edilen L929 hücrelerinin hücre canlılığı değerleri. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. *p<0,05 ve **p<0,001 47
Şekil 23. Fibroblast L929 hücrelerinin (A) %10 GelMA, (B) %10 GelMA/%1 keratin, (C) %10 GelMA/%3 keratin (D) %10 GelMA/%5 keratin (E) %10 GelMA/%10 keratin iskeleleri üzerindeki SEM görüntüleri 48
Şekil 24. Fibroblast L929 hücrelerinin (F) %10 GelMA/%1 KerMA (G) %10 GelMA/%3 KerMA (H) %10 GelMA/%5 KerMA (I) %10 GelMA/%10 KerMA iskeleleri üzerindeki SEM görüntüleri 49

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Akut ve kronik yara çeşitlerinin karşılaştırılması 4

Tablo 2. Doku iskelesi üretim metotları 7

ÖZET

3 Boyutlu Biyo-Basım ile GelMA Tabanlı Hibrit Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu

Ciltte ağrıya, hasara ve enfeksiyona neden olan cilt hastalıkları doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu durumlar farklı ilaçlar ve antibiyotiklerle tedavi edilebilse de, etkilenen bölgeye tek başına pansuman yeterli olmayabilir. Bu nedenle, yara bakımına yönelik bir müdahalenin, daha etkili bir yaklaşım kullanılarak mümkün olduğu kadar erken başlatılması gerekmektedir. Çok işlevli özelliklere sahip doğal polimerik hidrojeller, kronik yaraların iyileşme sürecini arttırmak için oldukça tercih edilmektedir. Optimum foto-çapraz bağlı cilt kaplaması olan jelatin metakriloil (GelMA), hücre dışı matrisin (ECM) yapısını taklit edebilir. Bununla birlikte, saf GelMA hidrojel yetersiz mekanik mukavemet sergiler. Hibrit olarak uygulanması etkinliğini arttırır. Dünyada en çok bulunan üçüncü polimeri olan keratin, sağlam ve filamentli bir proteindir. Keratin; memelilerin, sürüngenlerin ve kuşların tüyleri, yünleri, tırnakları ve boynuzlarının önemli bir bileşenidir. Ayrıca, keratin atığı değerli, yenilenebilir bir hammaddedir ve değerini arttırmak için atık yünün kullanımının yaygınlaştırılması önemlidir.

Sunulan tez çalışmasında, koyun yününden yüksek verimli (%65) keratin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve keratinin kimyasal modifikasyonu yoluyla keratin metakrilat (KerMA) sentezi başarıyla (%62 verimle) gerçekleştirilmiştir. Yapılan metakrilasyon sentezleri sonucunda ^{1}H-NMR ve TNBS analizleri metakrilasyonun başarısını kanıtlamış ve GelMA' nın metakrilasyon derecesi %75,4 ve KerMA'nın metakrilasyon derecesi ise %75 olarak hesaplanmıştır. Sentezlenen GelMA, keratin ve KerMA' dan üç boyutlu hibrit doku iskelesi üretilmiştir. GelMA/keratin ve GelMA/KerMA doku iskelelerinin şişme ve bozunma davranışları, fiziksel, morfolojik ve mekanik özellikleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bozunma testi sonucunda, üretilen hibrit doku iskelelerinin bozunma oranlarının düşük olduğu görülmüştür. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ile yapılan kimyasal analiz sonucunda, malzemeler arasındali kimyasal etkileşim kanıtlamıştır. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile yapılan morfolojik analiz sonucunda, kontrol grubu olan GelMA' ya keratin içeren ve KerMA içeren grupların eklenmesinin kontrol grubunun morfolojisini bozmadığı gözlenmiştir. Keratin katkılı doku iskelesi ile karşılaştırıldığında KerMA katkılı doku iskelesinin mekanik özelliklerinin geliştiği ve uzama miktarının yaklaşık olarak %90' a

ulaştığı gözlenmiştir. Üretilen doku iskelelerinin biyouyumluluk özellikleri L929 fare fibroblast hücreleri ile test edilmiş ve tüm deney gruplarının biyouyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak, GelMA/keratin ve GelMA/KerMA doku iskelelerinin, cilt yaralanmalarını iyileştirmek için çok işlevli yamalar olma potansiyeline sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği, yara örtüsü, dijital ışık işleme (DLP), Jelatin metakriloil (GelMA), keratin, keratin metakrilat (KerMA).

ABSTRACT

Production and Characterization of GelMA-Based Hybrid Tissue Scaffolds via 3D Bioprinting

Skin diseases that cause pain, damage, and infection of the skin are frequently used in tissue engineering studies. Although these conditions can be treated with different drugs and antibiotics, dressing the affected area alone may not be sufficient. Therefore, a wound care intervention needs to be initiated as early as possible using a more effective approach. Natural polymeric hydrogels with multifunctional properties are highly favored to enhance the healing process of chronic wounds. Gelatin methacryloyl (GelMA), the optimal photo-crosslinked skin coating, can mimic the structure of the extracellular matrix (ECM). However, pure GelMA hydrogel exhibits insufficient mechanical strength. Its application as a hybrid increases its effectiveness. Keratin, the world's third most abundant polymer, is a robust and filamentous protein. Keratin is an important component of the feathers, wool, nails, and horns of mammals, reptiles, and birds. Furthermore, keratin waste is a valuable renewable raw material and one of the aims is to expand the utilisation of waste wool to increase its value.

High yield (65%) keratin extraction from sheep wool was carried out and keratin methacrylate (KerMA) synthesis through chemical modification of keratin was successfully achieved in 62% yield. As a result of the methacrylation synthesis, ^{1}H-NMR and TNBS analyses proved the success of methacrylation, and the methacrylation degree of GelMA and KerMA was calculated as 75.4% and 75%, respectively. In the current research, a hybrid scaffold system containing GelMA, keratin, and KerMA was fabricated to serve as cell and growth factor carriers for skin disorder treatment. GelMA/keratin and GelMA/KerMA scaffolds were evaluated by comparing their swelling rates, biodegradation behavior, physical properties (FT-IR), morphology (SEM), and mechanical properties (compression). It was observed that the degradation rates of hybrid scaffolds were low. The peaks formed as a result of the FT-IR test were compatible. The morphological evaluation showed that the presence of keratin-containing and KerMA-containing groups positively affected the morphology of GelMA. Compared to keratin, KerMA showed better mechanical properties, and an elongation rate of approximately 90% was calculated. Biocompatibility analyses were tested with L929 mouse fibroblast cells and it was observed that all experimental groups were biocompatible. Overall, GelMA/keratin and GelMA/KerMA scaffolds proved to have the potential to be multifunctional patches for healing

skin injuries through skin tissue engineering.

Keywords: Tissue engineering, wound dressing, digital light process (DLP), gelatin methacryloyl (GelMA), keratin, keratin methacrylate (KerMA)

1. GİRİŞ

1.1. Derinin Yapısı

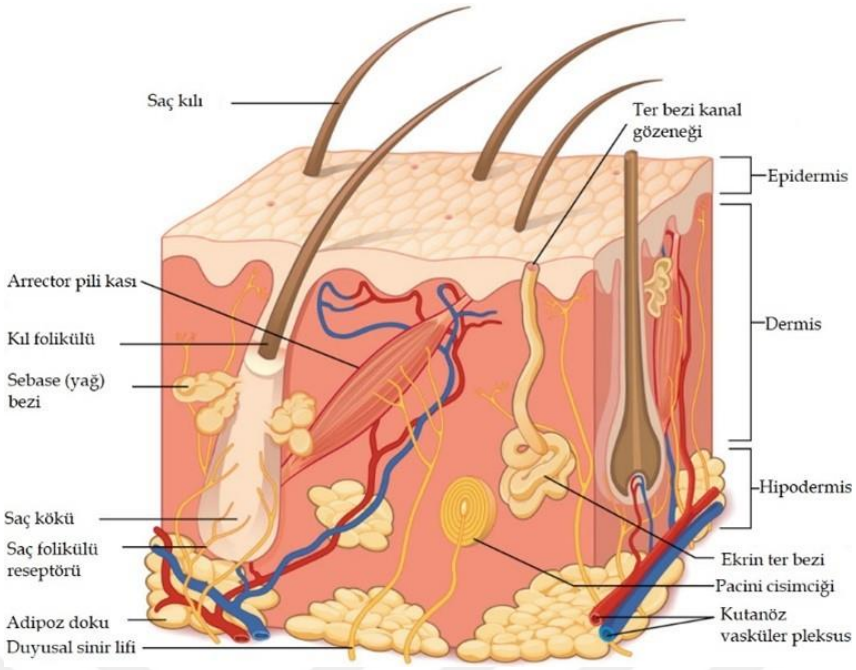
Deri, vücudu dış etkenlere karşı korur ve çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Deri dokusu, vücudun en büyük organını oluşturur. Deri, insan vücudunu çevreleyen ve iç organları dış etkenlerden koruyan bir bariyer oluşturur [1]. Ayrıca, sıcaklık düzenlemesi, duyusal algılar, su tutma, bağışıklık sistemi fonksiyonları gibi bir dizi önemli görevi yerine getirir [2].

Deri, Şekil 1'de gösterildiği gibi genellikle üç ana tabakadan oluşur:

Epidermis (Üst Deri): Bu tabaka, derinin en dış yüzeyini oluşturur. Genellikle keratinosit adı verilen hücrelerden oluşur. Keratinositler, vücudu dış etkenlere karşı koruyan keratin proteinini üretirler. Epidermis, ayrıca melanositleri içerir, bu hücreler cilde rengini veren melanin pigmentini üretir [3].

Dermis (Orta Deri): Dermis, derinin orta tabakasıdır ve kan damarları, sinir uçları, ter bezleri, sebase bezler ve saç foliküllerini içerir [4]. Kollajen ve elastin gibi lifler de dermiste bulunur. Kollajen, cilde dayanıklılık ve esneklik kazandıran bir protein lifidir; elastin ise cildin esnekliğini sağlar [3].

Hipodermis (Alt Deri): Bu tabaka, derinin en alt tabakasıdır ve genellikle yağ hücrelerini (adipoz hücreler) içerir. Ayrıca kan damarları ve sinir uçları da hipodermiste bulunur. Hipodermis, vücut sıcaklığını düzenlemede ve darbelere karşı korunmada rol oynar [3].



Şekil 1. Derinin yapısı [4]

Bununla birlikte, bu hayati organ travma veya hastalık nedeniyle tehlikeye girdiğinde, geleneksel iyileşme süreçleri yetersiz kalabilir, bu da işlevsel eksikliklere ve istenmeyen kozmetik sonuçlara neden olabilir [5] [6]. Geleneksel yara iyileştirme yaklaşımlarının sınırlamalarının üstesinden gelme ve kapsamlı yaralanmalar, yanıklar ve kronik yaraların sunduğu karmaşık zorlukları ele alma arayışı, araştırmacıları mühendislik, biyoloji ve malzeme bilimi ilkelerini entegre eden yenilikçi stratejiler keşfetmeye yöneltmiştir.

1.2. Yara Nedir?

Yara, yaralanma sonucu dokuların normal anatomik ilişkilerinin bozulması olarak tanımlanabilir. Yaralanma, cerrahi bir kesi gibi kasıtlı veya travma sonrası kazara olabilir. Yaralanmanın hemen ardından iyileşme süreci başlar [7].

Deri yaralarının dünya çapında sağlık sistemleri ve ekonomi üzerinde çok büyük olumsuz etkisi vardır. Yakın zamanda dünya çapında yaklaşık bir milyar insanın akut ve kronik yaralardan muzdarip olduğu bildirilmiştir [8]. Bu devasa rakam, devasa mali harcamalara dönüşmektedir. Gelişmiş ülkelerde kronik yara tedavisiyle ilgili harcamaların toplam sağlık harcamalarının %3'üne tekabül ettiği tahmin edilmektedir [9]. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde kronik yaralarla ilgili toplam maliyetin yılda yaklaşık 50 milyar ABD doları olduğu tahmin edilmektedir [10]. Durumun düşük iyileşme oranları nedeniyle daha da kötüleşmesi muhtemeldir. Aslında, cilt yaraları için kamuya açık iyileşme oranlarının önemli ölçüde fazla

tahmin edildiği bildirilmiştir. Özellikle, randomize kontrollü çalışmalardan elde edilen veriler ortalama %40 iyileşme oranı sağlarken, bildirilen oran genellikle %90'ın üzerindedir [11] [12].

Yara iyileşmesinin türü ne olursa olsun, aşamalar veya fazlar aynıdır, ancak her aşama için gereken süre iyileşmenin türüne bağlıdır.

A. Substrat fazı (inflamatuar, gecikmeli veya eksüdatif aşama veya faz - 1-4 gün)

B. Proliferatif faz (kollajen ve fibroblastik aşama veya faz - yaklaşık 4-42 gün)

C. Yeniden yapılanma aşaması (olgunlaşma aşaması veya aşaması - yaklaşık üç haftadan itibaren) [7]

1.3. Yara Çeşitleri

Deri yaralarının Tablo 1'de de karşılaştırıldığı gibi akut ve kronik olarak sınıflandırılması patogenez ve sonuçlarına dayanmaktadır. Akut yaralar, sonunda yapısal bütünlüğün yeniden kazanılması ile sonuçlanan bir dizi moleküler olaya maruz kalmaktadır. Bunun aksine, kronik yaralar iyileşmez ve sürekli iltihaplanma, kalıcı enfeksiyonlar ve nekroz gibi patolojik süreçlerle karakterize edilmektedir. Akut yara iyileşmesinde genel olarak örtüşen dört faz tanımlanır: hemostaz, inflamasyon, proliferatif faz ve yeniden şekillenme [13]. Akut bir yara oluştuğunda ilk tepki kanamayı durduran ve kan kaybını önleyen hemostazdır. İnflamatuar faz sırasında, ciltteki hasar yaraya giren patojenleri yok eden ve dokuyu anatomik bütünlüğün restorasyonu için hazırlayan ayrıntılı bir bağışıklık tepkisini harekete geçirir. İkincisi proliferatif fazda meydana gelir ve granülasyon dokusunun oluşumunu, neovaskülarizasyonu ve yeniden epitelizasyonu içermektedir [14]. Son olarak, akut yara iyileşmesi, granülasyon dokusunun bir skarla yer değiştirdiği ve epidermisin, apoptoz yoluyla ölen veya dermise yer değiştiren bağışıklık hücrelerinden arındırıldığı yeniden yapılanma aşamasıyla sona ermektedir [14] [15].

Tablo 1. Akut ve kronik yara çeşitlerinin karşılaştırılması [16]

Akut	Kronik
Kısa süre	6 haftadan uzun iyileşme
Altında yatan patolojik neden yok	Altında yatan patolojik neden var
Normal inflamatuar aşama	Uzun süreli inflamatuar aşama
Genellikle komplikasyonsuz iyileşir	Çeşitli komplikasyonlar ortaya çıkabilir
ECM'nin normal yeniden yapılanması	ECM'nin kusurlu yeniden yapılanması
Normal büyüme faktörü seviyeleri	Daha düşük büyüme faktörü seviyeleri

1.4. Deri Doku Mühendisliği

Rejeneratif tıp alanında, insan derisinin karmaşık ve dinamik yapısı, deri dokusu mühendisliği olarak bilinen disiplinler arası bir alanın gelişimini tetiklemiştir [16]. Geleneksel yara iyileştirme yaklaşımlarının sınırlamalarının üstesinden gelme ve kapsamlı yaralanmalar, yanıklar ve kronik yaraların sunduğu karmaşık zorlukları ele alma arayışı [17], araştırmacıları mühendislik, biyoloji ve malzeme bilimi ilkelerini entegre eden yenilikçi stratejiler keşfetmeye yöneltmiştir [18].

Vücudumuzun en büyük organı olan deri [19], dış tehditlere karşı koruma sağlayan ve homeostazı koruyan çok işlevli bir bariyer görevi görür [20]. Bununla birlikte, bu hayati organ travma veya hastalık nedeniyle tehlikeye girdiğinde, geleneksel iyileşme süreçleri yetersiz kalabilir, bu da işlevsel eksikliklere ve istenmeyen kozmetik sonuçlara neden olabilir [21] [22]. Bu klinik ihtiyaca yanıt olarak, cilt doku mühendisliği, cilt onarımı ve yenilenmesi için gelişmiş çözümler sunarak tedavi ortamında devrim yaratmaya çalışmaktadır.

Cilt dokusu mühendisliğinin merkezinde, doğal dokunun mimarisini, mekanik özelliklerini ve fizyolojik işlevlerini yakından taklit eden biyomimetik cilt ikamelerinin kasıtlı olarak inşa edilmesi yatmaktadır [23]. Bu süreç, biyouyumlu iskelelerin, keratinositler ve fibroblastlar gibi hücresel bileşenlerin ve hücresel davranışları düzenleyen biyoaktif ipuçlarının stratejik kombinasyonunu içerir. Doğal veya sentetik polimerler arasından iskele üretimi için biyomalzeme kaynağında kullanılacak malzeme seçimi biyouyumluluk, bozunma oranları ve mekanik esneklik gibi faktörler göz önünde bulundurularak tercih etmek önemlidir [24]. Bu dinamik alan, mühendislik ürünü cilt yapılarının hassasiyetini artırmak ve karmaşıklığını azaltmak için 3B biyo-baskı, elektro eğirme, dondurarak kurutma, dijital ışık işleme (DLP) ve

gen düzenleme de dahil olmak üzere en son teknolojileri sürekli olarak araştırmaktadır. Doku mühendisliğinde genellikle zorlayıcı ve kritik bir husus olan vaskülarizasyon, yapay derinin sürekli canlılığını ve entegrasyonunu sağlamak için odak noktasıdır [25]. Bilimsel bilgi ve teknolojik yeniliklerin bir araya gelmesiyle, deri dokusu mühendisliği yalnızca hasarlı deriyi onarmakla kalmayıp aynı zamanda estetik ve rekonstrüktif dermatolojik uygulamalarda da devrim yaratma vaadini taşımaktadır [26].

1.5. Deri Doku İskeleleri ve Özellikleri

Doku mühendisliği, mevcut malzeme ve yöntemlerin sınırlamalarının üstesinden gelmesi beklenen iskeleler kullanarak hasarlı dokuların yenilenmesi ve restorasyonu için bir yaklaşım ortaya koymuştur. İskeleler, doku mühendisliğinin önemli bir bileşenini oluşturan biyomalzemelerdir ve doku oluşumunun onarımı, iyileştirilmesi ve sürdürülmesi için kullanılırlar. Hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalması için gerekli olan farklı faktörlerin optimum şekilde sağlanmasına olanak tanıyan bir şablon görevi görerek hasarlı dokuların yeniden yapılandırılmasına ve yenilenmesine yardımcı olurlar. İskele mühendisliğinin arkasındaki ana konsept, doğal dokunun hücre dışı matrisini (ECM) taklit etmektir; bu, iskelelerin sergilediği mimarinin ve işlevlerin (mekanik ve biyolojik), ECM'nin oynadığı role uygun şekilde benzer olmasını sağlar. İskeleler, implantasyondan sonra konakçı dokunun entegrasyonu için yeniden şekillenme yeteneğinin yanı sıra vaskülarizasyon ve yeni doku oluşumu için gereken imkânı sunmalıdır. Hasarlı dokunun yeniden inşası için mekanik mukavemetleri ve şekilleri açısından stabilite ve çok yönlülük sağlamalıdırlar. Ek olarak, üretimi için kullanılan biyomalzeme, vücutta mevcut olan tasarlanmış dokular ve endojen hücrelerle uyumlu olmalıdır [27]. Geleneksel yara pansumanları genellikle çevreyle iletişim kurma konusunda zayıf bir kapasite sergiler ve bu da dokularda yara izi gibi istenmeyen etkilere neden olur; bu nedenle doku oluşumunu, hücresel etkileşimi geliştirmek ve vücutla entegrasyonu teşvik etmek için biyoaktif iskelelerin dahil edilmesi için çaba sarf edilmektedir [28]. Sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan hidrojel iskeleler de bu yapısal, fonksiyonel ve mekanik özelliklerin optimum şekilde düzenlenmesini sağlar. Yapıları ve gözeneklilikleri, büyüyen hücreler için yapışma, çoğalma ve farklılaşma sırasında arzu edilen ortamı sağlar (Şekil 2). Kompozit iskeleler, birden fazla bileşenin sinerjik varlığı nedeniyle gelişmiş özellikler sunan, benzer veya farklı malzemelerden yapılmış iki veya daha fazla elemandan oluşur [29].



Şekil 2. Doku iskelelerinin biyolojik özellikleri

Genel olarak, bir iskelenin özellikleri içine yerleştirileceği doku tipine göre belirlenir. Örneğin, kemik gibi sert dokular için sert bir polimerik iskele gereklidir, sinirler gibi yumuşak dokular için işlenebilir bir polimerik iskeleye ihtiyaç vardır ve deri (veya kan damarları) gibi esnek dokular için esnek bir polimerik iskele gereklidir [27]. Deri dokusu mühendisliği için, kullanılan iskeleler doğal deri ile yeterli ve benzer mekanik özellikler sergilemelidir; örneğin gerilme mukavemeti yaklaşık olarak 5 ila 30 MPa arasında, kopma uzaması %35 ila %15 arasında ve Young modülü 4,6 ila 20 MPa arasında olmalıdır [30]. Derinin ve iskelenin mekanik gücü arasındaki bu benzerlikler, anjiyogenezi ve lenfatik sistemin, sinir demetlerinin ve diğer yapıların gelişimini desteklemek için hayati önem taşımaktadır [27].

1.6. Deri Doku İskeleleri Üretim Yöntemleri

Doku mühendisliği iskelelerinin doku yenilenmesindeki etkinliği esas olarak gözenekli yapıların mikro yapısına ve morfolojisine (gözeneklilik, gözenek boyutu, gözenek şekli ve gözenekler arasındaki bağlantılar dahil) ve iskelelerin mekanik özelliklerine bağlıdır. Uygun malzemelerin seçiminden sonra doku mühendisliğindeki ilk aşama gözenekli üç boyutlu iskelelerin imalatıdır. Deri iskeleleri gözenekli bir zar, süngerimsi bir gövde ve dokunmamış bir fiber ağdan oluşur; Farklı morfolojilere sahip iskeleler farklı mikro yapılara sahiptir. Deri dokusu mühendisliği ile üretilen iskeleler, geometri, malzeme ve mikro yapı gereksinimlerine bağlı olarak farklı yöntemler kullanılarak hazırlanabilir. Gözenekli yapılara sahip deri dokusu

mühendisliği iskeleleri, solvent döküm/partikül liçi, dondurarak kurutma, gaz köpüğü, elektrostatik eğirme ve 3 boyutlu biyo-baskı yoluyla inşa edilmiştir (Tablo 2) [31].

Tablo 2. Doku iskelesi üretim metotları

Doku İskelesi Üretim Yöntemleri	
Geleneksel Yöntemler	**İleri İmalat Yöntemleri**
• **Çözücü Döküm ve Partikül Liçi** • **Dondurarak Kurutma** • **Gaz Köpürtme** • **Eriyik Kalıplama** • **Termal Olarak İndüklenen Faz Ayrımı (TIPS)** • **Elektro Eğirme**	• **Eriyik Yığma Modelleme (FDM)** • **3-Boyutlu Baskı (3B Baskı)** • **Stereolitografi (SLA)** • **Dijital Işık İşleme (DLP)**

1.6.1. Geleneksel Üretim Yöntemleri

1.6.1.1. Çözücü Döküm ve Partikül Liçi

Geleneksel çözücü dökümü ve partikül liçi, farklı boyut ve sayıdaki partikülleri çözerek gözenekli yapıların gözenek boyutunu ve gözenekliliğini kontrol eden popüler bir araştırma yöntemidir [31]. Prensip olarak, polimer uygun bir çözücü içinde çözülür ve daha sonra çözünmeyen bir tuz polimer çözeltisi ile karıştırılır. Çözücünün buharlaştırılmasıyla tuz-polimer bileşimi elde edilir ve bu bileşim sonunda tuz parçacıklarını uzaklaştırmak için yıkanır [32]. Bu yöntem, özel ve pahalı ekipmanlara ihtiyaç duymadan nispeten basit ve anlaşılır bir yöntemdir [33]. Bununla birlikte, yüksek gözenekli malzemeler için parçacık boyutunun kontrol edilmesi ve iyi mekanik özelliklerin korunması zordur. Ek olarak, iskele kalınlığı sınırlıdır, iskeledeki gözenekler birbirine bağlı değildir ve iskeledeki artık parçacıklar, başka yollarla ele alınması gereken gözenekler üretebilir [31]. Solvent dökümü/partikül liçi tekniğinin yakın zamandaki gelişimi, polimer çözeltisi sabit bir tuz yığını içinde yayılırsa ve liç işleminden önce uygun bir ısıl işlem yapılırsa, gözenekli köpüğün kristalliğinin bile yakından kontrol edilebileceği konusunda umutlandırmıştır [32].

1.6.1.2. Dondurarak Kurutma

Liyofilizasyon veya kriyodesikasyon olarak da adlandırılan dondurarak kurutma, çok önemli iki işlemi birleştiren bir kurutma işlemidir; dondurma ve kurutma [34]. Dondurarak kurutma

işleminin temel prensibi formülasyondaki çözücünün sıvı hale geçmeden katı halden (buz) doğrudan gaz halde (buhar) [35] uzaklaştırılmasıdır. Bu işlem için formülasyonun önce dondurulması şarttır ve daha sonra donmuş malzeme düşük sıcaklık ve düşük basınç ortamında belirli bir süre bekletilir [36]. Bu süreçte donmuş olan çözücü 2 aşamayla numuneden uzaklaştırılır. Bunlardan ilki birincil kurutma olarak adlandırılan süblimasyon ve ikincil kurutma olan desorpsiyon yollarıyla malzemeden uzaklaştırılarak kurutma gerçekleşir [35]. Dondurarak kurutma yöntemi geleneksel kurutma yöntemine göre en iyi kalitedeki ürünlerin üretimine olanak sağlar. Stabiliteyi sağlamak için düşük nem içeriği (%1'den az) gerektiren ve steril ve nazik bir koruma süreci gerektiren malzemelerin korunmasında merkezi bir öneme sahiptir [37]. Dondurarak kurutma, gıda ve ilaç endüstrileri başta olmak üzere uzun yıllardır biyoteknoloji, doku mühendisliği [38] gibi bir dizi uygulamada kullanılmaktadır [35].

Avantajları

- Oksitlenebilen maddeler vakum koşulları altında iyi korunur.
- %95-99,5 su giderimi sayesinde uzun muhafaza süresi sunar.
- Aseptik proses olduğu için kontaminasyon olma ihtimali düşüktür.
- Düşük sıcaklıkta mikrop üremesi ve enzim etkisi olamayacağı için özelliklerde minimum değişiklik olur.
- Nihai ürüne normal sıcaklıklarda taşınma ve depolanma imkanı sunar.
- Kurutulmuş malzemenin bileşenleri homojen olarak dağılmış halde kalır.
- Ürünün sterilliği sağlanabilir ve korunabilir [35].

Dezavantajları

- Uçucu bileşiklerin uzaklaştırılması için yüksek vakum gereklidir.
- İşlem süresi uzun ve düşük basınç gerektirdiği için maliyeti yüksek bir üretim metodudur [39].
- Bireysel ilaçlarla ilişkili stabilite sorunları içerir.
- Kurutma ortamın sterilliğinin kontrolü zordur [35].

1.6.1.3. Gaz Köpürtme

Gaz köpürtme, solvent dökümü/parçacık liçi gibi kalıntı gözeneklere neden olan parçacıklar üretmeyen gözenekli malzemelerin hazırlanmasına yönelik çevre dostu bir yöntemdir [31]. Yöntem basıncı, basınç düşürme oranını [40], sıcaklığı ve diğer parametreleri kontrol ederek

gözenekli yapıyı (yaklaşık olarak %75 gözeneklilik [41]) ayarlayabilir [31]. Gaz köpürtme tekniği, son yıllarda gözenekli 3 boyutlu iskele üretiminde oldukça popüler bir tekniktir [42]. Bu teknikte, sıvı bir biyopolimerin oda sıcaklığında kabarcıklarla dolana kadar gazla basınçlandırılmasını içerir. Basınç daha sonra standart basınca düşürülür ve gözenekli bir iskele oluşturulur [43]. Gözeneklerin oluşturulması için kullanılan gazlar CO_2 ve N_2 gazlarıdır. Bu gazların tercih edilmesinin nedenleri ucuz, kolayca temin edilebilen ve köpürtme sonrasında herhangi bir kalıntı bırakmamalarıdır [31]. Ayrıca, sitotoksik çözücüler kullanılmadan iskele üretimini mümkün hale getirir [44]. Bununla birlikte, polimer örneklerinin köpürmesinde yüksek gözenekliliğin elde edilmesini zorlaştırabilecek kusurları üretebilmesi [31], zayıf ara bağlantı oluşturması, üretim süresinin uzun olması ve gözenek boyutunun kontrol edilememesi bu yöntemin önemli sınırlamaları arasındadır [44]. Ancak ıslak elektrostatik eğirmenin diğer yöntemlerle birleştirilmesi veya yardımcı bir yöntem olarak kullanılmasıyla istenilen gözenek yapısına ulaşılabilir [31].

1.6.1.4. Eriyik Kalıplama

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerik katı implantlar genellikle ekstrüzyon veya enjeksiyonla kalıplama gibi eriyik bazlı bir yöntem kullanılarak üretilir. Bununla birlikte, doku mühendisliği iskelelerinin imalatı için, kalıplanmış parçalarda gözeneklilik oluşturmak amacıyla bu yöntemlerin diğer tekniklerle birleştirilmesi gerekir [45]. Gaz köpüğü ve partikül liçi teknikleri, gözenekli doku mühendisliği iskelelerinin üretilmesi için eriyik bazlı bir yöntemle birleştirilir [46].

Doku mühendisliğiyle üretilmiş iskelelerin imalatında eriyik bazlı teknolojilerin avantajları arasında şunlar yer almaktadır:

- Ölçeği büyütmek kolay ve uygun maliyet
- Hiçbir solvent kullanmadan hızlı üretim [47]
- Sadece kalıp geometrisini değiştirerek farklı şekil ve boyutlarda iskele imalatı
- Mekanik özellikleri ve biyoaktif yüzeyleri iyileştirmek için seramik parçacıkları ve biyoaktif moleküller gibi farklı katkı maddelerinin kullanılması olasılığı [46]

sunar.

1.6.1.5. Termal Olarak İndüklenen Faz Ayrımı (TIPS)

TIPS'in temel prensibi, stabil bir polimer sisteminin termodinamik olarak kararsız bir sisteme dönüştürülmesi ve böylece iki faza ayrılmasıdır: polimer açısından zengin bir faz ve polimer eksikliği olan bir faz [48]. Kısaca, önceden ısıtılmış bir polimer çözeltisi düşük sıcaklıklara maruz bırakılır. Düşük sıcaklık, sistemi termodinamik olarak kararsız duruma dönüştüren ve faz ayrımını tetikleyen bir tetikleyici görevi görür. Daha sonra solvent, süblimleştirme, ekstraksiyon veya polimer açısından zengin fazın matrisi oluşturduğu ve polimer açısından fakir fazın matris içindeki gözenekleri oluşturduğu başka herhangi bir teknikle çıkarılır. Dahil edilen ilaçlar, katılaştırma adımından önce polimer çözeltisine veya diğer karışabilir çözücülerle birlikte eklenir [49].

Düşük sıcaklıklara ve katılaşma sonrasında solventin tamamen uzaklaştırılmasına dayandığından, TIPS biyoaktif ilaçlar, özellikle de ısıya duyarlı olanlar için uygundur [50]. TIPS'in SC/PL, elektro eğirme, 3D baskı vb. gibi diğer tekniklerle birleştirilebileceğini belirtmekte fayda var. İşlem ucuzdur, yüksek düzeyde ara bağlantıya sahip yüksek gözenekli yapı iskelelerinin (>%95) üretilmesine ve ayrıca üretilen iskelelerin morfolojik özelliklerinin ayarlanabileceği fizibiliteye olanak tanır [51]. Bu, polimer türü ve konsantrasyonu, çözücü/çözücü olmayan oranı, soğutma hızı ve yüzey aktif maddenin varlığı gibi işlem parametrelerinin manipülasyonu yoluyla mümkündür. TIPS'in önemli bir dezavantajı, tehlikeli sonuçlarından kaçınmak için tamamen çıkarılması gereken organik solventlerin kullanılmasıdır [52].

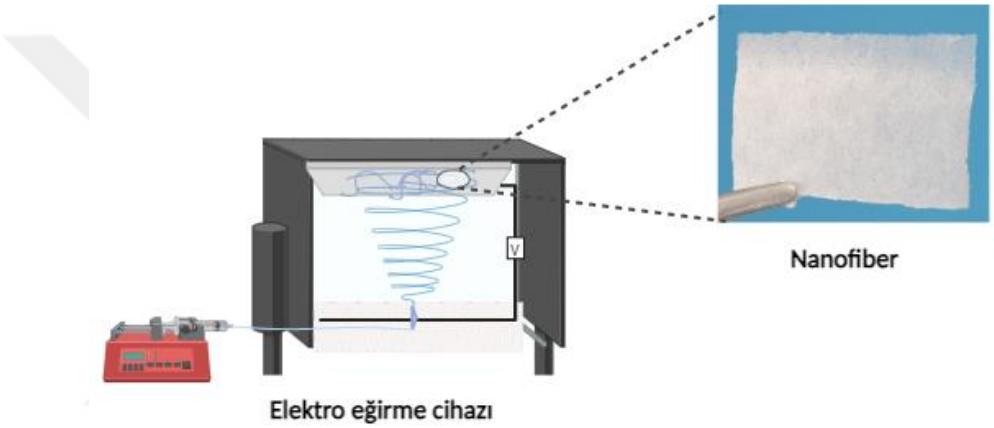
1.6.1.6. Elektro Eğirme

Elektro eğirme, yüksek voltajlı elektrik kullanarak çap ölçüleri nano ölçekten mikro ölçeğe kadar çeşitlilik gösteren fiberlerin üretim işlemidir (Şekil 3) [53]. Elektro eğirmenin temel ilkeleri yaklaşık olarak bir asır öncesine dayanmakla birlikte buluşunun kesin tarihi gizemini korumaktadır [54]. Bu yöntem konusunda ilk gerçekçi girişim 20. yy'ın başlarında belirlendi. John Francis Cooley, 1900, 1902 ve 1903'te üç patent başvurusunda bulunarak elektro eğirme patentini arşivleyen ilk kişi olarak tarihe geçmiştir [55].

Moleküler parametrelerin, proses parametrelerinin ve ortam parametrelerinin ayarlanmasıyla, neredeyse tüm çözünür veya eriyebilir polimerler (doğal polimerler, sentetik polimerler veya her ikisinin bir karışımı) elektro eğirme için kullanılabilir. Bu geniş polimer yelpazesi proteinleri, nükleik asitleri ve polisakkaritleri de kapsar. Solüsyon hazırlama parametreleri,

proses parametreleri ve ortam parametreleri, elektro eğirme ile üretilen nanoliflerin morfolojisi ve çaplarındaki değişikliklerden sorumludur [55].

Bir elektro eğirme prosesinde temel amaçlar boncuk oluşmadan, homojen çap ve kalınlıkta, biyouyumlu [56] fiberler üretmektir [55]. Genel olarak üretim sırasında dielektrik özelliği yüksek olan çözeltiyle boncuk oluşma eğilimi ve üretilen lif çapı azaltılmaktadır. Fiber üretimi yapılacak çözeltinin dielektrik özelliğini geliştirmek için asetonitril, asetik asit, aseton, kloroform, etil asetat, etanol vb. gibi bazı çözücüler kullanılabilir. Çok daha yüksek dielektrik sabitine sahip çözücü genellikle daha yüksek net yük yoğunluğundan oluşur ve bu da daha az boncuk ve daha ince fiber çapına yol açar [55].



Şekil 3. Elektro eğirme yöntemiyle nanofiber üretimi

Çözeltilerin yüzey yoğunluğu özellikleri de fiber üretiminde önemli bir parametredir. Çünkü bazı araştırmalar sonucunda düşük yüzey yük yoğunluğundaki çözeltilerde boncuk oluşma ihtimalinin artmasına ve sıfır yüzey yükü yoğunluğunda da herhangi bir lif oluşumunun görülmediğini kanıtlamıştır. Elektro eğirme prosesinin başlayabilmesi için elektro eğirme işlemine tabii tutulacak çözeltinin yüzey geriliminin aşılması gerekmektedir. Çözeltinin yüzey geriliminin azaltılarak boncuksuz lifler elde etmek mümkündür. Solüsyonun yüzey gerilimini azaltmak için yüzey gerilimi düşük solvent kullanılabilir veya çözeltiye yüzey aktif madde eklenebilir [55].

Elektro eğirme işlemindeki bir diğer önemli unsur da iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafedir. Eğer uygulanan voltaj sabit tutulursa elektrik alan şiddeti mesafeyle ters orantılı olacaktır. Doku mühendisliğinde kullanılan tipik bir elektro eğirme sisteminde bu mesafe genellikle 10-15 cm arasında değişiklik gösterir. Mesafenin artırılması belli bir noktaya kadar fiber çapında azalmaya neden olabilir [57].

Günümüzde bu işlem hava filtrasyonu, sıvı filtrasyonu, kozmetik sektörü, yenilenebilir enerji alanlarına ek olarak doku mühendisliği ve tıp alanlarında; kan damarları üretiminde, deri hasarı giderme, kemik yaralarının onarımı, sinir doku rejenerasyonu, kaslar, yaralanma veya hastalıklar nedeniyle tahrip olan yeni ECM'yi yeniden oluşturmak için hücrelere destek sağlama gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda [58] en çok tercih edilen yöntemlerden biridir [55].

1.6.2. İleri İmalat Yöntemleri

1.6.2.1. Eriyik Yığma Modelleme (FDM)

Erimiş filament üretimi olarak da adlandırılan eriyik yığma modelleme (FDM), eklemeleri imalat yöntemleri arasında en yaygın kullanılan tekniktir [59]. Düşük maliyetli ve kullanılan baskı malzemelerinin tedariğinin kolay olmasına [60] ek olarak baskılı yapıların çözünürlüğü 40 μm civarındadır. FDM 3B yazıcı ekstrüderi XY düzleminde hareket edebilen ve baskı aşaması Z ekseni boyunca hareket eden bir nozul, bobin ve taban platformdan oluşur. Üretim, bobinden çözülen ve nozul tarafından cam geçiş sıcaklığının üzerinde ısıtılan ve nozuldan katman birikmesiyle katmandaki taban üzerinde ekstrüzyon yapan termoplastik polimerleri kullanır [61]. Bu hammaddeler genellikle polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA) gibi polimer bazlı malzemelerden veya polikaprolakton-trikalsiyum fosfat (PCL TCP) gibi kompozit malzemelerden meydana gelir [60]. Şekil ve gözenek kontrolü bilgisayar kullanılarak gerçekleştirilir. FDM baskılı nesneler güçlüdür ve uzun vadede saklanmasına ek olarak taşınması da kolaydır [61]. Diğer tekniklerden en çok şırınga bazlı ekstrüzyona benzeyen bu yöntemde malzemenin çıkışı için ısı kullanılırken şırınga bazlı ekstrüzyonda viskoz biyomateryaller pnömotik pompa kullanılarak çıkarılır [60].

1.6.2.2. 3-Boyutlu Baskı (3B Baskı)

3 boyutlu (3B) baskı teknolojisi, genel anlamda bilgisayar ortamında hazırlanan bir dosyadan üç boyutlu nesnelerin üretilmesi anlamına gelir [62]. Tarihsel açıdan incelendiğinde, 3B baskı ilk olarak 1986 yılında Charles W. Hull tarafından tanımlanmıştır [63]. 3B baskı, doku mühendisliği alanında yaygın olarak uygulanan, gelişen bir teknolojidir [64]. Katmanlı üretim olarak da adlandırılan 3B biyo-baskı ise hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve farklı biyomalzemelerin katmanlar halinde basılması için hızlı prototipleme sistemlerinin kullanılmasıdır [65]. Hücrelerin ve hücre dışı matris bileşenlerinin hassas konum kontrolünü sağlayabilen ve ayrıca 3B ortamda karmaşık ve işlevsel çok hücreli dokular veya organlar yaratabilen, umut verici ve yenilikçi bir biyoüretim teknolojisidir [64]. Bu teknoloji ile doğal

doku/organ özelliklerini yüksek oranda taklit edebilen biyolojik yapılar üretilebilmektedir [63]. Bu nedenle, bu teknoloji genellikle "üçüncü sanayi devrimi" olarak ifade edilir [65].

Biyomedikal alanda, 3B baskı teknolojisinin son derece uzmanlaşmış, hastaya özel yapıların imalatına dahil edilmesi çok büyüktür. Bir dizi araştırmacı, 3B baskının tıbbi implant tasarımı ve üretimi, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında uygulanabileceği yolları araştırmaktadır. Bu tür yapılarda son derece yüksek hassasiyetli üretim özelliklerine ihtiyaç duyulması nedeniyle 3B baskı teknolojisi bu görev için idealdir. Bazı araştırmacılar doku mühendisliğine ek olarak, tıbbi implant tasarımı ve üretimi ve rejeneratif tıp gibi alanlarda da uygulanabileceği yolları araştırmaktadır [65].

Genel olarak, 3B biyo-baskı sistemi bir X-, Y-, Z- ekseni tahrik cihazı, 3B modelleme programı, bilgisayarlar ve biyo-baskı bileşenleri/mürekkeplerinden oluşur. İlk olarak, 3B katı veya jelleşme nesneleri yapmak için bilgisayar destekli tasarım (CAD) veya bilgisayar tomografisi (CT) tarama görüntüleri gibi 3B modelleme programlarını kullanılarak bir model oluşturulur [66]. Daha sonra, bir bilgisayara bağlı biyo-baskı ekipmanı ile 3B iskele yapısı oluşturulur.

Doku mühendisliğindeki iskele üretimlerindeki en temel amaç doğal (ECM'yi) taklit ederek mevcut hasarın en iyi ve en hızlı giderilmesini sağlamaktır. 3B biyo-baskıda biyo-mürekkepler önemli bir bileşendir. Hidrojel formundaki biyo-mürekkep, en yaygın olarak biyo-baskıda kullanılır ve biyo-baskı süreci için hayati öneme sahiptir [64]. Biyo-mürekkepler, hücre kapsülleme ve biyomolekül dahil etmede kullanılabilen biyomalzemelerden oluşur. Baskıdan önce, bir biyo-mürekkebin çapraz bağlanma, viskozite ve jelleşme gibi temel özellikleri dikkate alınmalıdır. Bu özelliklerin baskı kalitesi, morfoloji, hücre canlılığı ve çoğalması üzerinde etkisi vardır [67]. İdeal hidrojel malzemeleri, basılabilirlik, biyouyumluluk, parçalanabilirlik, mekanik özellikler, stabilite, toksik olmayan ve immünojenik olmayan özellikler gibi bir dizi iyi fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliğe sahip olmalı ve hücre yapışma, farklılaşma ve çoğalmasını teşvik edebilmelidir [64]. Bu doğrultuda, hidrojel bazlı biyo-mürekkepler de bazı temel özelliklere sahip olmalılar:

- Kaymayla incelme: Yüksek kayma hızlarında hidrojelin viskozitesinin daha düşük olması beklenir. Yüksek kayma incelmesi hücre canlılığını arttırmada yararlı olduğundan, baskıdan sonra iskelenin şekil aslına uygunluğunu da koruyabilir.
- Verim stresi: Biyo-mürekkeplerin yüzeye yayılmasını önlemektir.

- Kendi kendini iyileştirme: Ekstrüzyon baskı işlemi sırasında hidrojelin viskozitesi değişecektir ve orijinal viskozitenin baskı sonrasında eski haline dönmesi beklenmektedir.
- Çapraz bağlanma yeteneği, yani jelleşme sürecinin fiziksel, kimyasal veya biyolojik ortam çapraz bağlama maddesinde stabiliteye sahip olması.
- Parçalanabilirlik: Üretilen hidrojel ve yan ürünler, bozunduğunda biyouyumlu olmalı, daha az toksisiteye sahip olmalı ve hatta toksik olmamalıdır [68] [69].

Çalışma prensiplerine bağlı olarak 3B temel alt kategorilerden oluşurlar: inkjet, ekstrüzyon ve lazer destekli baskı teknolojileri [63].

İnkjet Baskı Teknolojisi: Inkjet 3B baskı, özellikle Drop-on-Demand (DOD) inkjet teknolojisinin kullanıldığı bir 3B baskı yöntemini ifade edebilir. Bu teknolojide, bir sıvı malzeme damlacıklar halinde bir yüzeye püskürtülerek katmanlar oluşturulur ve ardından malzeme katmanları sertleştirilerek veya kurutularak 3B nesne elde edilir. İnkjet baskı, biyolojik materyallerin veya hücrelerin bir düzen içinde tabakalar halinde bir alt tabakaya yerleştirildiği bir 3B baskı tekniğidir. Bu teknik, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılarak canlı doku veya organ benzeri yapılar oluşturmayı amaçlar. Inkjet baskı, hücre ve biyomateryalleri belirli bir düzen içinde, hedeflenen bir desene göre yerleştirerek istenilen doku özelliklerine sahip biyolojik yapıların oluşturulmasına olanak tanır. Bu teknik, özellikle biyolojik doku veya organların yeniden oluşturulması ve laboratuvar ortamında canlı hücre kültürleri geliştirme amacıyla kullanılmaktadır. Inkjet baskı, doku mühendisliği alanında özellikle hücresel düzeyde karmaşık yapıların oluşturulmasında ve biyolojik materyallerin kontrolsüz bir şekilde bir araya gelmesini önlemede önemli bir rol oynayabilir.

Ekstrüzyon Baskı Teknolojisi: Doku mühendisliğinde ekstrüzyon baskı, biyolojik materyallerin ve hücrelerin belirli bir desene göre tabakalar halinde ekstrüde edildiği bir 3B baskı yöntemidir [70]. Ekstrüzyon baskı, genellikle bir nozul aracılığıyla biyolojik materyallerin veya hücrelerin bir tabakadan diğerine düzenli bir şekilde eklenmesini sağlar. Bu süreç, genellikle biyolojik materyallerin bir taşıyıcı matris içine yerleştirildiği ve bu matrisin belirli bir desen veya katman oluşturacak şekilde hareket ettiği bir sistemle gerçekleştirilir [71]. Bu teknik, inkjet baskı teknolojisinin bir türüdür ancak genellikle daha yoğun ve kalın materyallerin kullanılabildiği bir süreçtir. Bu yöntemde, hücrelerin yanı sıra biyolojik materyallerin yanı sıra destek materyalleri de kullanılabilir. Bu destek materyalleri, canlı hücrelerin yerleştirildiği biyolojik materyalin yapısal destek sağlamak amacıyla kullanılır [72]. Ekstrüzyon baskı teknolojisi,

hücrelerin ve biyolojik materyallerin belirli bir desen veya yapıya göre düzenlenmesinde ve doku mühendisliği uygulamalarında daha kompleks ve özelleştirilmiş yapıların oluşturulmasında kullanılan bir yöntemdir [73].

Lazer Destekli Baskı: Lazer destekli baskı, biyolojik materyallerin ve hücrelerin belirli bir desene veya düzene göre lazer enerjisi kullanılarak yerleştirildiği bir 3B baskı tekniğidir. Bu teknik, biyolojik doku veya organ benzeri yapıların oluşturulmasında kullanılır ve biyolojik materyallerin daha kontrollü ve hassas bir şekilde yerleştirilmesine olanak tanır [74].

Lazer destekli baskı genellikle şu adımları içerir:

1. **Hücre Hazırlığı:** Hücreler, biyolojik materyaller ve hücre taşıyıcı substratlar özel bir mürekkep haline getirilir.
2. **Lazerle Yerleştirme:** Lazer, biyolojik materyallerin bulunduğu mürekkep damlacıklarını belirli bir desene veya katmana doğru yönlendirir. Bu sayede materyaller, istenilen 3B yapıyı oluşturacak şekilde yerleştirilir.
3. **Katman Katman Oluşturma:** Her bir lazerle kontrol edilen damlacık, bir önceki katmanın üzerine eklenerek 3B yapı oluşturulur [75].

Lazer destekli baskı, biyo-yazıcılar aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu yöntem, diğer biyo-yazıcı yöntemlerine kıyasla daha yüksek çözünürlük ve hassasiyet sağlayabilir [76]. Ayrıca, hücrelerin ve biyolojik materyallerin daha az zarar görmesine olanak tanıyan non-invaziv bir süreçtir. Bu nedenle bu baskı, özellikle biyolojik doku veya organların daha karmaşık ve özelleştirilmiş yapılarının oluşturulması için tercih edilebilir [77].

- **Stereolitografi (SLA)**

Vat polimerizasyonu olarak da bilinen stereolitografi (SLA), en eski 3B yazdırma teknolojisidir. SLA, sıvı veya düşük viskoziteli fotopolimerize edilebilir foto polimere mekânsal olarak kontrol edilen ışığı yansıtmak için ultraviyole (UV), kızılötesi ve görünür ışık gibi belirli bir ışık kaynağı ve özel optikler kullanır. SLA'da 2B bir model, tek veya iki fotonlu absorpsiyonla tetiklenebilen foto polimerizasyon ile katılaştırılır [61].

SLA'nın temel prensibi, ışık kaynaklarının ışığa duyarlı polimerlerin üzerine ışınlanmasıyla 3 boyutlu yapıların üretilmesini içerir. UV ve/veya görünür ışığın polimer reçine üzerine

düşmesine izin verildiğinde, monomerler ve oligomerler, katman biriktirme yöntemiyle bir katmanda sert bir yapı oluşturmak üzere bir araya gelir. İlk adım, SLA yazdırma için bilgisayar destekli tasarım (CAD) yazılımını kullanarak dijital bir model oluşturmayı içerir. İkinci adımda gelişmiş bir dijital tarayıcı, karmaşık yapıyı 3B modele dönüştürülür. Son olarak tasarlanan 3 boyutlu yapıyı oluşturmak için polimer kullanılır [61]. İşlem sırasında UV ışığıyla temas eden ince bir sıvı tabakası imalat yatağında katılaştırılır [78]. Bu tekniğin geliştirilip kullanılması eklemeli imalatlara geçiş için önemli bir adımdır. SLA'da kullanılan malzemeler hem toz hem de katı bazlı malzemelerdir ve PLA, ABS gibi termoplastik polimerler yaygın olarak kullanılır [61]. SLA malzemeleri kırılgan, toksik veya ışığa maruz kalmaya karşı hassas olsa da, son malzeme gelişmeleri bu sınırlamaları giderek azaltmaktadır [78]. SLA yazdırmanın avantajları arasında yüksek hız, güçlü yazdırma yapısı, yüksek çözünürlük ve çoklu ölçeklenebilirlik yer almaktadır [61].

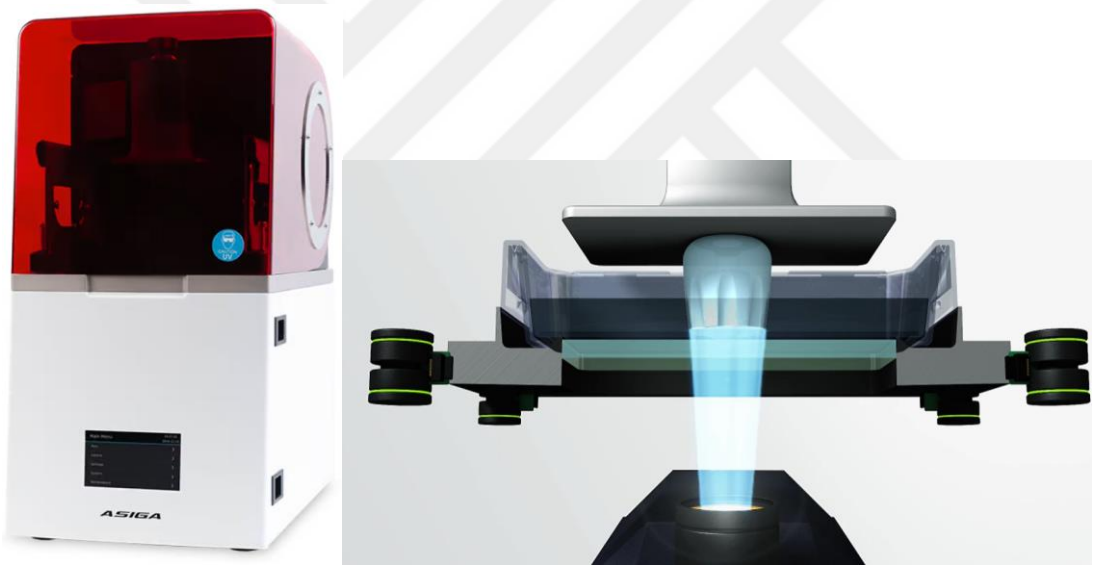
SLA, FDM' de sıklıkla meydana gelen nozül tıkanıklıklarıyla ilişkili sorunlara duyarlı değildir. Genel olarak hidrojeller hücre kültürüne mükemmel desteklerinden dolayı SLA, 3B baskı çalışmalarında çoğunlukla kullanılmaktadır. Özellikle jelatin gibi modifikasyon özelliği yüksek polimerlerden olan hidrojeller, önemli biyouyumlulukları ve ışık varlığında çapraz bağlanma yetenekleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür [79]. 3B baskı tekniğinin avantajları göz önünde bulundurulduğu zaman SLA tarafından üretilen polimer parçalar, geleneksel parçalarla karşılaştırıldığında çok daha zayıf mekanik özelliklere sahip olma eğilimindedir. Ek olarak, yüksek çapraz bağ yoğunlukları nedeniyle, SLA baskılı polimerler düşük uzama sergiler. Bu sorunların üstesinden gelmek için foto polimerlere mekanik özellikleri iyileştirmek amacıyla çeşitli tipte takviyeler eklenebilir [78]. Bununla birlikte, SLA yalnızca foto polimerize olabilen biyo-mürekkepleri kullanabilir ve biyo-mürekkeplerin sınırlı seçiciliği, hücre büyümesi ve farklılaşması için gereken ortamla yeterince eşleşmeyebilir [61].

- **Dijital Işık İşleme (DLP)**

İşlevsel ve anatomik olarak doğru dokular yaratma arayışı, araştırmacıları yenilikçi üretim teknolojilerini keşfetmeye yöneltmiştir; bunlar arasında DLP baskı, bu alanda en ileri araç olarak ortaya çıkmıştır. DLP, sıvı bir fotopolimer reçineyi ya da hidrojeli ışığa maruz bırakmak için dijital bir mikromirror cihazı (DMD) kullanan bir 3B baskı tekniğidir [80]. İlk olarak, imalat endüstrisi için hızlı prototipleme amacıyla kullanılmıştır (Şekil 4) [81]. Hidrojel veya reçine katman katman katılaşır ve hedeflenen 3B yapı üretilir. SLA ve FDM tekniklerinden farklı olarak DLP, çok daha hızlı üretim gerçekleştirir ve yüksek çözünürlüklüdür [82] [83]. Bu

sayede, istenilen geometri ve mikro mimarilere sahip karmaşık yapılı iskeleler hassas bir şekilde üretilir [84]. Üretilen bu iskeleler ise hücre bağlanması, çoğalması ve doku rejenerasyonu için yapısal bir çerçeve görevi görür. Karmaşık ve özelleştirilmiş yapılar oluşturma yeteneği, insan vücudundaki çeşitli dokuların doğal ortamını taklit etmek için büyük öneme sahiptir [85].

DLP'nin hassas ve yüksek çözünürlüklü ürünler üretebilme özelliği onun kullanım alanını da genişletmektedir [86]. Örneğin, doku mühendisliğinde üretimi zor olan hücre yüklü yapıların üretilmesi konusunda imkân sunar. Bu engelin aşılması biyolojik işlevselliğe sahip olan çok hücreli dokuların geliştirilmesini teşvik eder. Hücreli basıma ek olarak, DLP ile dokulara entegre kontrollü ilaç dağıtım sistemleri geliştirmek de mümkündür [87]. Bu sayede terapötik ajanların, büyüme faktörlerinin veya diğer biyoaktif moleküllerin lokalize olarak salınmasını sağlayarak mühendislikle üretilen dokuların rejeneratif potansiyelinin artması sağlanır [88].



Şekil 4. DLP 3B yazıcı ve cihazın iç mekanizması

Doku Mühendisliğinde DLP Baskının Avantajları:

Yüksek çözünürlük: DLP baskıdaki ürünlerin çözünürlüğü 100 μm'den daha düşük olabilmektedir [89].

Hız ve verimlilik: DLP baskıdaki katman katman kürleme işlemi, geleneksel yöntemlere kıyasla daha hızlı baskı süreleri sağlar. Bu artan hız sadece araştırma ve geliştirme sürecini hızlandırmakla kalmaz, aynı zamanda hücrelerin ve hassas biyomalzemelerin potansiyel olarak zarar verici koşullara maruz kalmasını da en aza indirir [90].

Malzeme çeşitliliği: DLP baskı, hidrojeller, polimerler ve diğer biyomimetik maddeler de dahil olmak üzere çok çeşitli biyouyumlu malzemelerle uyumludur. Bu çok yönlülük, araştırmacıların hedef dokuların mekanik ve biyolojik özelliklerine yakından benzeyen malzemeleri seçmelerine olanak tanır [90].

Gelecek vaat etmesi: DLP baskı teknolojisi ilerlemeye devam ettikçe, doku mühendisliğindeki rolü de muhtemelen genişleyecektir. Araştırmacılar yeni malzemeler keşfetmektedir, baskı parametrelerini optimize eder ve işlevsel doku ve organlar oluşturmak için yenilikçi stratejiler geliştirmektedir. Gelişmiş görüntüleme tekniklerinin ve CAD entegrasyonu, mühendislik ürünü yapıların hassasiyetini ve karmaşıklığını daha da artıracaktır [90].

1.7. Deri Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler

Doku mühendisliğinde hücre büyümesini, doku oluşumunu ve rejenerasyonu desteklemek için iskele olarak çeşitli polimerler kullanılmaktadır. Bu polimerler doğal veya sentetik olabilir ve biyouyumluluk, mekanik özellikler, bozunma oranı ve mühendisliği yapılan doku veya organın özel gereksinimleri gibi faktörlere göre seçilir. Polimerler, doğal dokuların özelliklerini taklit eden iskeleler, filmler, hidrojeller veya lifler gibi çeşitli şekillerde kompozit malzemeler oluşturmak için tek başına veya kombinasyon halinde kullanılabilir. Polimer seçimi, spesifik doku mühendisliği uygulamasına ve iskelenin istenen özelliklerine bağlıdır. İşte doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan bazı polimerler:

1.7.1. Doğal Polimerler

Gelatin:

Jelatin, öncül kolajenine (ECM'nin en bol bileşenlerinden biri) benzerlik gösteren doğal bir polimerdir [91]. Jelatin alkali ve asit hidrolizi olmak üzere iki şekilde ekstrakte edilebilir [92]. Asit hidrolizine tabi tutulduğunda jelatin, IP ≈ 5 olan A tipi olarak sınıflandırılır. Alkali bir ortamda ekstraksiyon, IP ≈ 9 olan B tipi jelatini ortaya çıkarır. Arginin-glisin-aspartik asit (RGD) motifi olarak bilinen amino asit dizileri de hücre yapışmasına, çoğalmasına ve farklılaşmasına yardımcı olur [91].

Başta biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve düşük toksisite olmak üzere avantajlı özellikleri, immünojenik bir tepkiye neden olmadan vücut enzimleri (metalloproteinazlar) tarafından parçalanırken aynı zamanda hücre yapışmasının, farklılaşmasının ve çoğalmasının artmasına olanak tanır [93] [94]. Ayrıca, uygun maliyetli

olduğu için çok çeşitli dokularda (kemik, iskelet, sinir) kullanılmış ve kemik rejenerasyonunu arttırmak için mikro partiküllerden, kanser tedavisinde kemoterapötik ajanların kontrollü salınımı için yara örtüsü veya hidrojellere kadar farklı sistemler oluşturmuştur [95] [96] [97].

Faydaları bu materyali doku mühendisliğinde kullanılmaya uygun hale getirse de, jelatin manipülasyonunun bazı potansiyel dezavantajları da vardır [93]. Bu polimerin göze çarpan bir özelliği, sıcaklığa bağlı olarak katı formdan jele dönüşen termostabilitenin olmamasıdır. Bu sınırlamanın üstesinden gelmenin en yaygın stratejilerinden biri, dizilerini fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlamaktır [92].

Öte yandan jelatinin suyu emme özelliği de bilinmektedir. Gözeneklilik, uygun hücre büyümesi için oksijenin yanı sıra besinlerin de difüzyonunu sağladığından, bu özellik doku yenilenmesinde oldukça değerlidir [98]. Ancak gözenekli yapılar, hücrenin hayatta kalması için ürün alışverişini sağlayacak tüm gereksinimleri her zaman karşılamamaktadır, çünkü gözeneklerin boyutu veya çapı yeterli değildir veya yeterince düzenli değildir ve bazı jelatin bazlı hücre dağıtım sistemleri zayıf bir hücre hayatta kalma oranı göstermiştir [99].

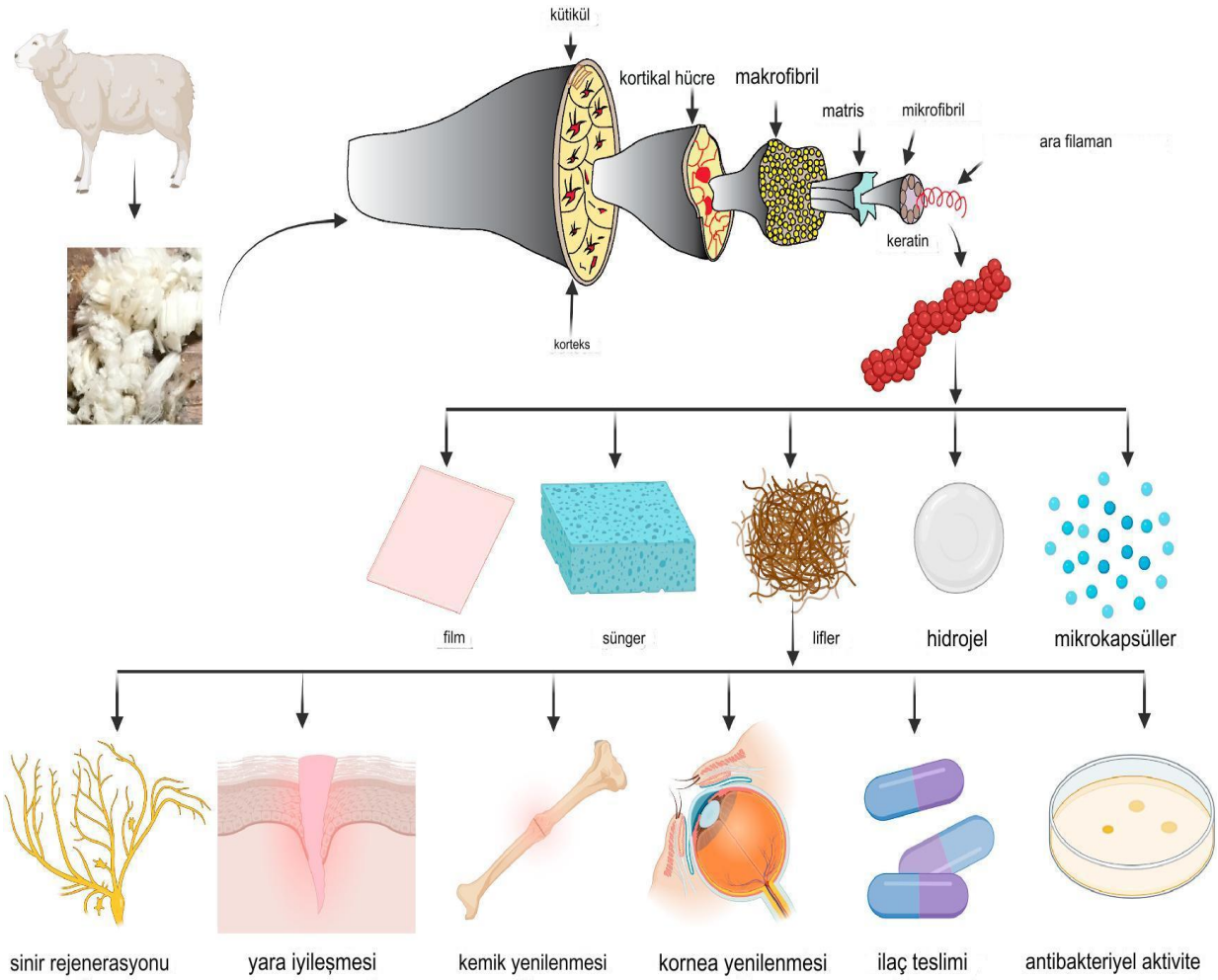
Doku rejenerasyonu amacıyla biyomateryallerin kullanılmaya başlanmasından bu yana jelatin, enjekte edilebilir hidrojeller, ilaç dağıtım sistemleri ve yapı iskeleleri gibi çeşitli sistemlerde kullanılmaktadır [93].

Keratin:

Tırnak, saç, yün, tüy, boynuz ve toynaklarda kolayca bulunan lifli bir protein olan keratin, yara iyileşmesi ve hemostaz için bir biyomateryal olarak 16. yüzyıl kadar erken bir tarihte kullanılmıştır. Yün yaklaşık %82 keratin proteinlerden (yüksek sistein içeriği), %17 keratin olmayan maddelerden (düşük sistein içeriği) ve %1 mumsu lipidler ve polisakkarit gibi protein olmayan maddelerden oluşur [100]. Ağırlıkça %95'e kadar keratin içeren yün [101], mekanik destek sağlayan biyomalzeme uygulamalarında veya hücresel faaliyetlerin (örneğin göç, yapışma ve çoğalma vb.) modüle edilmesini gerektiren uygulamalarda kullanılabilen zengin ve saf bir ara filament proteinleri (IFP'ler) kaynağıdır [102]. Molekül içi ve moleküller arası disülfit, hidrofobik, hidrojen ve iyonik bağların varlığı keratine mükemmel gerilme özellikleri tokluk, çözünmezlik, enzimatik parçalanmaya karşı direnç ve yüksek stabilite kazandırır [100]. Keratin ek kimyasal, fiziksel veya enzimatik çapraz bağlayıcılar olmadan karmaşık hiyerarşik yapılarda kendi kendine bir araya gelme yeteneğine sahiptir [103].

Keratin, çeşitli hücrelerin hücre yüzeyi integrin reseptörlerine bağlanan doku ECM'sini taklit eden RGD, lösin-aspartat-valin (LDV), lösin-aspartat-serin (LDS) ve glutamik asit-serin (EDS) integrin alanları gibi hücre bağlanmasını destekleyebilen bir dizi farklı hücresel bağlanma motifine sahiptir [104]. RGD, fibronektin, fibrinojen ve osteopontin gibi proteinler için bağlanma bölgesi sağlar ve LDV ve EDS bağlanma motifleri hücresel yapışmayı destekler [105]. Literatürde, keratinin uygun mitojenik ve kemotaktik özellikler sağlayarak hücrelerin davranışını uyaran aktif molekülleri tutabileceğini göstermiştir [100].

Keratin hidrofilik bir polimerdir ve bu da hücresel fonksiyonu geliştirmek için potansiyel bir biyomateryal olabileceğini göstermektedir [106]. Bu polimer, hücresel migrasyona katılımı önemli olan keratinosit epidermal hücrelerinde önemli bir protein olarak kabul edilir ve yün türevi oksitlenmiş keratin, keratinosit migrasyonunu hızlandırarak yeniden epitelizasyona yardımcı olarak ve yara iyileşmesinde önemli bir role işaret eden tip IV ve VII kolajeni yukarı doğru düzenleyerek yara onarımı üzerinde olumlu etkiler göstermiştir [107]. Keratin iskeleleri orta derecede çekme mukavemet, elastikiyet ve yüksek yapışma mukavemeti gibi yeterli mekanik özelliklere sahiptir [108]. İstisnai olarak keratin, insanlarda keratinaz enzimi bulunmadığı için kolajen (kolajenaz), kitosan (lizozim) gibi diğer proteinlere kıyasla in vivo bozunmaya karşı daha dirençlidir [109].



Şekil 5. Yün keratin bazlı malzemelerin doku mühendisliği uygulamalarında şematik gösterimi [92]

Keratin, Şekil 5'te de gösterildiği gibi biyomedikal ve rejeneratif tıp alanında güvenilir bir biyoaktif malzemedir. Keratin, hasarlı ve hastalıklı dokuları onarmaya yönelik uygulamalar için film, sünger, lif veya hidrojel gibi çeşitli formlarda manipüle edilebilir. Keratinin kimyasal yapısı, kendi kendine birleşme yeteneği, hücre bağlayıcı alanların varlığı ve bakteriyostatik etkileri gibi benzersiz mekanik ve biyolojik özellikleri, onu birçok geleneksel biyomalzemeden ayırmaktadır [100] [106].

Bu umut verici sonuçlara rağmen, yeniden yapılandırılmış keratin zayıf mekanik özellikleri ve kırılgan yapısı nedeniyle genellikle sınırlı uygulamaya sahiptir. Bu nedenle, sentetik ve doğal polimerlerin harmanlanması, rejenerasyon sürecini karşılamak için kompozitlerin hücre afinitesini, biyoaktivitesini ve mekanik mukavemetini farklı şekillerde iyileştirme güdüsüyle vurgulanmaktadır [100].

Kolajen:

Kaynak: Bağ dokuların ECM'lerindeki ana yapısal protein, genellikle sığır veya domuz gibi hayvanlardan elde edilir [110].

Özellikleri: Biyouyumludur [111], hücre yapışmasını ve göçünü destekler [110].

Uygulamalar: Deri, kemik, kıkırdak ve vasküler doku mühendisliği için yaygın olarak kullanılır. Hücreler için biyomimetik bir ortam sağlar [111].

Hiyalüronik Asit (HA):

Kaynak: İnsan vücudunda, özellikle ciltte ve bağ dokularında doğal olarak bulunur [112].

Özellikleri: Yüksek su tutma kapasitesi, kayganlaştırıcı ve viskoelastik özellikler [113].

Uygulamalar: Cilt onarımı ve yara iyileşmesi gibi yumuşak doku mühendisliği için yaygın olarak kullanılır [113].

Fibrin:

Kaynak: Kan pıhtılaşma proteini fibrinojenden elde edilir [114].

Özellikleri: Hücre yapışmasını, çoğalmasını ve göçünü teşvik eder. Biyolojik olarak parçalanabilir [114].

Uygulamalar: Genellikle doku onarımında, özellikle de yara iyileşmesinde hücre iletimi için bir iskele olarak kullanılır [114].

Kitosan:

Kaynak: Kabukluların dış iskeletlerinde bulunan doğal bir polimer olan kitinden türetilmiştir [115].

Özellikleri: Biyouyumlu, antibakteriyel ve hücre yapışmasını destekler [115].

Uygulamalar: Deri, kemik ve kıkırdak rejenerasyonu dahil olmak üzere çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında kullanılır [115].

1.7.2. Sentetik Polimerler

Poli(laktik asit) (PLA):

Özellikler: Biyolojik olarak parçalanabilir ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilir [116].

Uygulamalar: Kemik ve kıkırdak doku mühendisliğinde iskeleler için kullanılır [116].

Polietilen glikol (PEG):

Özellikleri: Hidrofiliktir ve özel ihtiyaçlar için modifiye edilebilir [117].

Uygulamalar: Hücre kapsüllemesi için hidrojellerde, ilaç dağıtım sistemlerinde ve bağışıklık tepkisini azaltmak için biyomalzemeler için bir kaplama olarak kullanılır [117] [118].

Polikaprolakton (PCL):

Özellikler: Biyolojik olarak parçalanabilir ve yavaş bir bozunma oranına sahiptir [119].

Uygulamalar: Doku rejenerasyonu için iskelelerde, özellikle diğer polimerlerle kombinasyon halinde kullanılır [119].

Poliüretan:

Özellikler: Çok yönlüdür ve özel uygulamalar için uyarlanabilir [120].

Uygulamalar: Kardiyovasküler doku mühendisliğinde, yara örtülerinde ve sinir rejenerasyonunda kullanılır [121]. Mekanik güç ve esneklik sağlar [120].

Bu polimerler, doğal dokuların özelliklerini taklit eden iskeleler, filmler, hidrojeller veya lifler gibi çeşitli şekillerde kompozit malzemeler oluşturmak için tek başına veya kombinasyon halinde kullanılabilir. Polimer seçimi, spesifik doku mühendisliği uygulamasına ve iskelenin istenen özelliklerine bağlıdır.

1.8. Deri Dokularının Hücre Kaynakları

Kök hücreler, çeşitli özelleşmiş hücre tiplerine dönüşmek için olağanüstü bir yeteneğe sahip olan farklılaşmamış hücrelerdir [122]. İki temel özellik ile karakterize edilirler: kendini yenileme ve pluripotensi [123].

Kendini Yenileme: Kök hücreler bölünebilir ve özdeş yavru hücreler üretebilir, bu da

farklılaşmamış bir durumu sürdürmelerine ve zaman içinde popülasyonlarını yenilemelerine olanak tanır. Bu kendini yenileme kapasitesi, bir kök hücre popülasyonunun uzun vadeli bakımı için gereklidir [124].

Pluripotensi: Kök hücreler pluripotenttir, yani üç germ katmanını temsil eden çeşitli hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptirler: endoderm, mezoderm ve ektoderm. Pluripotent kök hücreler vücuttaki farklı doku ve organların hücrelerini meydana getirebilir [125] [126].

Kök hücreler gelişim, doku onarımı ve rejenerasyonda çok önemli bir rol oynamaktadır. Eşsiz özellikleri onları, hastalıkların ve yaralanmaların tedavisinde kök hücrelerin terapötik potansiyelinden yararlanmanın amaçlandığı rejeneratif tıp da dahil olmak üzere çeşitli alanlarda araştırmaların odağı haline getirmektedir [127]. Kök hücreler tıbbi uygulamalar için büyük umut vaat etse de özellikle embriyonik kök hücreler olmak üzere belirli kök hücre türlerinin kullanımıyla ilgili etik hususlar olduğunu belirtmek önemlidir. Etik kaygıları gidermek için indüklenmiş pluripotent kök hücreler gibi alternatif yaklaşımlar ve kök hücre kaynakları aktif olarak araştırılmaktadır [128] [129].

Aşağıdakiler de dahil olmak üzere çeşitli kök hücre türleri vardır:

1.8.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MSC'ler)

Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen bir tür multipotent stromal hücrelerdir. Tipik olarak kemik iliğinde bulunurlar, ancak adipoz (yağ) dokusu, göbek kordonu kanı ve plasental doku gibi diğer dokulardan da izole edilebilirler [130].

Mezenkimal kök hücreler, kemik hücreleri (osteoblastlar), kıkırdak hücreleri (kondrositler) ve yağ hücreleri (adipositler) dahil olmak üzere mezodermal soydan gelen hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir. Çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneği, onları rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında değerli kılmaktadır [130].

Farklılaşma potansiyellerine ek olarak, mezenkimal kök hücreler immünomodülatör ve anti-inflamatuar özelliklere de sahiptir [130]. Bağışıklık tepkisini modüle edebilirler ve çeşitli inflamatuar ve otoimmün bozuklukların tedavisinde potansiyel kullanımları için incelenmişlerdir [131].

Mezenkimal kök hücrelerin osteoartrit, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün bozukluklar ve kemik ve kıkırdak gibi dokulardaki yaralanmalar gibi durumların tedavisindeki terapötik

potansiyelini keşfetmek için araştırma ve klinik çalışmalar devam etmektedir. Bu alanda önemli bir ilgi ve umut olsa da, mezenkimal kök hücrelerin terapötik yeteneklerini tam olarak anlamak ve kullanmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu belirtmek önemlidir [132].

1.8.2. Embriyonik Kök Hücreler (ESC'ler)

Embriyonik kök hücreler (ESC'ler), erken evre bir embriyo olan gelişmekte olan bir blastosistin iç hücre kütlesinden türetilen pluripotent hücrelerdir [133]. Pluripotent hücreler, üç germ katmanının (endoderm, mezoderm ve ektoderm) tüm hücrelerine farklılaşma konusunda benzersiz bir yeteneğe sahiptir ve bu da onlara vücuttaki herhangi bir hücre tipini oluşturma potansiyeli verir. Bu olağanüstü özellik, embriyonik kök hücreleri gelişim biyolojisini incelemek için değerli bir araç haline getirmekte ve rejeneratif tıp için büyük umut vaat etmektedir [134].

Embriyonik kök hücrelerin temel özellikleri şunlardır:

Pluripotensi: Embriyonik kök hücreler, her üç embriyonik germ katmanından dokuları temsil eden çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir [134].

Kendini Yenileme: ESC'ler, farklılaşmamış bir durumu koruyarak bölünme ve özdeş yavru hücreler üretme yeteneğine sahiptir. Bu kendini yenileme kabiliyeti, araştırma veya potansiyel terapötik uygulamalar için büyük miktarlarda hücre üretilmesini sağlar [134].

Embriyonik Kökenli: Bu hücreler, embriyonik gelişimin erken aşamalarında oluşan blastosistin iç hücre kütlesinden türetilir [134].

Araştırma ve Terapötik Potansiyel: Pluripotent doğaları nedeniyle, embriyonik kök hücreler rejeneratif tıp, doku replasman tedavileri ve gelişim ve hastalık mekanizmalarını anlama potansiyelleri açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir [135].

Embriyonik kök hücrelerin kullanımının etik kaygılara yol açtığını belirtmek önemlidir çünkü bunların elde edilmesi embriyoların yok edilmesini gerektirmektedir [136]. Sonuç olarak, yetişkin hücrelerden benzer pluripotent özelliklere sahip olacak şekilde yeniden programlanan indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler) gibi alternatif yaklaşımlar, bu etik hususların bazılarını ele almak için geliştirilmiştir [137].

Embriyonik kök hücreleri içeren araştırmalar, hücre farklılaşması, gelişim biyolojisi ve potansiyel terapötik uygulamaları anlamamıza önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Bununla

birlikte, etik ve düzenleyici hususlar bu hücrelerin araştırma ve klinik ortamlarda kullanımını şekillendirmeye devam etmektedir.

1.8.3. Fibroblast Hücreleri

Fibroblastlar, doku ve organlara yapısal destek sağlayan hücre dışı matris (ECM) ve kolajenin sentezinde ve korunmasında çok önemli bir rol oynayan bir tür bağ dokusu hücresidir. Bu hücreler deri, tendonlar, bağlar ve birçok organın stroması dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli bağ dokularında bulunur [138].

Fibroblastların temel özellikleri şunlardır:

ECM Sentezi: Fibroblastlar kolajen, elastin ve glikoproteinler gibi ECM bileşenlerinin üretilmesinden ve salgılanmasından sorumludur. ECM, hücreler için bir iskele sağlar, doku gücüne ve elastikiyetine katkıda bulunur ve hücresel davranışı etkiler [138].

Yara İyileşmesi ve Doku Onarımı: Fibroblastlar yara iyileşmesi ve doku onarımı sürecinde kritik bir rol oynar. Bir yaralanmadan sonra, hasar bölgesine göç ederler ve hasarlı bölgenin yerini alacak yeni bağ dokusunun oluşumuna katkıda bulunurlar [139].

İnflamasyonun Düzenlenmesi: Fibroblastlar bağışıklık tepkilerini modüle edebilir ve çeşitli dokularda inflamasyonun düzenlenmesine katılabilir [140].

Hücre İletişimi: Fibroblastlar sinyal yolları aracılığıyla diğer hücrelerle iletişim kurarak hücre davranışını ve doku homeostazisi etkiler [138].

Farklılaşma: Belirli koşullar altında fibroblastlar, kontraktil özelliklere sahip özelleşmiş bir hücre türü olan miyofibroblastlara farklılaşabilir. Miyofibroblastlar yara iyileşmesi sırasında doku kasılmasında rol oynar [138].

Kısaca fibroblastlar, özelliklerinde de belirtildiği üzere dokuların yapısal bütünlüğüne ve işlevine katkıda bulunan çok yönlü hücrelerdir. Bu hücrelerin biyolojisini anlamak doku mühendisliği, rejeneratif tıp ve aşırı fibroblast aktivitesinin anormal doku skarlaşmasına yol açabileceği fibrotik koşullar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisi bağlamında önemlidir [138] [141].

2. MALZEMELER VE YÖNTEM

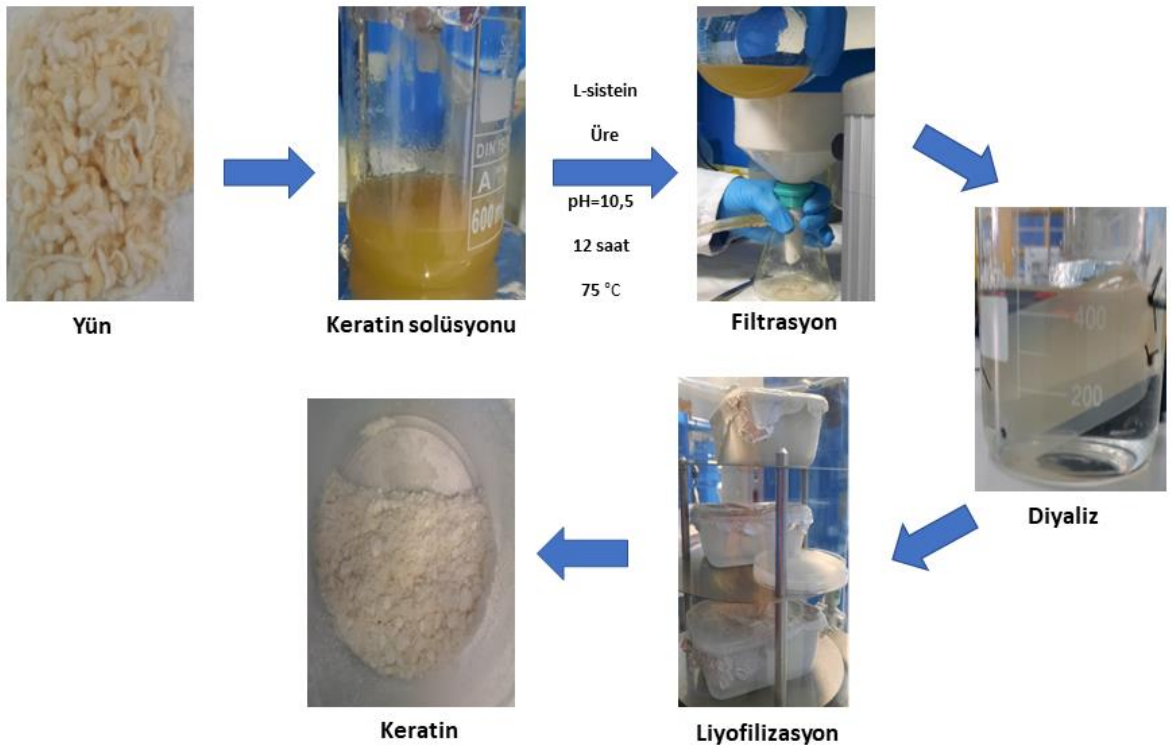
2.1. Malzemeler

Fosfat tamponlu salin (PBS, pH = 7.4) Winsent, Inc. şirketinden (Kanada) satın alınmıştır. Domuz derisinden elde edilen Jelatin Tip A, metakrilik anhidrit (MAA) ve diyaliz membranı (12-14 kDa) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Lityum fenil-2,4,6-trimetil-benzoil fosfinat (LAP) (%95 saflıkta, MW = 294.21 g/mol) Tokyo Kimya Endüstrisi' nden tedarik edilmiştir. Saf su MP MINIPURE ultra saf su cihazı MES medikal endüstriyel sistemler firmasından (Türkiye) temin edilmiştir. Sodyum karbonat (Na_2CO_3), sodyum hidroksit (NaOH) ve %37 HCl Merck KGaA'dan (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Sodyum hidrojen karbonat ($NaHCO_3$, >%99,7) ISOLAB'dan (Eschau, Almanya) temin edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Keratin Ekstraksiyonu

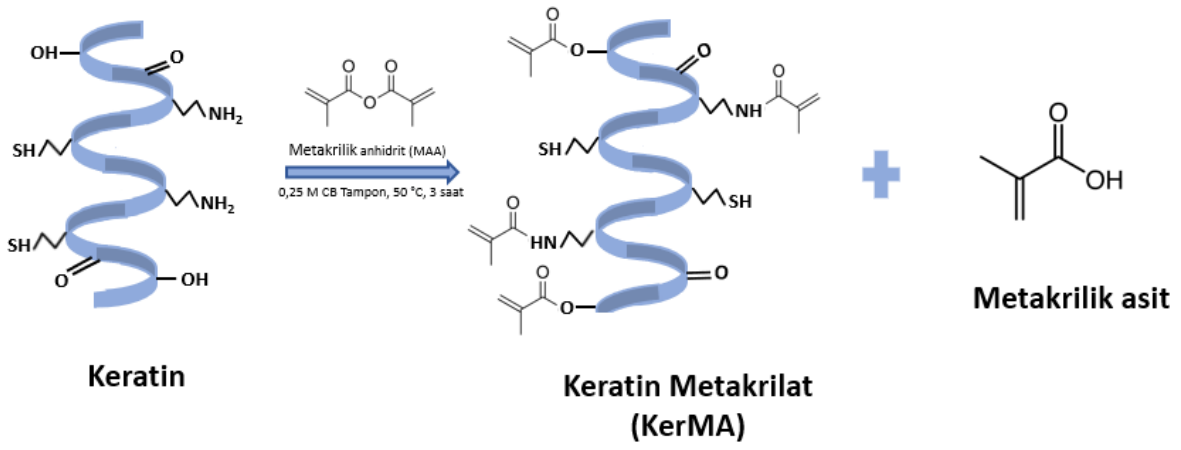
L-sistein kullanılarak koyun yününden keratin elde etme işlemi, Wang ve arkadaşları [142] tarafından belirlenen metodoloji modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Kısaca, temizlenmiş ve aseton: etanol (50:50) karışımında kurutulmuş koyun yünü liflerinden 5 gr yün tartılmıştır. Şekil 6'da da gösterildiği gibi yün, çözünme hızını arttırmak için makas kullanılarak milimetrik boyutlarda kesilmiştir. Daha sonra, 90 ml ultra saf suya 0,165 M L-sistein ve 8 M üre çözeltisi eklenmiştir. Ardından, çözeltinin pH'ı 75 °C' de 5 M NaOH kullanılarak 10,5' e ayarlanmış ve yaklaşık 12 saat boyunca karışmaya bırakılmıştır. Bir sonraki adım, keratin karışımının çoklu filtrasyonlarını ve ardından 3 gün boyunca diyaliz membranları (MWCO 12-14 kDa) kullanılarak 37 °C' de saf suya karşı diyaliz işlemini kapsamaktadır. Diyaliz suyu günde en az 3 kez değiştirilmiştir. Diyaliz işlemi tamamlandıktan sonra 3 gün boyunca kurutulmuş ve daha sonra kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.



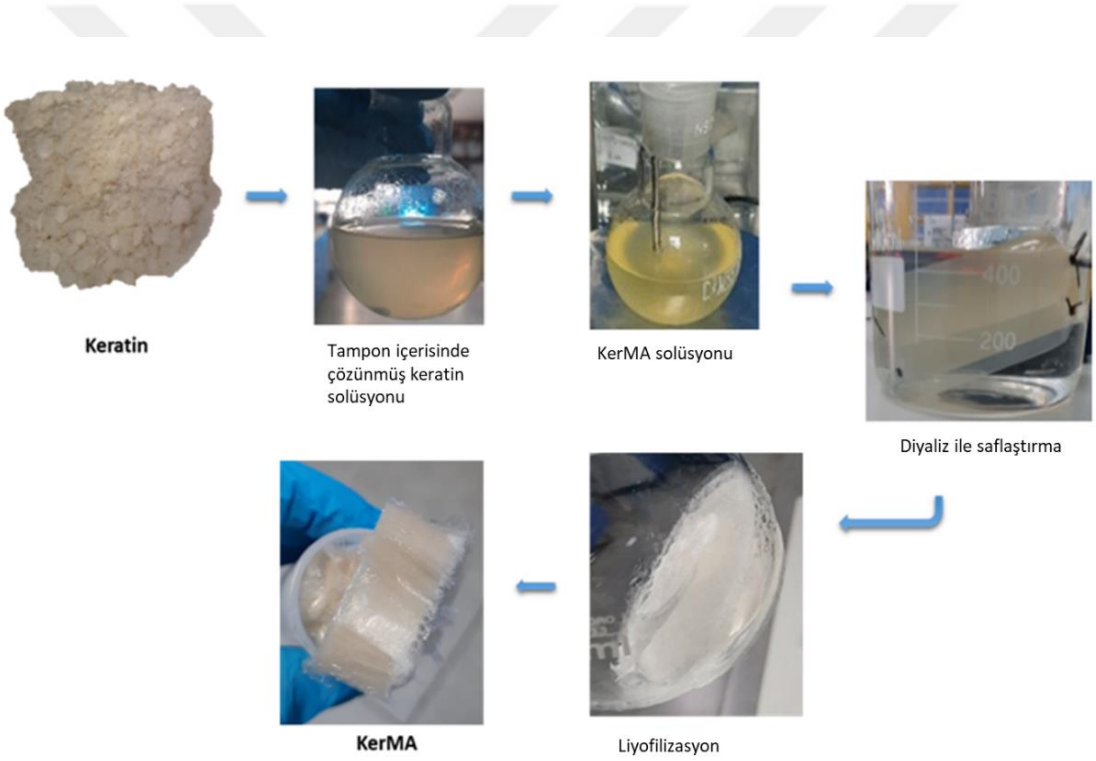
Şekil 6. Koyun yününden keratin eldesinin şematik gösterimi

2.2.2. Keratin Metakrilat (KerMA) Sentezi

Şekil 7'de de şema olarak gösterildiği gibi ekstrakte edilen 6 gr keratin 50 ml 0,25 M sodyum bikarbonat tamponu (CB) (pH = 9,5) içinde çözdürülmüştür. Çözelti 50 °C' ye ve pH 9,00' a ayarlanmıştır. Metakrilasyon reaksiyonu MAA' nın 0,5 ml/dk hızında eklenmesiyle başlatılmıştır. 3 saatin sonunda reaksiyonu durdurmak için tampon çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra, karışım diyaliz membranları (MWCO 12-14 kDa) kullanılarak 37 °C' de 10 gün boyunca saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Son olarak, toz formdaki KerMA 3 gün boyunca liyofilizasyon sonucunda elde edilmiştir (Şekil 8). KerMA, bir sonraki kullanıma kadar -20 °C' de saklanmıştır.



Şekil 7. KerMA sentezinin kimyasal gösterimi

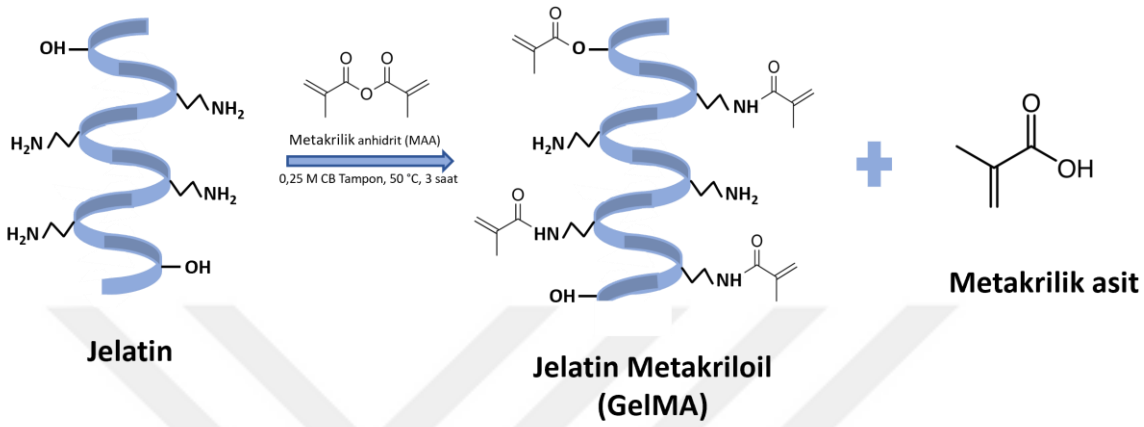


Şekil 8. KerMA sentezi

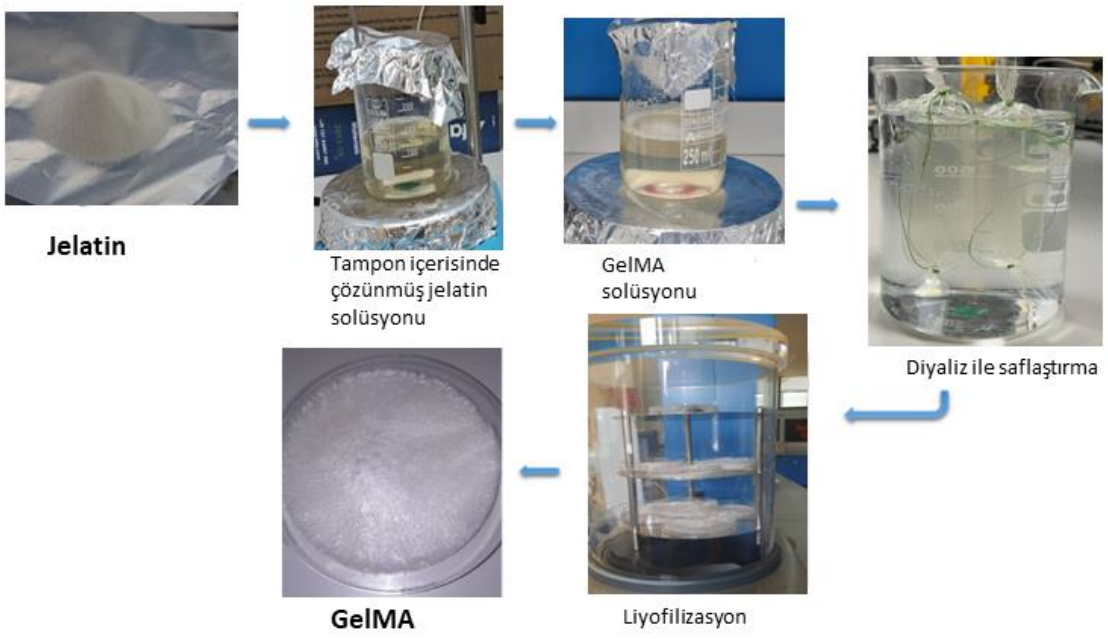
2.2.3. GelMA Sentezi

GelMA daha önce literatüre sunulan bir yöntem kullanılarak sentezlenmiştir [143]. Başlangıçta, Tip A domuz derisi jelatini CB tamponunda (1 L damıtılmış suda 3,18 gr sodyum karbonat ve 5,86 gr sodyum bikarbonat içeren 0,1 M CB tamponu pH 9,00) 60 °C'de %10 (w/v) konsantrasyonda çözdürülmüştür. Reaksiyonun şematik gösterimi Şekil 9' da gösterilmiştir. Jelatinin çözünmesinden sonra, jelatinin gramı başına 0,1 mL MAA damla damla ilave edilerek

50 °C' de 3 saat boyunca jelatinin fonksiyonel grupları ile reaksiyona sokulmuştur. 3 saat sonra pH 7.4' e ayarlanarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Kalan tuzlar ve reaksiyona girmemiş MAA, 12-14 kDa kesme değerine sahip bir diyaliz membranı kullanılarak 4 gün boyunca 37 °C' de distile suya karşı bir diyaliz işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Ardından, diyaliz çözeltisi 4 gün boyunca liyofilize edilmiş ve bir sonraki kullanıma kadar +4 °C' de saklanmıştır (Şekil 10).



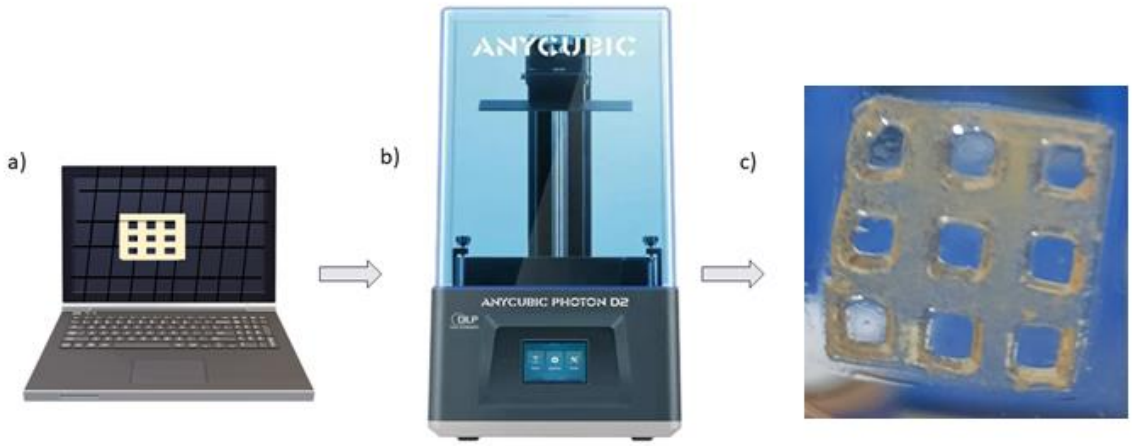
Şekil 9. GelMA sentezinin kimyasal gösterimi



Şekil 10. GelMA sentezi

2.2.4. Doku İskelesi Tasarımı ve Üretimi

Izgara model iskeleler için CAD dosyaları SolidWorks 2020 (Dassault Systèmes SE, Vélizy-Villacoublay, Fransa) kullanılarak oluşturulmuştur. İskeleler, 3x3 kare gözeneklerden oluşan 17,9x17,9x1,3 mm^3 olacak şekilde tasarlanmıştır. Her bir gözenek 3x3 mm^2 çapında ve porlar aralarındaki mesafe 3 mm olarak belirlenmiştir. Tasarımlar *.stl* formatına dönüştürülmüş ve 3D yazıcı yazılımı Chitubox (Shenzhen Chuangbide Technology Co. Ltd., Shenzhen City, Çin) kullanılarak cihaza uyarlanmıştır (Şekil 11a). Doku iskelelerini üretmek için ticari olarak erişilebilir DLP tabanlı 3B yazıcı (Anycubic Photon D2) kullanılmıştır. Cihaz 405 nm dalga boyunda ışığa sahiptir.



Şekil 11. GelMA tabanlı iskelelerin tasarım ve üretiminin şematik gösterimi, bilgisayarda CAD model tasarımı (a), iskeleleri oluşturmak için DLP cihazında hidrojelin kürlenmesi (b), 3B baskılı GelMA tabanlı iskeleler (c)

Manyetik bir karıştırıcı kullanılarak, %10 (a/h) ticari GelMA çözeltisi PBS içinde keratin ve KerMA çözeltileri (%1, %3, %5 ve %10 (a/h)) tampon çözeltisinde 50 °C' de yaklaşık 30 dakikada hazırlanmıştır. Çözünmüş GelMA ile keratin ve KerMA çözeltileri karıştırılarak yaklaşık 15 dakika daha karıştırılmıştır. Ardından, foto-başlatıcı olarak %0,5 (a/h) LAP çözünmüş çözeltiye eklenmiş ve 15 dakika daha karıştırılmıştır. Karışım daha sonra DLP cihazının tankına aktarılmıştır ve basım başlatılmıştır (Şekil 11b). Üretilen 3B doku iskeleler -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 11c).

2.3. Doku İskelelerin Karakterizasyonu



Şekil 12. Karakterizasyon cihazlarının görüntüleri, (A) Uv-vis cihazı, (B) Reometre cihazı, (C) Basma testi cihazı, (D) SEM cihazı ve (E) FT-IR cihazı

2.3.1. ^{1}H NMR Testi

GelMA ve KerMA'nın metakrilasyon dereceleri (DS) ^{1}H-NMR spektroskopisi (Bruker Avance III 600 MHz, Bremen, Almanya) kullanılarak araştırılmıştır. Jelatin, GelMA, keratin ve KerMA D_2O içinde 10 mg/ml konsantrasyonda çözdürülmüştür. ^{1}H-NMR spektrumları 600 MHz frekansında ve oda sıcaklığında elde edilmiştir. GelMA' nın DS değeri aşağıdaki denklem (1)'e göre hesaplanmıştır:

$$\text{DS (\%)} = \left(1 - \frac{GelMA\ lizin\ metilenin\ pik\ alanı}{jelatin\ lizin\ metilenin\ pik\ alanı}\right) \text{ x } 100 \qquad (1)$$

2.3.2. 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) Analizi

DS' yi ölçmek için KerMA'nın modifiye edilmemiş e-amino gruplarının sayısını belirlemek üzere 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS veya TNBSA) kullanılmıştır. Bu testte metot olarak Yu ve arkadaşlarının daha önce geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır [144]. Başlangıçta, her bir numune %1,0 oranında damıtılmış suda çözdürülmüştür. Ardından, çözelti 15 ml' lik

plastik bir tüpe eklenmiştir. Daha sonra, her bir numuneden 100 µl alınıp 800 µl CB tamponu ile karıştırılmıştır. Karıştırma çözeltisi bir TNBS çözeltisi ile birleştirilmiş ve ardından 40 dakika boyunca 37 °C' de ısıtılmıştır. Ardından, TNBS reaksiyonu 250 µl 0,1 M HCl eklenerek durdurulmuş ve çözelti 40 dakika boyunca 37 °C' de stabilize edilmiştr. Reaksiyon ürününün homojen bir şekilde karışmasını sağlamak için tüpler vortekslenmiştir. Son olarak, reaksiyon çözeltileri spektrofotometrik analize tabi tutulmuştur. Absorbans UV-vis spektrofotometresinde (UV-2600, Shimadzu, Japonya) 349 nm' de ölçülmüştür (Şekil 12A).

TNBS yöntemi için 500 µl 1,6 mg/ml jelatin ve GelMA 0,1 M sodyum bikarbonat çözeltisinde çözüldükten sonra 2 ml' lik eppendorf tüplerine eklenmiştir. Ardından, 500 µl %0,2 TNBS çözeltisi eklenmiş ve tüpler 37 °C' de 3 saat bekletilmiştir. Daha sonra, reaksiyonu durdurmak için tüplere 250 µl 1 M HCl ve 500 µl %10 SDS çözeltisi eklenmiştir. Jelatin ve GelMA örneklerinin absorbans değeri UV-vis spektrofotometre (UV-2600, Shimadzu, Japonya) kullanılarak 335 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Şekil 12A). Jelatin ve GelMA' daki serbest primer amino gruplarının molar konsantrasyonu lizin kalibrasyon eğrisi temel alınarak hesaplanmıştır [145].

2.3.3. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Tüm doku iskelelerinin kimyasal yapıları, fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (Jasco, FT/IR 4700, Pfungstadt, Almanya) kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 12E). Oda sıcaklığında ortalama 4 cm^{-1} çözünürlükte 32 tarama ile 4000-400 cm^{-1} dalga boyu arasında ölçümler yapılmıştır.

2.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

DLP yöntemiyle üretilen GelMA tabanlı doku iskelelerinin morfolojisini incelemek için taramalı elektron mikroskobu (EVA MA 10, ZEISS, San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır (Şekil 12D). SEM görüntüsü alınmadan önce boyutlarına göre kesilen doku iskelelerinin yüzeyi 120 saniye boyunca püskürtmeli kaplayıcı (SC7620, Quorum, Lewes, BK) kullanılarak ince bir altın tabakası ile kaplanmıştır. Analiz için 10 kV voltaj uygulanacak ve taramalar için çeşitli büyütmeler kullanılmıştır.

2.3.5. GelMA Tabanlı Doku İskelelerin Mekanik Testleri

Basma test cihazı (EZ-LX, Shimadzu, Kyoto, Japonya) kullanılarak GelMA bazlı iskelelerin mekanik dayanımı incelenmiştir (Şekil 12C). İskeleler paslanmaz çelik bir plaka üzerine 2 mm mesafede yerleştirilmiş ve iskelelerin eksenine dik olarak 0,1 mm/dk sabit hızda eksenel kuvvet

uygulanmıştır. Her test üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

2.3.6. Şişme ve Degradasyon Testleri

Doku iskelelerinin şişme davranışlarını gözlemlemek için GelMA bazlı keratin ve KerMA içeren iskeleler pH değeri 7,4 olan bir PBS çözeltisine daldırılarak 37 °C' ye ayarlı bir termal çalkalayıcıya (BIOSAN TS-100) yerleştirilmiştir. İskelelerin ilk kuru ağırlıkları kaydedilmiş ve test için belirli sürelerde (5 dk, 15 dk, 30 dk, 60 dk ve 120 dk) PBS içerisinde bekletilmiştir. Her bir süre tamamlandığında, iskeleler filtre kâğıdı kullanılarak fazla sıvıdan uzaklaştırılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir. Testin sonunda, denklem (2) kullanılarak her bir malzemenin şişme oranı hesaplanmıştır:

$$Şişme\ Oranı = \frac{W_W - W_0}{W_0} x100 \quad (2)$$

W_w iskelelerin şiştikten sonraki ıslak ağırlığını belirtirken, W_0 iskelelerin şişmeden önceki ağırlığını ifade etmektedir. Daha doğru bir analiz için tüm deney grupları 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

İskelelerin bozunma özellikleri PBS çözeltisi (pH 7,4) içinde ve 37 °C' ye ayarlı bir termal çalkalayıcıda (BIOSAN TS-100) gerçekleştirilmiştir. İskelelerin ilk kuru ağırlıkları kaydedildikten sonra birikimli olarak 3, 6 ve 9 saat boyunca 37 °C' ye ayarlı termal çalkalayıcıda bekletilmiştir. Sürenin sonunda PBS' den uzaklaştırılan iskeleler oda sıcaklığında 24 saat boyunca kurutulmuştur. Tamamen kuruyan doku iskelelerinin kuru ağırlıkları kaydedilerek yeni PBS eklenmesiyle bir sonraki ölçüm başlatılmıştır. Analiz sona erdiğinde iskelelerin bozunma oranını gözlemlemek için denklem (3) kullanılmıştır.

$$Degredasyon\ Oranı = \frac{W_0 - W_f}{W_0} x100 \quad (3)$$

W_f iskelelerin sonraki kuru ağırlığını belirtirken, W_0 iskelelerin ilk ağırlığını ifade etmektedir. Her bir deney grubu 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

2.3.7. *In Vitro* Biyouyumluluk Testleri

<u>İndirekt Sitotoksisite Deneyi</u>

GelMA, GelMA/keratin ve GelMA/KerMA iskele örneklerinin antiproliferatif özelliklerini belirlemek için L929 fare fibroblast hücreleri (ATCC; CCL-1) kullanılmıştır. Hücreler %10

fetal sığır serumu (FBS) ve 100 UI/ml penisilin/streptomisin içeren Dulbecco modifiyeli Eagle besi yeri/Nutrient Karışım F-12) (DMEM/F-12) kullanılarak %5 CO2 inkübatöründe 37 °C'de kültüre edilmiştir. Hücre canlılığı XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) testi kullanılarak belirlenmiş ve ölçümler üç kez tekrarlanmıştır. Bunun için öncelikle iskeleler, UV ışını altında sterilize edilmiş ve %5 CO2 inkübatöründe 37 °C'de 1, 3 ve 7 gün boyunca hücre kültürü besi yeri içerisinde inkübe edilmiştir. Ardından, hücreler $1x10^4$ hücre/kuyu yoğunluğunda 96 kuyulu mikro plakaya ekilmiş ve %5 CO2 inkübatöründe 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki tüm besiyeri atılmış ve her kuyucuğa iskelelerin inkübe edildiği besi yerinden 100 µl eklenmiştir. Mikro plaka 24 saat CO2 inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki tüm besiyeri uzaklaştırılmış ve 100 µl XTT çözeltisi eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra ELISA mikro plaka okuyucu kullanılarak 450 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Hücre canlılığı, her bir örnek için ortalama absorbans değerlerinin kontrolün ortalama absorbans değerine bölünmesiyle hesaplanmıştır [146] [147] [148].

2.3.8. Hücre Tutunma Deneyi

Fibroblast hücrelerinin GelMA, GelMA/keratin ve GelMA/KerMA iskelelerine tutunması ve yayılması SEM ile görselleştirilmiştir. İlk olarak, iskele örnekleri 8 mm çapında kesilmiş ve 96 kuyucuklu bir mikroplakaya yerleştirilmiştir. L929 hücreleri örneklerin üzerine $1x10^6$ hücre/kuyu yoğunluğunda ekilmiş ve %5 CO_2 inkübatöründe 37 °C' de 1, 3 ve 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Besiyerisiz numune kontrol olarak kullanılmış ve ölçümler üç kez tekrarlanmıştır. İnkübasyondan sonra, kuyucuklardaki tüm besiyeri çıkarılmış ve hücre fiksasyonu için her kuyucuğa 100 µl %10 formalin eklenmiştir. Mikroplaka 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki formalin uzaklaştırılmış ve örnekler 1x PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Son olarak SEM cihazı ile 10 kV' da görüntüler alınmıştır. Bu görüntüler L929 hücrelerinin örnekler üzerindeki adezyon ve proliferasyonunu incelemek için kullanılmıştır [149] [150].

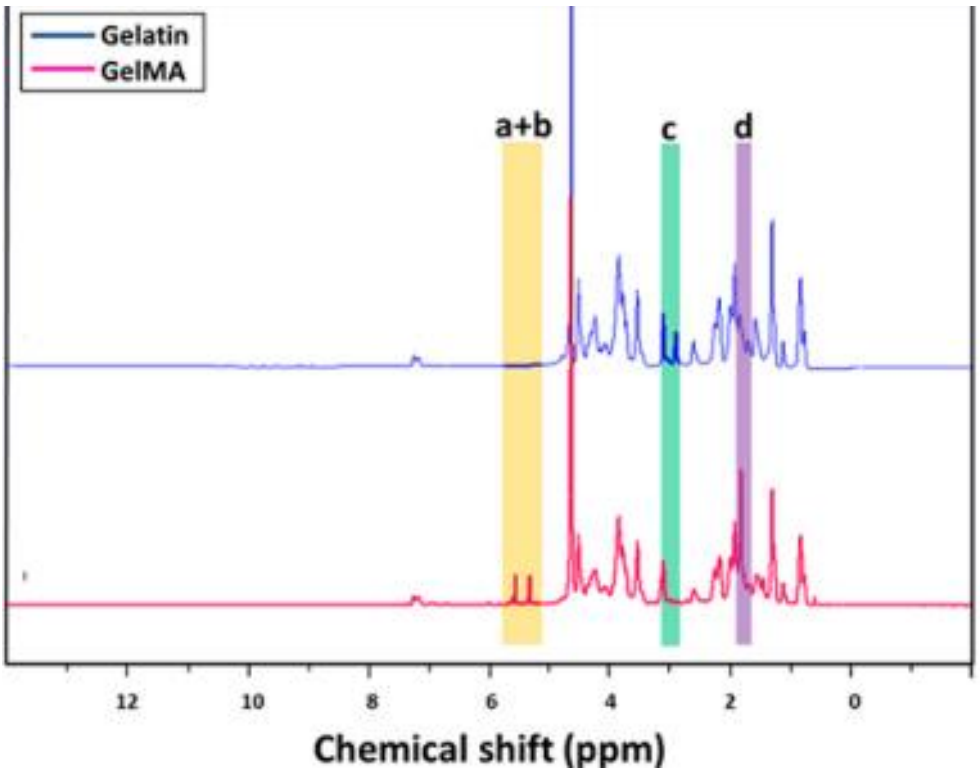
2.3.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi GraphPad istatistik yazılımı (GraphPad Inc. CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnek ve kontrol ortalamaları eşleştirilmemiş t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. p-değerinin 0,05 'ten küçük olması ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur [151].

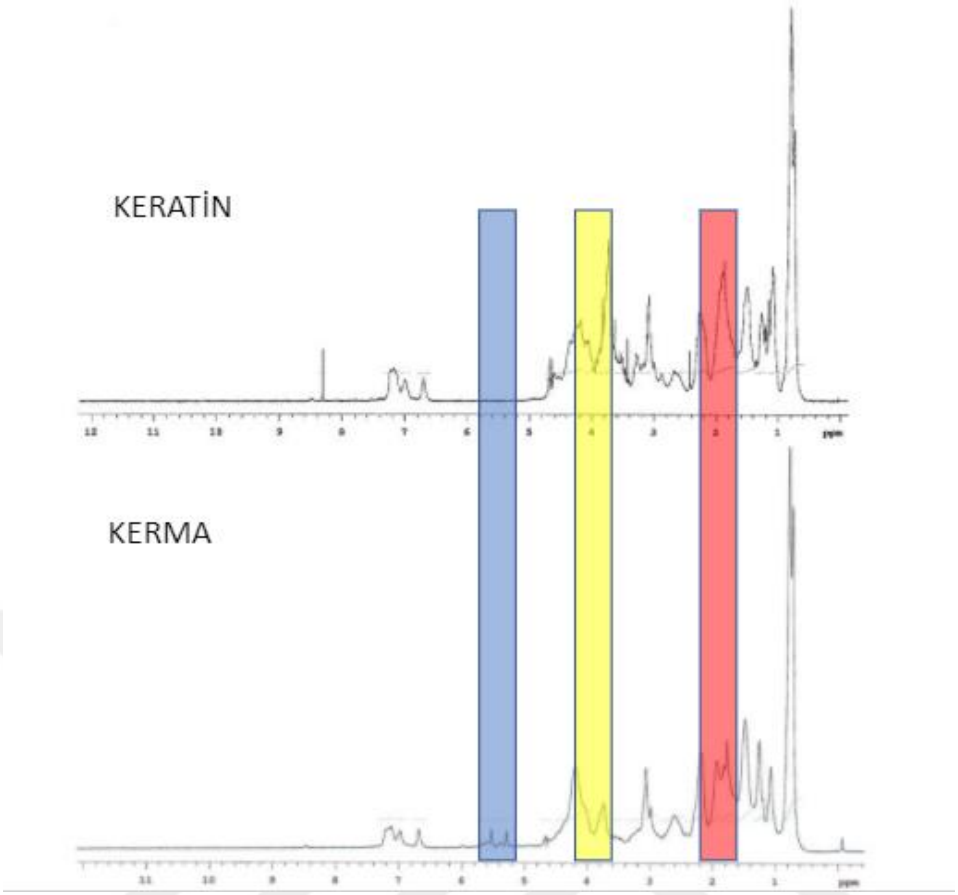
3. SONUÇ VE BULGULAR

3.1. KerMA ve GelMA Hidrojelinin ^{1}HNMR Analizi

Jelatinin metakriloil grupları ile başarılı bir şekilde ikame edildiğini doğrulamak için ^{1}H-NMR analizi yapılmıştır (Şekil 13). Jelatinin ^{1}H-NMR Spektrumu ile karşılaştırıldığında, GelMA turuncu (a+b), yeşil (c) ve mor (d) olarak etiketlenen metakriloil gruplarına karşılık gelen yeni sinyaller sergilemiştir. GelMA' nın özelliklerini daha iyi keşfetmek için yapılan bu çalışmada, fenilalanin piklerini (7,1-7,4 ppm) standart olarak aldığımızda, Şekil 13' teki ^{1}H-NMR spektrumları GelMA zincirlerinde, yaklaşık 5,3 ve 5,6 ppm (a+b) kimyasal kaymalarındaki sinyaller, jelatin omurgasının lizin ve hidroksilizin kalıntılarına aşılanmış metakriloil grubunun akrilik protonlarına (2H) atfedilmiştir. Bu sonuç, anhidrit yapısında metakrilat anhidritin vinil gruplarının varlığıyla ilişkili olan C=C bağının varlığına işaret etmektedir [152]. GelMA spektrumunda yaklaşık 1,8 ppm' deki sinyal, aşılanmış metakriloil grubunun metil protonlarına (3H) atanmıştır. Ayrıca, jelatine kıyasla GelMA' da lizin metileniyle (2H) ilişkilendirilen yaklaşık 2,9 ppm' deki sinyalin yoğunluğunda bir azalma gözlenmiştir [153]. Lizin reaksiyon bölgesi olduğundan, bu bulgu %75,4 olduğu tahmin edilen DS' yi ölçmek için kullanılmıştır [145]. KerMA'nın ^{1}H-NMR pikleri incelendiğinde, GelMA ile benzer sonuçlar verdiğini ve DS değerinin de aynı olduğu görülmüştür.



Şekil 13. Jelatin ve GelMA'nın ^{1}H-NMR spektrumları [143]



Şekil 14. Keratin ve KerMA'nın ^{1}H-NMR spektrumları

3.2. TNBS Analizi

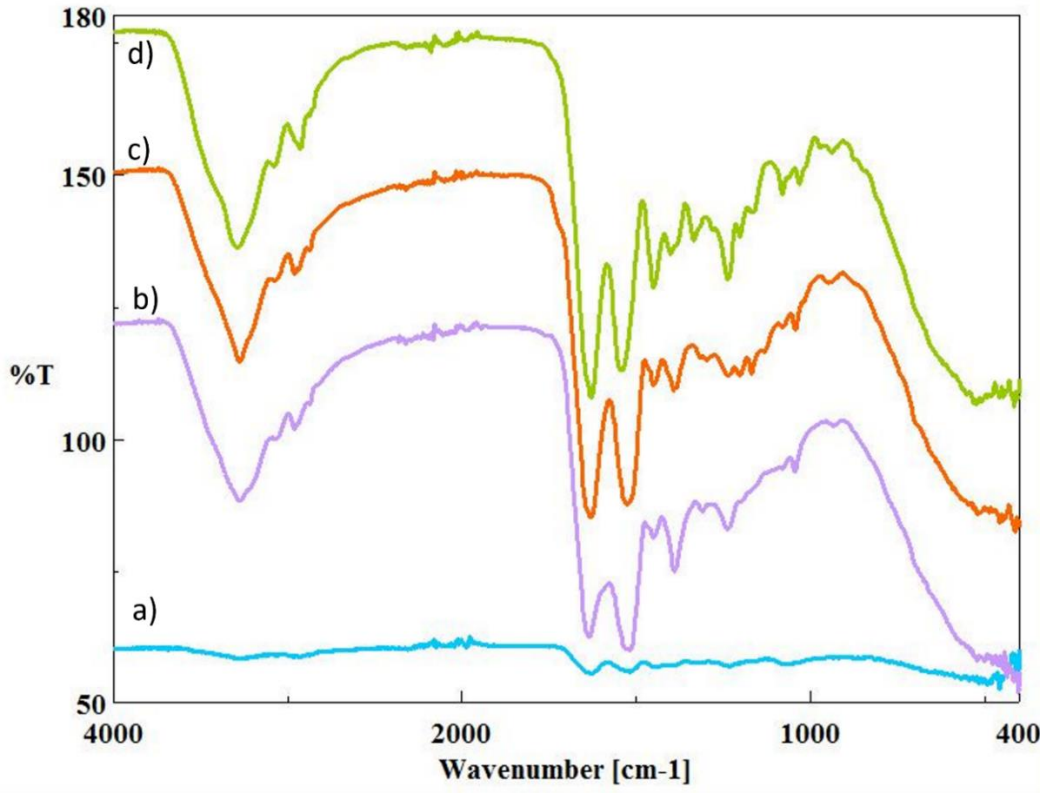
^{1}H-NMR analizlerini desteklemesi için özellikle yeni bir malzeme olan KerMA' ya diğer bir yöntem olan TNBS analizi de yapılmıştır. TNBS sonuçlarına göre, KerMA için metakrilasyon derecesi yaklaşık %75' tir. Yüksek ikame derecesi fotokürlenebilir prosesi mümkün kılmaktadır [145].

3.3. FT-IR Analizi

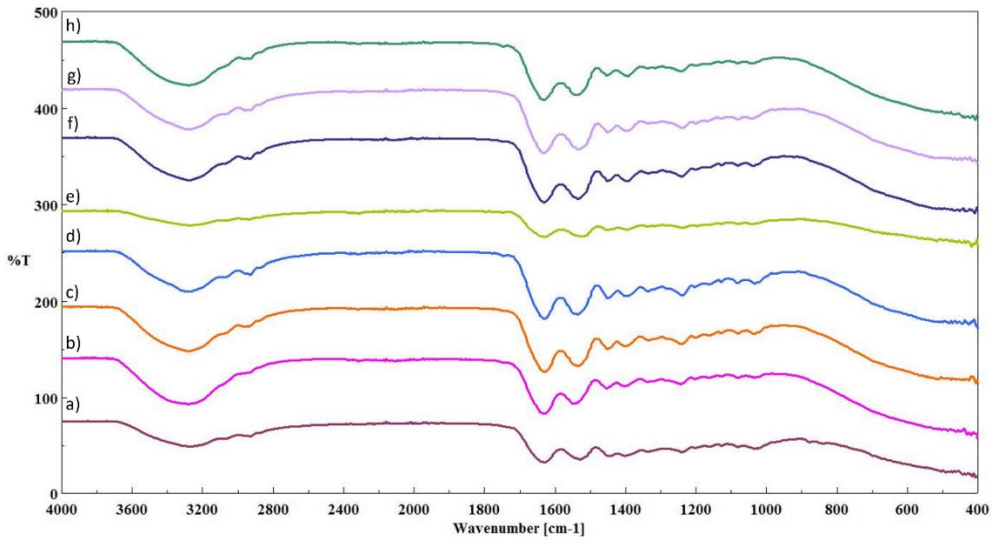
%10 GelMA, %10 GelMA/%1 keratin, %10 GelMA/%3 keratin, %10 GelMA/%5 keratin, %10 GelMA/%10 keratin, %10 GelMA/%1 KerMA, %10 GelMA/%3 KerMA, %10 GelMA/%5 KerMA ve %10 GelMA/%10 KerMA iskelelerinin FT-IR spektrumları aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 15 ve Şekil 16). GelMA'nın spektrumu şekil 15'te gösterilmiştir. Birincil absorpsiyon pikleri 1631 cm^{-1} (amid I bandının C=O germe grupları) [152], 1525 cm^{-1} (amid II bandının N-H bükülme grupları) [154], 1236 cm^{-1} (amid III bandının C-N germe ve N-H bükülmesi) civarında gözlenmiştir [154]. 2929 cm^{-1}'deki pikler C-H gruplarının gerilme titreşimlerini gösterir. 3200-3400 cm^{-1} aralığındaki absorpsiyon bandı O-H ve N-H gerilme

titreşimlerine atfedilir [155].

Keratinin yapısında yer alan bazı fonksiyonel grupları karakteristik bantlara sahiptir. Bu bantlar, aynı dalga boyunda konumlandırılan KerMA numuneleri için kaydedilen FT-IR spektrumlarında da görülmüştür. Keratin ve KerMA içeren tüm yapı iskeleler için kaydedilen spektrumlar, hidroksiprolin birimlerinden ve hidroksil grubu taşıyan diğer amino asitlerden gelen -OH gruplarının gerilme titreşimi ile bağlantılı olarak 3294 cm^{-1}'de bir tepe noktası sergilemektedir. KerMA ve keratin spektrumu 1643, 1529 ve 1240 cm^{-1}'de tepe noktaları gösterdi ve bunlara karşılık olarak sırayla; -C=O gerilmesi (amid I), -NH bükülmesi (amid II) ve -C-N gerilmesi veya -NH bükülmesi (amid III) olarak nitelendirilmektedir [156]. Ayrıca, alkil zincirlerinin $-CH_2$ gruplarındaki simetrik ve asimetrik gerilmeye karşılık gelen 3294 cm^{-1}'de bir -CH gerilmesi (A amidi) ve 2934 cm^{-1}'de -CH gerilme titreşimi gözlemlenebilmektedir [144]. Modifikasyon, belirgin amid bantlarının pozisyonlarını önemli ölçüde değiştirmedi ve sadece amid I bandının dalga boyunda kayması oldu. Metakrilatlanmanın varlığı, literatürde 1630-1680 cm^{-1} aralıklarında metakrilat vinil grubunun bulunduğunu söylüyor. Bununla birlikte, KerMA'larda güçlü bir amid I absorbansına denk geldiği için bu tepe noktası tek başına görülmez ve bu da amid I bandında kaymalara neden olabilir. Mesela amid I bandının pik değeri keratinde 1623 cm^{-1} iken KerMA'da 1643 cm^{-1} de tepe noktası oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca, KerMA numunesinde C=C (957cm^{-1}) bağlarının ve C–H (860 cm^{-1}) bağlarını işaret eden yoğunluğu düşük ama keratine göre daha belirgin iki IR bandı ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, KerMA'larda 957 cm^{-1} bandı 940-970 cm^{-1} civarında görülen C=C bükülme absorpsiyonunda zayıf bir tepe noktası olduğu için, literatürdeki araştırmalar geleneksel yöntemlerle metakrilatlama reaksiyonunu doğrulamaktadır. Saf jelatin ve keratinde bulunan hafif değişiklikler, mevcut grupların etkili bir şekilde metakrilat gruplarıyla değiştirildiğini veya ikame edildiğini göstermektedir. Spektrumlar incelendiğinde, GelMA ve KerMA'nın karakteristik piklerinin varlığı bu malzemelerin başarılı bir şekilde birleştirildiğini göstermektedir [157].



Şekil 15. FT-IR analizi a) jelatin, b) GelMA, c) keratin ve d) KerMA

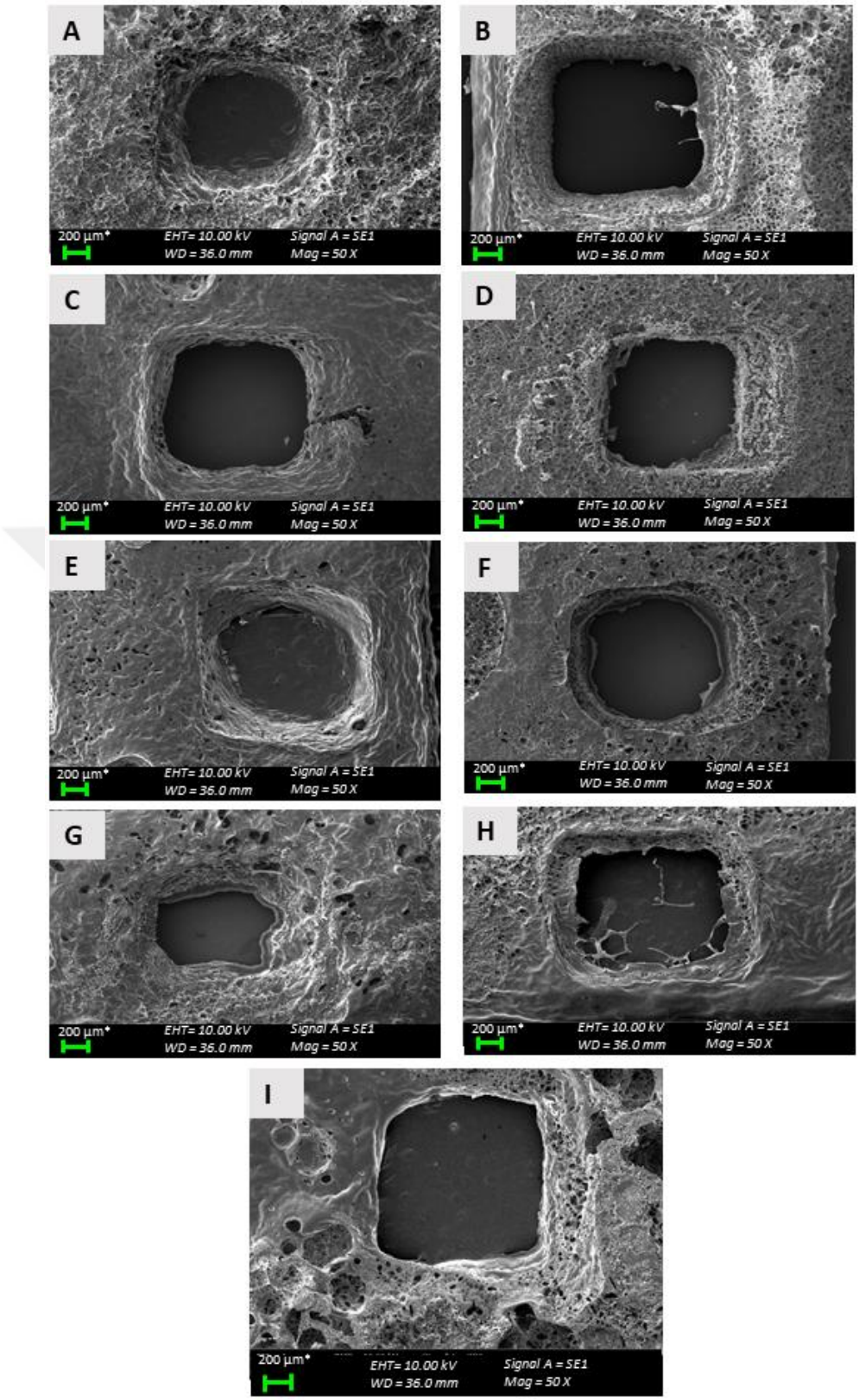


Şekil 16. FT-IR analizi, a) %10 GelMA/%1 keratin, b) %10 GelMA/%3 keratin c) %10 GelMA/%5 keratin d) %10 GelMA/%10 keratin e) %10 GelMA/%1 KerMA f) %10 GelMA/%3 KerMA g) %10 GelMA/%5 KerMA h) %10 GelMA/%10 KerMA

3.4. SEM Analizi

Gözenekli polimerlerdeki gözenek yapılarının doku mühendisliği açısından fonksiyonel önemi, hücre fonksiyonlarını kontrol etme ve yeni doku ve organların oluşumuna rehberlik etme

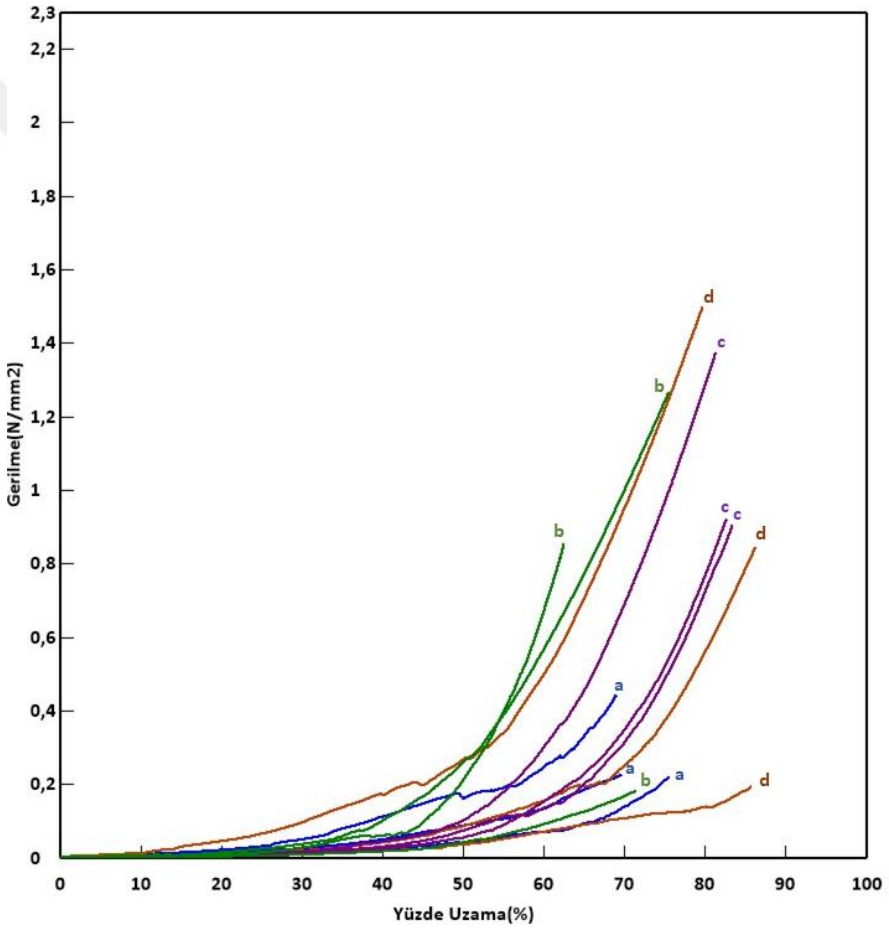
yeteneklerinde yatmaktadır. Bu gözenekler, hücre çoğalması için kanal görevi görür, yapıların yüzeyi boyunca nüfuz etmeyi ve dağılmayı mümkün kılar [158]. Şekil 17, üretilen GelMA bazlı doku iskelelerine ait SEM görüntülerini temsil etmektedir. Şekil 17A kontrol grubunu temsil eden %10 GelMA doku iskelesine ait SEM görüntüsünü göstermektedir. Görüntüler incelendiğinde, GelMA doku iskelesinin yüksek poroziteye sahip olduğu gözlenmiştir. %10 GelMA doku iskelesine %1, 3, 5 ve 10 keratin ilavesi yüksek poroziteyi korumuştur (Şekil 17 (B, C, D, E)). Şekil 17 (E, F, G, H) incelendiğinde, %10 GelMA doku iskelesine eklenen sırasıyla %1, 3, 5, 10 KerMA ilavesi por yapısını kısmen değiştirse de yüksek porozite korunmuştur.



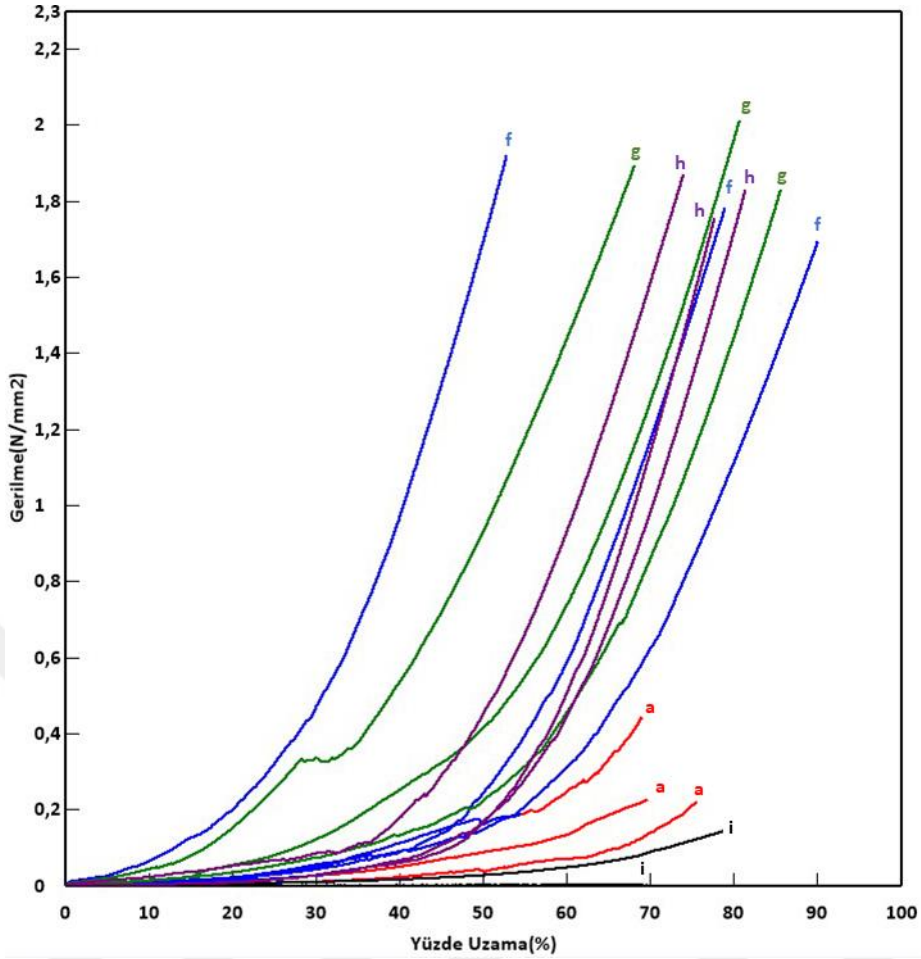
Şekil 17. SEM görüntüleri, (A) %10 GelMA, (B) %10 GelMA/%1 keratin, (C) %10 GelMA/%3 keratin (D) %10 GelMA/%5 keratin (E) %10 GelMA/%10 keratin (F) %10 GelMA/%1 KerMA (G) %10 GelMA/%3 KerMA (H) %10 GelMA/%5 KerMA (I) %10 GelMA/%10 KerMA

3.5. GelMA Tabanlı Doku İskelelerin Mekanik Testleri

GelMA bazlı keratin ve KerMA malzemelerinin mekanik performansı basma testiyle analiz edilmiştir. GelMA hidrojelinin mekanik özellikleri, GelMA konsantrasyonu ve UV' ye maruz kalma süresi değiştirilerek ayarlanabilir. Şekil 18 ve Şekil 19' daki gerilim-gerinim deformasyon eğrilerinde gösterildiği gibi herhangi bir süreksizlik, kopma veya çatlama gözlenmedi. Tüm iskeleler yaklaşık %90 oranında deforme olmuştur. Kaydedilen en yüksek gerilim değerleri sergilenmiştir. Keratin katkılı doku iskelelerinde gerilme değerlerinin ~%0.1 ile ~%1.5 MPa arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 18). KerMA katkılı doku iskelelerinde gerilme değerleri ise ~0.1 ve 2 MPa arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 18. GelMA tabanlı iskelelerin mekanik test sonuçları, a) %10 GelMA, b) %10 GelMA/%1 keratin, c) %10 GelMA/%3 keratin, d) %10 GelMA/%10 keratin

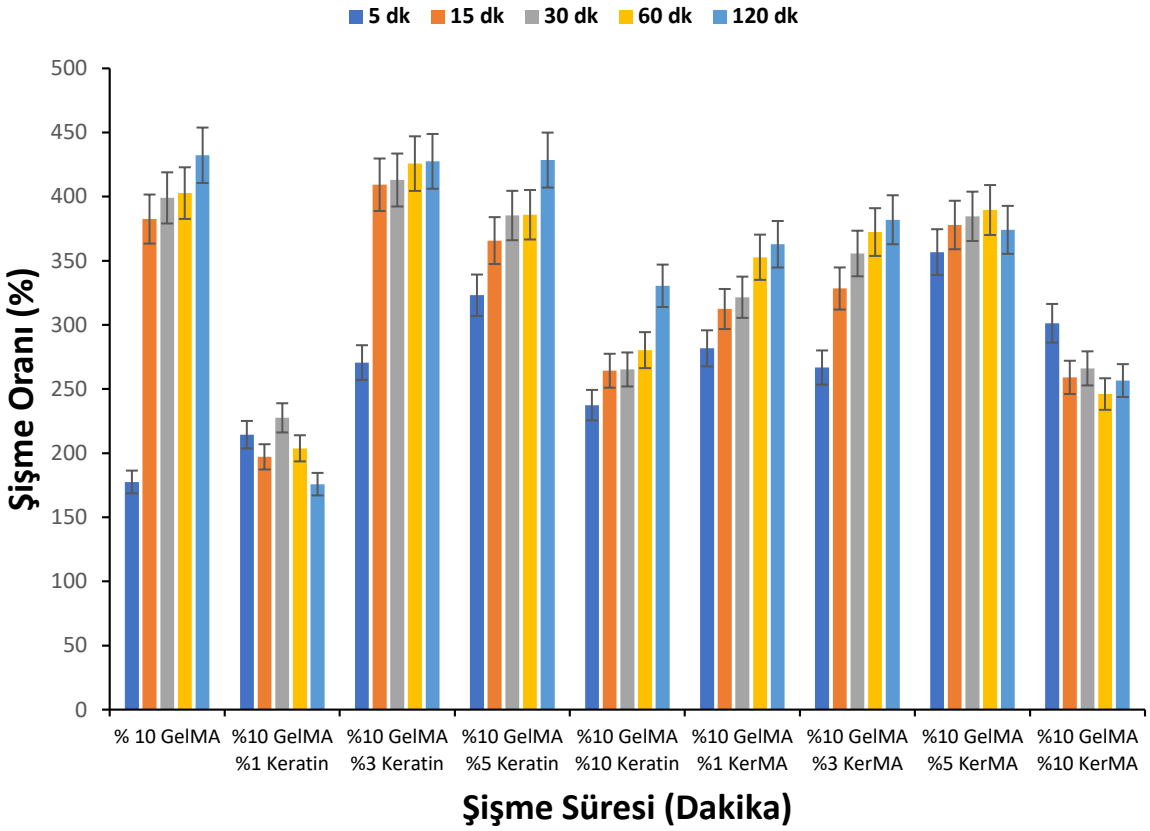


Şekil 19. GelMA tabanlı iskelelerin mekanik test sonuçları, a) %10 GelMA, f) %10 GelMA/%1 KerMA, g) %10 GelMA/%3 KerMA, h) %10 GelMA/%5 KerMA, i) %10 GelMA/%10 KerMA

3.6. İskelelerin Şişme ve Bozunma Testleri

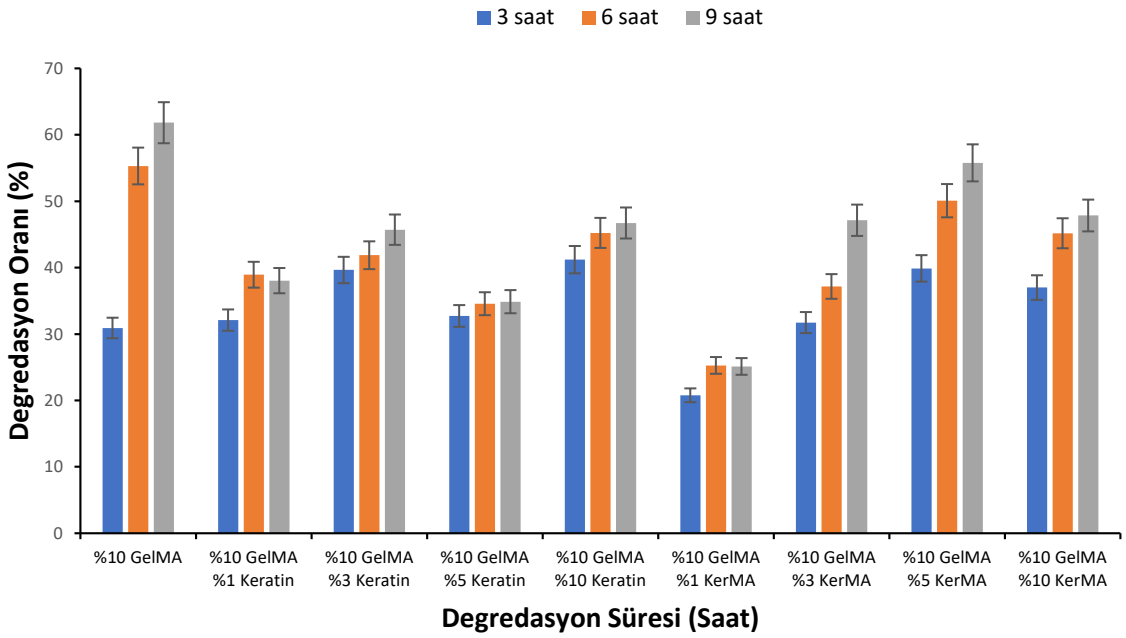
Hidrojellerin yüksek hidrofilik özellikleri, doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmelerini sağlar. Bu özellikler, hidrojellerin, besin ve oksijen difüzyonunu kontrol ederek kapsüllenmiş hücrelerin işlevselliğini etkileme yeteneği ile ilişkilidir. Hidrojellerin yüksek hidrofilik özellikleri, doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmelerini sağlar. Fizyolojik ortamı uyarmak için %10 GelMA/%1 keratin, %10 GelMA/%3 keratin, %10 GelMA/%5 keratin ve %10 GelMA/%10 keratin iskeleleri PBS içine yerleştirilmiş ve ardından 37 °C' ye ayarlı inkübatörde inkübe edilmiştir. GelMA tabanlı keratin ve KerMA katkılı doku iskelelerinin şişme oranları Şekil 20' de gösterilmiştir. Sonuçlara göre 15. dakikanın sonunda, tüm doku iskeleleri PBS' yi hızla emmiş ve bir denge fazına ulaşmıştır. Genel anlamda şişme oranlarında dengeli bir artış sergileyen GelMA tabanlı keratin katkılı iskele gruplarının kendi aralarında karşılaştırıldığında; %1 keratin ilavesinin %10 GelMA iskelesinin şişme davranışını

negatif yönde etkilediği görülürken, artan keratin oranının şişme davranışı pozitif yönde etkilediği tespit edilmiştir. %10 GelMA/%1 keratin, %10 GelMA/%3 keratin, %10 GelMA/%5 keratin ve %10 GelMA/%10 keratin iskele grupları içerisinde en dengeli şişme davranışının %10 GelMA/%5 keratin grubunda olduğu görülmüştür. Sonuç olarak GelMA/keratin iskelelerinde değişen keratin oranlarının GelMA'nın su tutma kapasitesi üzerinde hem negatif hem de pozitif bir etkiye yol açtığı kayıt altına alınmıştır. Aynı koşullar altında %10 GelMA/%1 KerMA, %10 GelMA/%3 KerMA, %10 GelMA/%5 KerMA ve %10 GelMA/%10 KerMA iskele gruplarının şişme davranışları da Şekil 20'de verilmiştir. GelMA/KerMA gruplarının şişme oranları ele alındığında, 10 GelMA/%1 KerMA iskele grubunun %10 GelMA/%10 keratin iskele grubu ile neredeyse aynı oranda bir şişme gösterdiği gözlenmiştir. Ele alınan ölçümler sırasıyla gözlemlendiğinde ölçümler arasında dengeli bir artış görülmüştür. Bunların yanı sıra %10 GelMA/%10 KerMA iskele grubunun artan KerMA oranlarıyla şişme davranışında negatif bir ivmede ilerlediği gözlemlenmiştir. Yapılan bu gözlemler sonucunda Şekil 20' de gösterildiği gibi GelMA/keratin iskelelerinin GelMA/KerMA iskelere kıyasla daha yüksek oranlarda şişme davranışına yol açtıkları tespit edilmiştir. Bu durumda keratinin hidrofilik yapısının önemi ortaya çıkmaktadır.



Şekil 20. GelMA, GelMA/keratin ve GelMA/KerMA iskelelerin şişme davranışları

In vitro koşullarda şişme davranışları analiz edilen doku iskelelerinin aynı koşullar altında bozunma analizleri yapılmıştır (Şekil 21). %10 GelMA, %10 GelMA/%1 keratin, %10 GelMA/%3 keratin, %10 GelMA/%5 keratin ve %10 GelMA/%10 keratin %10 GelMA/%1 KerMA, %10 GelMA/%3 KerMA, %10 GelMA/%5 KerMA ve %10 GelMA/%10 KerMA iskeleleri PBS içerisinde inkübe edilerek bozunma oranları kayıt altına alınmıştır. Şekil 20' de görüldüğü gibi %10 GelMA iskele grubunun 9. saatin sonunda %70 oranında bozunduğu görülmektedir. Keratin ve KerMA ile hazırlanan doku iskelelerinin ise bozunma oranını düşürdüğü görülmektedir. GelMA/keratin iskele grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında en iyi sonucun %10 GelMA/%5 keratin iskele grubunda olduğu görülmektedir. GelMA/KerMA iskele gruplarının analiz sonuçlarına bakıldığında artan KerMA oranının bozunma oranını arttırken tüm iskele grupları içerinde en iyi sonucun %10 GelMA/%1 KerMA' ya ait olduğu tespit edilmiştir. Tüm veriler ele alındığın keratin ve KerMA ile hazırlanan doku iskelelerinin %10 GelMA iskelesinin hidrofilik özelliklerini iyileştirdiği ve mekanik dayanımı arttırdığı kayıt altına alınmıştır.

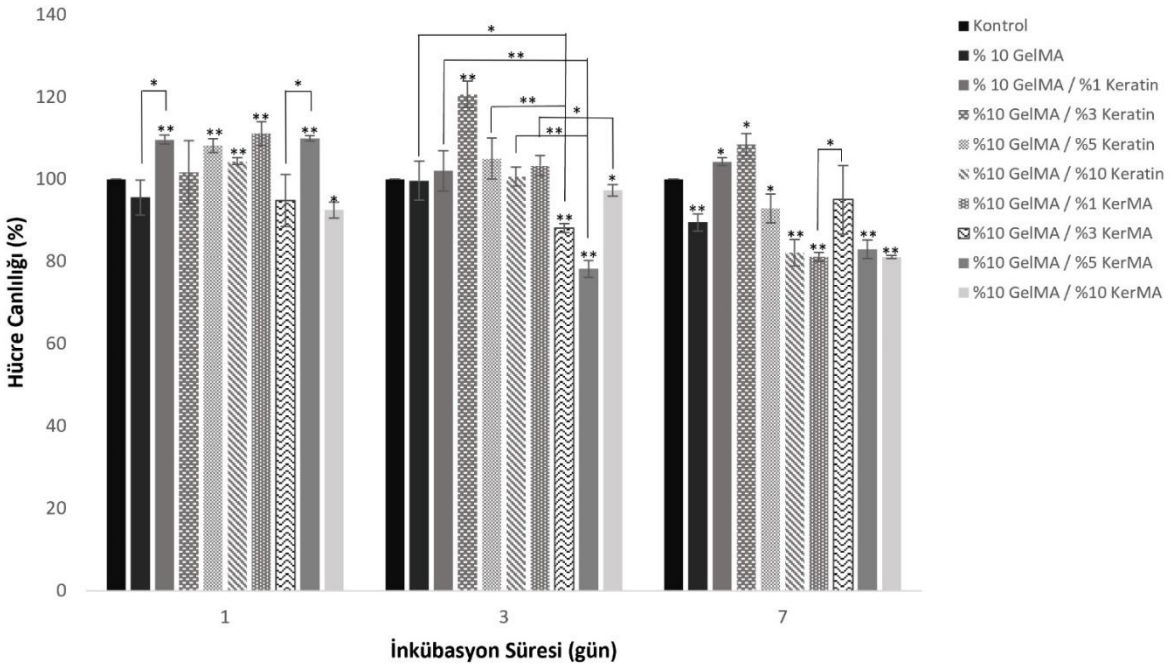


Şekil 21. GelMA, GelMA/keratin ve GelMA/KerMA iskelelerin degredasyon oranları

3.7. İskelelerin Biyouyumluluk Özellikleri

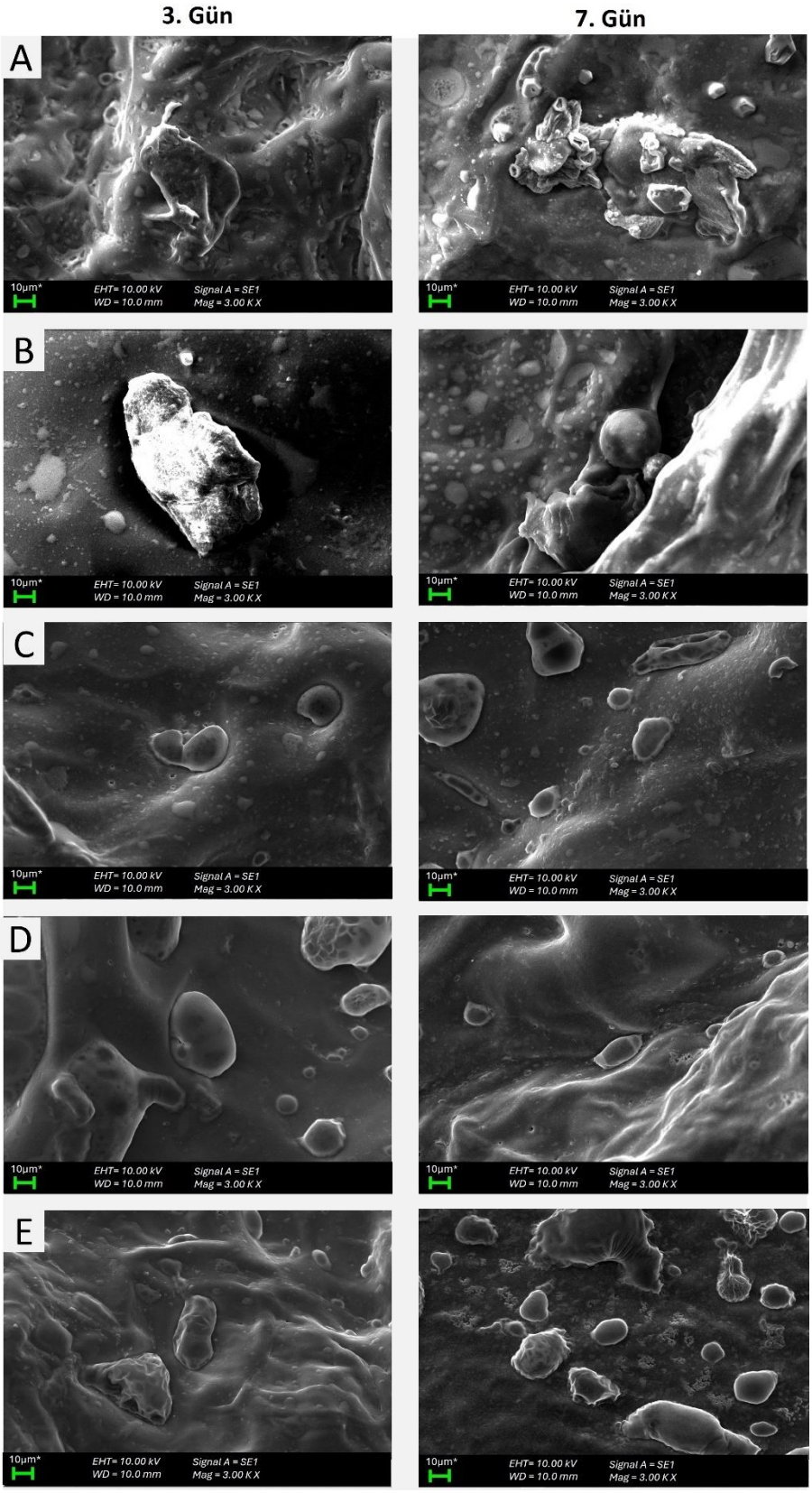
İskelelerin sitotoksisitesini belirlemek için L929 fibroblast hücreleri kullanılmıştır [159]. Hücre canlılığı sonuçları, Şekil 22 'de gösterildiği gibi, %100 değerinin elde edildiği, muamele edilmemiş kontrol grubuna göre, yüzde olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, örneklerin hiçbiri belirgin sitotoksik etki göstermemiştir. Özellikle keratin içeren örneklerin KerMA içeren örneklere kıyasla daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, %10 GelMA %1, %3 ve %5 keratin örnekleri yüksek hücre canlılığı ve çoğalması göstermiş ve canlılık yüzdelerini 7. günde de korumuştur. Öte yandan, KerMA içeren örneklerde belirgin sitotoksik etkiler gözlenmemekle birlikte, hücre çoğalmasında artış da olmamıştır. Tüm numuneler 7. günde %80'in üzerinde hücre canlılığı göstermiştir.

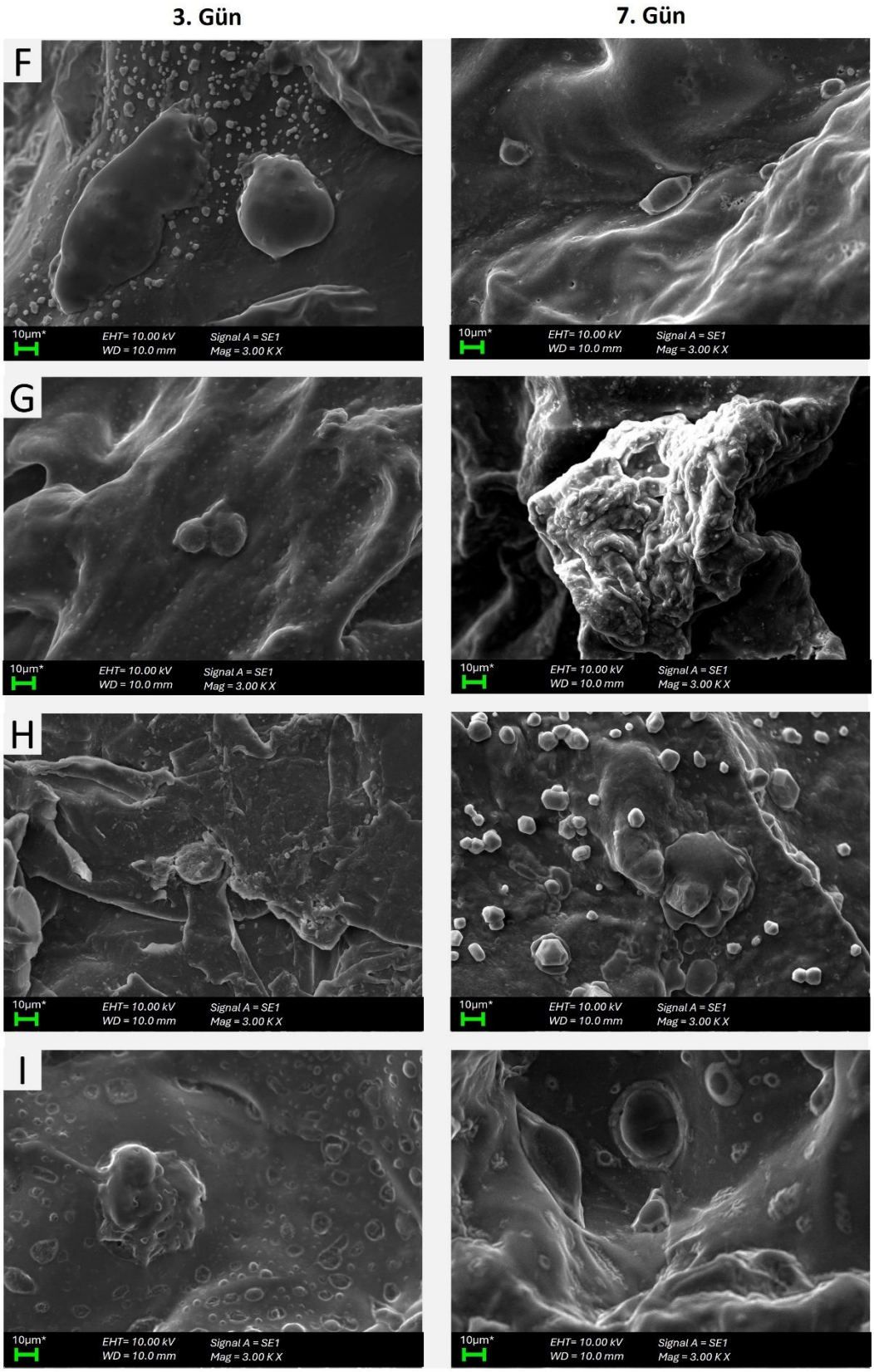


Şekil 22. Farklı zaman aralıklarında farklı örneklerle inkübe edilen L929 hücrelerinin hücre canlılığı değerleri. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. *p<0,05 ve **p<0,001

XTT testinden sonra, 3 ve 7 gün boyunca fibroblast hücreleriyle birlikte kültürlenmiş olan doku iskelelerin üzerindeki hücrelerin morfolojileri SEM ile incelenmiştir. Şekil 23 ve Şekil 24' te görüldüğü gibi, her bir doku iskelesi üzerinde L929 fibroblast hücrelerin başarılı bir şekilde tutunduğu ve çoğaldığı açıkça görülmektedir. Ayrıca, hücrelerin çoğalması ve tutunması için GelMA bazlı keratin ve KerMA katkılı iskelelerin uygun ortamı oluşturduğunu göstermiştir. GelMA bazlı doku iskelelerinin L929 fare fibroblast hücreleri ile biyouyumlu olduğu ve iskelelerin 7 günlük bir tedavi süresi boyunca herhangi bir sitotoksik etki olmadan hücresel proliferasyonu ve tutunmayı desteklediği sonucuna varılabilir.



Şekil 23. Fibroblast L929 hücrelerinin (A) %10 GelMA, (B) %10 GelMA/%1 keratin, (C) %10 GelMA/%3 keratin (D) %10 GelMA/%5 keratin (E) %10 GelMA/%10 keratin iskeleleri üzerindeki SEM görüntüleri



Şekil 24. Fibroblast L929 hücrelerinin (F) %10 GelMA/%1 KerMA (G) %10 GelMA/%3 KerMA (H) %10 GelMA/%5 KerMA (I) %10 GelMA/%10 KerMA iskeleleri üzerindeki SEM görüntüleri

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, yara iyileşmesi için kullanılmak üzere GelMA bazlı keratin ve KerMA katkılı doku iskeleleri geliştirilmiştir. Bu iskelelerin üretimi için ilk olarak koyun yününden keratin ekstraksiyonu %65 verimle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen keratin, metakrilasyona tabii tutularak KerMA sentezi %62 verimle sentezlenmiştir. Daha sonra, sentezlenen KerMA ve GelMA malzemelerine metakrilasyon derecesi tayini için ^{1}H-NMR ve TNBS testleri yapılmıştır. %10 GelMA, %10 GelMA/% (1, 3, 5, 10) keratin ve %10 GelMA/% (1, 3, 5, 10) KerMA doku iskele gruplarının kimyasal, morfolojik ve mekanik özellikleri incelenmiş ve, şişme ve bozunma davranışları *in vitro* koşullarda test edilmiştir. Ayrıca biyouyumluluk özellikleri XTT testi ile incelenmiştir.

^{1}H-NMR analizinin sonucuna göre jelatin metakrilik anhidrit ile başarılı bir şekilde reaksiyona girmiş ve metakrilat grubu jelatinde bulunan NH- gruplarına bağlanmıştır. Bu sentez sonucunda DS değeri %75.4 olarak hesaplanmıştır. KerMA' nın metakrilasyonunun ispatı için yine ^{1}H-NMR analizi yapılmış ve metakrilasyon pikleri görülmüştür. TNBS analizi sonucunda KerMA'nın DS değeri %75 olarak hesaplanmıştır. Bu testler ile, KerMA ve GelMA' nın başarılı bir şekilde sentezlendiği gözlenmiştir.

FT-IR analize göre jelatin, keratin, KerMA ve GelMA' nın karakteristik bantları spektrumda görülmüştür. Jelatin ve keratin piklerinde görülen kaymalar GelMA ve KerMA' nın başarılı bir şekilde sentezlendiğini kanıtlamaktadır.

Morfolojik analiz sonucunda, DLP tekniği ile üretilen doku iskeleleri istenen boyut ve geometrilerde üretilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, GelMA' ya keratin ve KerMA eklenmesinin morfolojiyi bozmadığı ve tasarımda planlanan kare formunda iskelelerin üretildiği gözlenmiştir.

Mekanik test sonucunda, GelMA bazlı doku iskelelerine keratin ve KerMA eklenmesi uzama miktarını %90' lara kadar çıkarmıştır. Özellikle KerMA içeren iskelelerin uzama miktarları ve gerilme değerleri keratinli gruplardan daha yüksek çıkmıştır.

In vitro hücre kültürü çalışmanın sonucuna göre, üretilen tüm GelMA bazlı doku iskelelerin L929 fare fibroblast hücreleri ile biyouyumlu olduğu ve herhangi bir sitotoksik sonuç elde edilmediği gözlenmiştir. Ayrıca üretilen tüm iskelelerin hücreler için uygun bir büyüme ortamı

oluşturduğu SEM ile gözlenmiştir. Sonuç olarak; sunulan tez çalışmasında elde edilen sentezlenmiş yeni malzemeler, sentezlenen malzemeler ile üretilen üç boyutlu doku iskeleleri ve üretilen üç boyutlu doku iskelelerinden karakterizasyon testleri sonucunda elde edilen bulgular, geliştirilen doku iskelelerinin yara iyileşmesi çalışmalarında literatüre büyük katkısının olabileceğini göstermiştir.

5. KAYNAKLAR

[1] J. E. Lai-Cheong and J. A. McGrath, "Structure and function of skin, hair and nails," *Medicine (Baltimore).*, vol. 45, no. 6, pp. 347–351, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.MPMED.2017.03.004.

[2] A. A. E. Ibrahim, N. Bagherani, B. R. Smoller, C. Reyes-Baron, and N. Bagherani, "Functions of the Skin," *Atlas Dermatology, Dermatopathol. Venereol.*, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1007/978-3-319-45134-3_4-1.

[3] G. Honari, R. M. Andersen, and H. I. Maibach, *Sensitive skin syndrome*. 2017.

[4] S. Maya *et al.*, "Histology, Histochemistry and Ultrastructure of Epidermis in Deer, Goat and Sheep," *Indian J. Vet. Anat.* , vol. 18, no. April, pp. 1–3, 2019.

[5] R. Hama, J. W. Reinhardt, A. Ulziibayar, T. Watanabe, J. Kelly, and T. Shinoka, "Recent Tissue Engineering Approaches to Mimicking the Extracellular Matrix Structure for Skin Regeneration," *Biomimetics 2023, Vol. 8, Page 130*, vol. 8, no. 1, p. 130, Mar. 2023, doi: 10.3390/BIOMIMETICS8010130.

[6] J. A. D. Berry *et al.*, "The neurosurgical wound and factors that can affect cosmetic, functional, and neurological outcomes," *Int. Wound J.*, vol. 16, no. 1, p. 71, Feb. 2019, doi: 10.1111/IWJ.12993.

[7] "Chapter 1 wounds," *Wounds A Compend. Clin. Res. Pract.*, pp. 3–7, [Online]. Available: Yara iyileşmesinin türü ne olursa olsun, aşamalar veya fazlar aynıdır, ancak her aşama için gereken süre iyileşmenin türüne bağlıdır. %0AA. Substrat fazı (inflamatuar, gecikmeli veya eksüdatif aşama veya faz — 1-4. günler) %0AB. Proliferatif faz (kollajen.

[8] O. Garraud, W. N. Hozzein, and G. Badr, "Wound healing: Time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches?," *BMC Immunol.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–8, Jun. 2017, doi: 10.1186/S12865-017-0207-Y/TABLES/1.

[9] M. Olsson *et al.*, "The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review," *Wound Repair Regen.*, vol. 27, no. 1, pp. 114–125, 2019, doi: 10.1111/wrr.12683.

[10] M. Rodrigues, N. Kosaric, C. A. Bonham, and G. C. Gurtner, “Wound healing: A cellular perspective,” *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 1, pp. 665–706, 2019, doi: 10.1152/physrev.00067.2017.

[11] C. E. Fife, K. A. Eckert, and M. J. Carter, “Publicly Reported Wound Healing Rates: The Fantasy and the Reality,” *Adv. Wound Care*, vol. 7, no. 3, pp. 77–94, 2018, doi: 10.1089/wound.2017.0743.

[12] K. Raziyeva, Y. Kim, Z. Zharkinbekov, K. Kassymbek, S. Jimi, and A. Saparov, “Immunology of acute and chronic wound healing,” *Biomolecules*, vol. 11, no. 5, pp. 1–25, 2021, doi: 10.3390/biom11050700.

[13] J. Larouche, S. Sheoran, K. Maruyama, and M. M. Martino, “Immune regulation of skin wound healing: Mechanisms and novel therapeutic targets,” *Adv. Wound Care*, vol. 7, no. 7, pp. 209–231, Jul. 2018, doi: 10.1089/WOUND.2017.0761.

[14] S. Ellis, E. J. Lin, and D. Tartar, “Immunology of Wound Healing,” *Curr. Dermatol. Rep.*, vol. 7, no. 4, pp. 350–358, 2018, doi: 10.1007/s13671-018-0234-9.

[15] E. M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta, E. Chiesa, S. Pisani, and B. Conti, “Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 8, pp. 1–30, 2020.

[16] S. Mantha *et al.*, “Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine,” *Materials (Basel).*, vol. 12, no. 20, Oct. 2019, doi: 10.3390/MA12203323.

[17] C. Yang, C. Yang, Y. Chen, J. Liu, Z. Liu, and H. J. Chen, “The trends in wound management: Sensing, therapeutic treatment, and ‘theranostics,’” *J. Sci. Adv. Mater. Devices*, vol. 8, no. 4, p. 100619, Dec. 2023, doi: 10.1016/J.JSAMD.2023.100619.

[18] E. M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta, E. Chiesa, S. Pisani, and B. Conti, “Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 8, pp. 1–30, Aug. 2020, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS12080735.

[19] S. A. Mohamed and R. Hargest, “Surgical anatomy of the skin,” *Surg.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.MPSUR.2021.11.021.

[20] K. Kwiecien *et al.*, “Architecture of antimicrobial skin defense,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 49, pp. 70–84, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.CYTOGFR.2019.08.001.

[21] M. Heidarzadeh *et al.*, “Regenerative Medicine: A Review of Solutions in the Treatment of Skin Defects,” *Open J. Regen. Med.*, vol. 12, no. 2, pp. 97–113, May 2023, doi: 10.4236/OJRM.2023.122007.

[22] M. J. Blair, J. D. Jones, A. E. Woessner, and K. P. Quinn, “Skin Structure–Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging,” *Adv. Wound Care*, vol. 9, no. 3, p. 127, Mar. 2020, doi: 10.1089/WOUND.2019.1021.

[23] M. Stojic *et al.*, “Skin tissue engineering,” *Biomater. Ski. Repair Regen.*, pp. 59–99, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-08-102546-8.00003-0.

[24] M. Albanna and J. H. Holmes, “Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine,” *Elsevier*, 2016. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=S7d0BgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=skin+tissue+engineering&ots=7jjisYoPgp&sig=bBmsYa_nvacyJrcurFng3V1ATiA&redir_esc=y#v=onepage&q=skin tissue engineering&f=false (accessed Jan. 09, 2024).

[25] A. Amirsadeghi, A. Jafari, L. J. Eggermont, S. S. Hashemi, S. A. Bencherif, and M. Khorram, “Vascularization strategies for skin tissue engineering,” *Biomater. Sci.*, vol. 8, no. 15, pp. 4073–4094, Jul. 2020, doi: 10.1039/D0BM00266F.

[26] M. Dawkins, C. C. Ude, and C. T. Laurencin, “Current Trends in the Treatment of Traumatic Nail Injuries and the Prospect of Solutions from Regenerative Engineering,” *Regen. Eng. Transl. Med.*, vol. 1, pp. 1–13, Nov. 2023, doi: 10.1007/S40883-023-00320-2/FIGURES/6.

[27] L. Suamte, A. Tirkey, J. Barman, and P. Jayasekhar Babu, “Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications,” *Smart Mater. Manuf.*, vol. 1, no. November 2022, p. 100011, 2023, doi: 10.1016/j.smmf.2022.100011.

[28] A. Eltom, G. Zhong, and A. Muhammad, “Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review,” *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2019,

2019, doi: 10.1155/2019/3429527.

[29] M. Spector, “Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems,” *Swiss Med. Wkly.*, vol. 136, no. 19–20, pp. 293–301, 2006, doi: 10.4414/smw.2006.11310.

[30] K. A. Barbosa, I. C. P. Rodrigues, L. Tamborlin, A. D. Luchessi, É. S. N. Lopes, and L. P. Gabriel, “Rotary jet-spun curcumin-loaded poly L-lactic acid membranes for wound-healing applications,” *J. Mater. Res. Technol.*, vol. 18, pp. 3273–3282, May 2022, doi: 10.1016/J.JMRT.2022.03.136.

[31] Z. Zhang, Y. Feng, L. Wang, D. Liu, C. Qin, and Y. Shi, “A review of preparation methods of porous skin tissue engineering scaffolds,” *Mater. Today Commun.*, vol. 32, p. 104109, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.MTCOMM.2022.104109.

[32] A. Sola *et al.*, “Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 96, pp. 153–165, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.MSEC.2018.10.086.

[33] M. Kumar, A. M. Sidpara, and V. Racherla, “Finishing performance of polyurethane-based flexible tools fabricated using solvent casting and particulate leaching method,” *J. Manuf. Process.*, vol. 90, pp. 166–179, Mar. 2023, doi: 10.1016/J.JMAPRO.2023.02.015.

[34] C. Ertekin, T. Aktas, I. Alibas, and H. Essalhi, “Drying of fruits and vegetables,” *Dry. Technol. Food Process. Unit Oper. Process. Equip. Food Ind.*, pp. 491–542, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-12-819895-7.00004-3.

[35] K. A. Gaidhani, M. Harwalkar, D. Bhambere, and P. S. Nirgude, “Lyophilization/Freeze-Drying - A Review,” vol. 2, no. 3, pp. 596–605, 2015.

[36] G. Assegehegn, E. Brito-de la Fuente, J. M. Franco, and C. Gallegos, “The Importance of Understanding the Freezing Step and Its Impact on Freeze-Drying Process Performance,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 108, no. 4, pp. 1378–1395, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.XPHS.2018.11.039.

[37] S. T. Hase and R. J. Oswal, “A Review on: Lyophilization,” vol. 10, pp. 2320–2882, 2022, Accessed: Dec. 24, 2023. [Online]. Available: www.ijcrt.org.

[38] E. Paredes, P. Heres, C. Anjos, and E. Cabrita, *Cryopreservation of marine invertebrates: From sperm to complex larval stages*, vol. 2180. 2021.

[39] A. Rezvankhah, Z. Emam-Djomeh, and G. Askari, “Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review,” *Dry. Technol.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 235–258, Jan. 2020, doi: 10.1080/07373937.2019.1653906.

[40] R. Sanz-Horta *et al.*, “Breath figures makes porous the ‘so-called’ skin layer obtained in polymer foams prepared by supercritical CO2 treatments,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 167, p. 105051, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2020.105051.

[41] Q. Ren *et al.*, “A green fabrication method of poly (lactic acid) perforated membrane via tuned crystallization and gas diffusion process,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 182, pp. 1037–1046, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.04.105.

[42] K. Zhang *et al.*, “Layered nanofiber sponge with an improved capacity for promoting blood coagulation and wound healing,” *Biomaterials*, vol. 204, pp. 70–79, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.03.008.

[43] I. Maimouni, C. M. Cejas, J. Cossy, P. Tabeling, and M. Russo, “Microfluidics Mediated Production of Foams for Biomedical Applications,” *Micromachines*, vol. 11, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/MI11010083.

[44] M. S. B. Reddy, D. Ponnamma, R. Choudhary, and K. K. Sadasivuni, “A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds,” *Polym. 2021, Vol. 13, Page 1105*, vol. 13, no. 7, p. 1105, Mar. 2021, doi: 10.3390/POLYM13071105.

[45] M. Atari, S. Labbaf, and S. Haghjooy Javanmard, “The Role of Poly-glycerol Sebacate/Gelatin Coating Layer on Biological Features and Calcification Rate of 3D Melt-Molded Antibacterial Scaffold for Heart Valve Tissue Engineering,” *J. Polym. Environ. 2023*, pp. 1–22, Jul. 2023, doi: 10.1007/S10924-023-02957-0.

[46] R. Hasanzadeh, T. Azdast, M. Mojaver, M. M. Darvishi, and C. B. Park, “Cost-

effective and reproducible technologies for fabrication of tissue engineered scaffolds: The state-of-the-art and future perspectives," *Polymer (Guildf).*, vol. 244, p. 124681, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.POLYMER.2022.124681.

[47] Z. Meng, J. He, J. Li, Y. Su, and D. Li, "Melt-based, solvent-free additive manufacturing of biodegradable polymeric scaffolds with designer microstructures for tailored mechanical/biological properties and clinical applications," *Virtual Phys. Prototyp.*, vol. 15, no. 4, pp. 417–444, Oct. 2020, doi: 10.1080/17452759.2020.1808937.

[48] M. Salehi *et al.*, "Sciatic nerve regeneration by transplantation of Schwann cells via erythropoietin controlled-releasing polylactic acid/multiwalled carbon nanotubes/gelatin nanofibrils," *Wiley Online Libr. Salehi, M Naseri-Nosar, S Ebrahimi-Barough, M Nourani, A Khojasteh, AA HamidiehJournal Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. 2018•Wiley Online Libr.*, vol. 106, no. 4, pp. 1463–1476, May 2017, doi: 10.1002/jbm.b.33952.

[49] I. M. Adel, M. F. Elmeligy, and N. A. Elkasabgy, "Conventional and Recent Trends of Scaffolds Fabrication: A Superior Mode for Tissue Engineering," *Pharm. 2022, Vol. 14, Page 306*, vol. 14, no. 2, p. 306, Jan. 2022, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14020306.

[50] W. Ma *et al.*, "Membrane formation by thermally induced phase separation: Materials, involved parameters, modeling, current efforts and future directions," *J. Memb. Sci.*, vol. 669, p. 121303, Mar. 2023, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2022.121303.

[51] R. Zeinali, L. Del Valle, J. Torras, J. P.-I. journal of, and undefined 2021, "Recent progress on biodegradable tissue engineering scaffolds prepared by thermally-induced phase separation (Tips)," *mdpi.comR Zeinali, LJ Del Valle, J Torras, J PuiggaliInternational J. Mol. Sci. 2021•mdpi.com*, vol. 22, no. 7, Apr. 2021, doi: 10.3390/ijms22073504.

[52] Y. Tang, Y. Lin, W. Ma, and X. Wang, "A review on microporous polyvinylidene fluoride membranes fabricated via thermally induced phase separation for MF/UF application," *J. Memb. Sci.*, vol. 639, p. 119759, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2021.119759.

[53] S. S. Karapehlivan *et al.*, “Fabrication and In Vitro Characterization of Polycaprolactone/Graphene Oxide/Collagen Nanofibers for Myocardial Repair,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 2300189, pp. 1–12, 2023, doi: 10.1002/mame.202300189.

[54] I. Shepa, E. Mudra, and J. Dusza, “Electrospinning through the prism of time,” *Mater. Today Chem.*, vol. 21, p. 100543, 2021, doi: 10.1016/j.mtchem.2021.100543.

[55] M. S. Islam, B. C. Ang, A. Andriyana, and A. M. Afifi, “A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications,” *SN Appl. Sci.*, vol. 1, no. 10, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1288-4.

[56] O. Gunduz and S. Ulag, “Gentamicin and fluconazole loaded electrospun polymethylmethacrylate (PMMA) fibers as a novel platform for the treatment of corneal keratitis,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 72, no. 12, pp. 995–1007, 2023, doi: 10.1080/00914037.2022.2071271.

[57] B. Ding, X. Wang, and J. Yu, “Electrospinning: Nanofabrication and Applications A volume in Micro and Nano Technologies,” *Elsevier*, 2019. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=eZt5DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=electrospinning&ots=OynyAyxhHW&sig=6JSkzVIgNYMgAYN44HkezJGgkJo&redir_esc=y#v=onepage&q=electrospinning&f=false (accessed Dec. 25, 2023).

[58] M. Rahmati *et al.*, “Electrospinning for tissue engineering applications,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 117, no. July 2020, p. 100721, 2021, doi: 10.1016/j.pmatsci.2020.100721.

[59] M. T. Mastura, M. R. Alkahari, and A. K. Syahibudil Ikhwan, “Life cycle analysis of fused filament fabrication: A review,” *Des. Sustain. Green Mater. Process.*, pp. 415–434, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-819482-9.00020-4.

[60] S. Kim, A. Bruyas, C. C. Pan, A. M. Stahl, and Y. Yang, “Vascularized tissue regenerative engineering using 3D bioprinting technology,” *Encycl. Biomed. Eng.*, vol. 1–3, pp. 696–706, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.99902-1.

[61] M. Raguraman and M. Rajan, “Nanoengineering/technology for tissue engineering and organ printing,” *Emerg. Nanotechnologies Med. Appl.*, pp. 35–54, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-323-91182-5.00010-3.

[62] A. Kantaros and D. Piromalis, “Employing a Low-Cost Desktop 3D Printer: Challenges, and How to Overcome Them by Tuning Key Process Parameters.” Apr. 02, 2021, Accessed: Jan. 04, 2024. [Online]. Available: https://papers.ssrn.com/abstract=4307803.

[63] T. Bedir, S. Ulag, C. B. Ustundag, and O. Gunduz, “3D bioprinting applications in neural tissue engineering for spinal cord injury repair,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, p. 110741, May 2020, doi: 10.1016/J.MSEC.2020.110741.

[64] W. Fang *et al.*, “Hydrogels for 3D bioprinting in tissue engineering and regenerative medicine: Current progress and challenges,” *Int. J. Bioprinting*, vol. 9, no. 5, pp. 207–238, 2023, doi: 10.18063/IJB.759.

[65] A. Kantaros and D. Piromalis, “Fabricating Lattice Structures via 3D Printing: The Case of Porous Bio-Engineered Scaffolds,” *Appl. Mech. 2021, Vol. 2, Pages 289-302*, vol. 2, no. 2, pp. 289–302, May 2021, doi: 10.3390/APPLMECH2020018.

[66] H. Bikas, P. Stavropoulos, and G. Chryssolouris, “Additive manufacturing methods and modeling approaches: A critical review,” *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 83, no. 1–4, pp. 389–405, Mar. 2016, doi: 10.1007/S00170-015-7576-2/METRICS.

[67] H. Y. Cakmak *et al.*, “3D printed Styrax Liquidus (Liquidambar orientalis Miller)-loaded poly (L-lactic acid)/chitosan based wound dressing material: Fabrication, characterization, and biocompatibility results,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 248, p. 125835, Sep. 2023, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2023.125835.

[68] H. Rastin, R. T. Ormsby, G. J. Atkins, and D. Losic, “3D Bioprinting of Methylcellulose/Gelatin-Methacryloyl (MC/GelMA) Bioink with High Shape Integrity,” *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 3, no. 3, pp. 1815–1826, Mar. 2020, doi: 10.1021/ACSABM.0C00169.

[69] D. Williams, P. Thayer, H. Martinez, E. G.- Bioprinting, and undefined 2018, “A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D bioprinting,” *Elsevier*, Accessed: Jan. 04, 2024. [Online]. Available: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405886617300246?casa_token=R83imTKQcwYAAAAA:F7jdRkDu6QtUdY4d_t_pPL_5T5W02dDCfey1f2gwIZc2mO

XU4NXQgShwaqEzesop8mgRg1OTJAM.

[70] A. Malekpour and X. Chen, “Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 13, no. 2, 2022, doi: 10.3390/jfb13020040.

[71] A. Mostafaei *et al.*, “Binder jet 3D printing—Process parameters, materials, properties, modeling, and challenges,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 119, p. 100707, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.PMATSCI.2020.100707.

[72] Ž. P. Kačarević *et al.*, “An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects,” *Materials (Basel).*, vol. 11, no. 11, Nov. 2018, doi: 10.3390/MA11112199.

[73] M. P. Mani *et al.*, “A review on 3D printing in tissue engineering applications,” *J. Polym. Eng.*, vol. 42, no. 3, pp. 243–265, Mar. 2022, doi: 10.1515/POLYENG-2021-0059/ASSET/GRAPHIC/J_POLYENG-2021-0059_FIG_004.JPG.

[74] J. Chang and X. Sun, “Laser-induced forward transfer based laser bioprinting in biomedical applications,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 11, 2023, doi: 10.3389/FBIOE.2023.1255782.

[75] S. Vanaei, M. S. Parizi, S. Vanaei, F. Salemizadehparizi, and H. R. Vanaei, “An Overview on Materials and Techniques in 3D Bioprinting Toward Biomedical Application,” *Eng. Regen.*, vol. 2, pp. 1–18, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.ENGREG.2020.12.001.

[76] E. S. Bishop *et al.*, “3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends,” *Genes Dis.*, vol. 4, no. 4, p. 185, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.GENDIS.2017.10.002.

[77] S. Tripathi, S. S. Mandal, S. Bauri, and P. Maiti, “3D bioprinting and its innovative approach for biomedical applications,” *MedComm*, vol. 4, no. 1, Feb. 2023, doi: 10.1002/MCO2.194.

[78] A. Rohani Shirvan, A. Nouri, and C. Wen, “Structural polymer biomaterials,” *Struct. Biomater. Prop. Charact. Sel.*, pp. 395–439, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-

818831-6.00010-0.

[79] S. Kholghi Eshkalak, E. Kowsari, and S. Ramakrishna, “3D printing of graphene-based composites and their applications in medicine and health care,” *Innov. Graphene-Based Polym. Compos.*, pp. 463–485, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-12-823789-2.00011-X.

[80] A. Davoudinejad, “Vat photopolymerization methods in additive manufacturing,” *Addit. Manuf.*, pp. 159–181, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-818411-0.00007-0.

[81] M. Molitch-Hou, “Overview of additive manufacturing process,” *Addit. Manuf. Mater. Process. Quantif. Appl.*, pp. 1–38, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-812155-9.00001-3.

[82] J. T. Huh, J. J. Yoo, A. Atala, and S. J. Lee, “Three-dimensional bioprinting for tissue engineering,” *Princ. Tissue Eng.*, pp. 1391–1415, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-818422-6.00076-9.

[83] A. P. Piedade and A. C. Pinho, “4D-printed stimuli-responsive hydrogels modeling and fabrication,” *Smart Mater. Addit. Manuf. Vol. 1 4D Print. Princ. Fabr.*, pp. 151–192, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-12-824082-3.00027-1.

[84] P. S. Gungor-Ozkerim, I. Inci, Y. S. Zhang, A. Khademhosseini, and M. R. Dokmeci, “Bioinks for 3D bioprinting: an overview,” *Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 5, pp. 915–946, May 2018, doi: 10.1039/C7BM00765E.

[85] M. Tang, D. Berry, K. Miller, X. Ma, and S. Chen, “Bioprinting of Biomimetic Tissue Models for Disease Modeling and Drug Screening,” *3D Bioprinting Nanotechnol. Tissue Eng. Regen. Med.*, pp. 33–70, Jan. 2022, doi: 10.1016/B978-0-12-824552-1.00002-5.

[86] A. Neagu, “3D Bioprinting techniques,” *Towar. 4D Bioprinting*, pp. 91–145, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-12-818653-4.00004-8.

[87] T. J. Hinton *et al.*, “Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels,” *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 9, Oct. 2015, doi: 10.1126/SCIADV.1500758.

[88] N. J. Mardis, “Emerging Technology and Applications of 3D Printing in the Medical

Field," *Mo. Med.*, vol. 115, no. 4, p. 368, Jul. 2018, Accessed: Jan. 08, 2024. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC6140256/.

[89] D. Ahn, L. M. Stevens, K. Zhou, and Z. A. Page, "Rapid High-Resolution Visible Light 3D Printing," *ACS Cent. Sci.*, vol. 6, no. 9, pp. 1555–1563, 2020, doi: 10.1021/acscentsci.0c00929.

[90] E. M. Maines, M. K. Porwal, C. J. Ellison, and T. M. Reineke, "Sustainable advances in SLA/DLP 3D printing materials and processes," *Green Chem.*, vol. 23, no. 18, pp. 6863–6897, Sep. 2021, doi: 10.1039/D1GC01489G.

[91] I. Lukin *et al.*, "Progress in Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 6, p. 1177, Jun. 2022, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14061177.

[92] A. B. Bello, D. Kim, D. Kim, H. Park, and S. H. Lee, "Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 26, no. 2, pp. 164–180, 2020, doi: 10.1089/ten.teb.2019.0256.

[93] M. C. Echave, P. Sánchez, J. L. Pedraz, and G. Orive, "Progress of gelatin-based 3D approaches for bone regeneration," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 42, pp. 63–74, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.JDDST.2017.04.012.

[94] M. C. Echave *et al.*, "Recent advances in gelatin-based therapeutics," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 19, no. 8, pp. 773–779, 2019, doi: 10.1080/14712598.2019.1610383.

[95] Y. Mizuno and T. Taguchi, "Self-assembled dodecyl group-modified gelatin microparticle-based hydrogels with angiogenic properties," *NPG Asia Mater.*, vol. 12, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41427-020-0229-4.

[96] E. Askari, S. M. Naghib, A. Zahedi, A. Seyfoori, Y. Zare, and K. Y. Rhee, "Local delivery of chemotherapeutic agent in tissue engineering based on gelatin/graphene hydrogel," *J. Mater. Res. Technol.*, vol. 12, pp. 412–422, 2021, doi: 10.1016/J.JMRT.2021.02.084.

[97] L. Y. Daikuara, Z. Yue, D. Skropeta, and G. G. Wallace, "In vitro characterisation of

3D printed platelet lysate-based bioink for potential application in skin tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 123, pp. 286–297, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2021.01.021.

[98] Z. Zhang *et al.*, "Gelatin-CaO2/SAP/PLGA composite scaffold enhances the reparation of critical-sized cranial defects by promoting seed cell survival," *Appl. Mater. Today*, vol. 22, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.APMT.2021.100960.

[99] D. Seliktar, "Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications," *Science (80-.).*, vol. 336, no. 6085, pp. 1124–1128, Jun. 2012, doi: 10.1126/SCIENCE.1214804.

[100] E. Ranjit, S. Hamlet, R. George, A. Sharma, and R. M. Love, "Biofunctional approaches of wool-based keratin for tissue engineering," *J. Sci. Adv. Mater. Devices*, vol. 7, no. 1, p. 100398, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.JSAMD.2021.10.001.

[101] A. Shavandi, A. E. D. A. Bekhit, A. Carne, and A. Bekhit, "Evaluation of keratin extraction from wool by chemical methods for bio-polymer application," *http://dx.doi.org/10.1177/0883911516662069*, vol. 32, no. 2, pp. 163–177, Sep. 2016, doi: 10.1177/0883911516662069.

[102] Y. L. Wu, C. W. Lin, N. C. Cheng, K. C. Yang, and J. Yu, "Modulation of keratin in adhesion, proliferation, adipogenic, and osteogenic differentiation of porcine adipose-derived stem cells," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 105, no. 1, pp. 180–192, 2017, doi: 10.1002/jbm.b.33551.

[103] T. R. Ham *et al.*, "Tunable keratin hydrogels for controlled erosion and growth factor delivery," *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 1, pp. 225–236, Jan. 2016, doi: 10.1021/ACS.BIOMAC.5B01328.

[104] J. R. Richter, R. C. de Guzman, and M. E. Van Dyke, "Mechanisms of hepatocyte attachment to keratin biomaterials," *Biomaterials*, vol. 32, no. 30, pp. 7555–7561, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.06.061.

[105] M. Rajabi, A. Ali, M. McConnell, J. C.-M. S. and, and undefined 2020, "Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications," *Elsevier*, Accessed: Jan. 14, 2024. [Online]. Available:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119326657?casa_token=0Ml2xL0b3nEAAAAA:7j6eErEI3hEix8cYV4ej7ObisIqAABwPZMi8NA3GUSnm7bY1lkTp07mZTH-UO7owNCBSiLwxEU0.

[106] M. Konop, M. Rybka, and A. Drapała, "Keratin Biomaterials in Skin Wound Healing, an Old Player in Modern Medicine: A Mini Review," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13122029.

[107] L. Tang, J. O. Sierra, R. Kelly, R. S. Kirsner, and J. Li, "Wool-derived keratin stimulates human keratinocyte migration and types IV and VII collagen expression," *Exp. Dermatol.*, vol. 21, no. 6, pp. 458–460, Jun. 2012, doi: 10.1111/J.1600-0625.2012.01505.X.

[108] B. S. Lazarus, C. Chadha, A. Velasco-Hogan, J. D. V. Barbosa, I. Jasiuk, and M. A. Meyers, "Engineering with keratin: A functional material and a source of bioinspiration," *iScience*, vol. 24, no. 8, p. 102798, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.ISCI.2021.102798.

[109] L. A. Sharma, M. A. Ali, R. M. Love, M. J. Wilson, and G. J. Dias, "Novel keratin preparation supports growth and differentiation of odontoblast-like cells," *Wiley Online Libr. Ajay Sharma, MA Ali, RM Love, MJ Wilson, GJ DiasInternational Endod. Journal, 2016•Wiley Online Libr.*, vol. 49, no. 5, pp. 471–482, May 2016, doi: 10.1111/iej.12476.

[110] C. Dong and Y. Lv, "Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives," *Polym. 2016, Vol. 8, Page 42*, vol. 8, no. 2, p. 42, Feb. 2016, doi: 10.3390/POLYM8020042.

[111] G. Sundar, J. Joseph, C. Prabhakumari, A. John, and A. Abraham, "Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: a critical review," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 70, no. 9, pp. 593–604, 2021, doi: 10.1080/00914037.2020.1740991.

[112] M. Movahedi, A. Asefnejad, M. Rafienia, and M. T. Khorasani, "Potential of novel electrospun core-shell structured polyurethane/starch (hyaluronic acid) nanofibers for skin tissue engineering: In vitro and in vivo evaluation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 146, pp. 627–637, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2019.11.233.

[113] B. S. Spearman, N. K. Agrawal, A. Rubiano, C. S. Simmons, S. Mobini, and C. E. Schmidt, “Tunable methacrylated hyaluronic acid-based hydrogels as scaffolds for soft tissue engineering applications,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 108, no. 2, pp. 279–291, Feb. 2020, doi: 10.1002/JBM.A.36814.

[114] M. Pieters and A. S. Wolberg, “Fibrinogen and fibrin: An illustrated review,” *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, vol. 3, no. 2, p. 161, Apr. 2019, doi: 10.1002/RTH2.12191.

[115] V. P. Santos, N. S. S. Marques, P. C. S. V. Maia, M. A. B. de Lima, L. de O. Franco, and G. M. de Campos-Takaki, “Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 12, pp. 1–17, Jun. 2020, doi: 10.3390/IJMS21124290.

[116] A. K. Trivedi, M. K. Gupta, and H. Singh, “PLA based biocomposites for sustainable products: A review,” *Adv. Ind. Eng. Polym. Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 382–395, Oct. 2023, doi: 10.1016/J.AIEPR.2023.02.002.

[117] Z. A. Parray, M. I. Hassan, F. Ahmad, and A. Islam, “Amphiphilic nature of polyethylene glycols and their role in medical research,” *Polym. Test.*, vol. 82, p. 106316, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.POLYMERTESTING.2019.106316.

[118] S. Sun *et al.*, “Drug delivery systems based on polyethylene glycol hydrogels for enhanced bone regeneration,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 11, p. 1117647, Jan. 2023, doi: 10.3389/FBIOE.2023.1117647/BIBTEX.

[119] A. Heimowska, M. Morawska, and A. Bocho-Janiszewska, “Biodegradation of poly(ϵ-caprolactone) in natural water environments,” *Polish J. Chem. Technol.*, vol. 19, no. 1, pp. 120–126, 2017, doi: 10.1515/pjct-2017-0017.

[120] A. Das and P. Mahanwar, “A brief discussion on advances in polyurethane applications,” *Adv. Ind. Eng. Polym. Res.*, vol. 3, no. 3, pp. 93–101, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.AIEPR.2020.07.002.

[121] P. Szczepańczyk, M. Szlachta, N. Złocista-Szewczyk, J. Chłopek, and K. Pielichowska, “Recent developments in polyurethane-based materials for bone tissue engineering,” *Polymers (Basel).*, vol. 13, no. 6, 2021, doi: 10.3390/polym13060946.

[122] M. Mimeault, R. Hauke, and S. K. Batra, “Stem cells: A revolution in therapeutics - Recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 82, no. 3, pp. 252–264, 2007, doi: 10.1038/sj.clpt.6100301.

[123] W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, and Z. Rybak, “Stem cells: past, present, and future,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 10, no. 1, Feb. 2019, doi: 10.1186/S13287-019-1165-5.

[124] “Stem Cells and Regenerative Medicine,” *Goodman’s Med. Cell Biol.*, pp. 361–380, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-817927-7.00013-2.

[125] K. Loya, “Stem Cells,” *Handb. Pharmacogenomics Stratif. Med.*, pp. 207–231, Jan. 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-386882-4.00011-6.

[126] A. Romito and G. Cobellis, “Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions,” *Stem Cells Int.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/9451492.

[127] P. V Singh, P. V Singh, and A. Anjankar, “Harnessing the Therapeutic Potential of Stem Cells in the Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Comprehensive Review,” *Cureus*, vol. 15, no. 8, 2023, doi: 10.7759/cureus.44498.

[128] M. L. Condic and M. Rao, “Alternative Sources of Pluripotent Stem Cells: Ethical and Scientific Issues Revisited,” *Stem Cells Dev.*, vol. 19, no. 8, p. 1121, Aug. 2010, doi: 10.1089/SCD.2009.0482.

[129] V. Volarevic *et al.*, “Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 15, no. 1, p. 36, Jan. 2018, doi: 10.7150/IJMS.21666.

[130] M. F. Pittenger, D. E. Discher, B. M. Péault, D. G. Phinney, J. M. Hare, and A. I. Caplan, “Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress,” *npj Regen. Med. 2019 41*, vol. 4, no. 1, pp. 1–15, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41536-019-0083-6.

[131] W. Jiang and J. Xu, “Immune modulation by mesenchymal stem cells,” *Cell Prolif.*, vol. 53, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1111/CPR.12712.

[132] S. Regmi, S. Pathak, J. O. Kim, C. S. Yong, and J. H. Jeong, “Mesenchymal stem cell

therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 98, no. 5–8, p. 151041, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.EJCB.2019.04.002.

[133] S. Raščanin, N. Rančić, S. Dragović, and M. Jovanović, "Embryonic stem cells: Where do we stand at the moment?," p. 138, doi: 10.5633/amm.2019.0320.

[134] J. L. Fowler, L. T. Ang, and K. M. Loh, "A critical look: Challenges in differentiating human pluripotent stem cells into desired cell types and organoids," *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, vol. 9, no. 3, p. e368, May 2020, doi: 10.1002/WDEV.368.

[135] R. S. Mahla, "Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics," *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/6940283.

[136] I. A. Charitos *et al.*, "Stem Cells: A Historical Review about Biological, Religious, and Ethical Issues," *Stem Cells Int.*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/9978837.

[137] D. Ghosh, N. Mehta, A. Patil, and J. Sengupta, "Ethical issues in biomedical use of human embryonic stem cells (hESCs)," *J. Reprod. Heal. Med.*, vol. 2, pp. S37–S47, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.JRHM.2016.09.002.

[138] M. V. Plikus *et al.*, "Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease," *Cell*, vol. 184, no. 15, pp. 3852–3872, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.CELL.2021.06.024.

[139] S. Mascharak *et al.*, "Preventing Engrailed-1 activation in fibroblasts yields wound regeneration without scarring," *Science*, vol. 372, no. 6540, Apr. 2021, doi: 10.1126/SCIENCE.ABA2374.

[140] J. C. Worrell and S. O'Reilly, "Bi-directional communication: Conversations between fibroblasts and immune cells in systemic sclerosis," *J. Autoimmun.*, vol. 113, p. 102526, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.JAUT.2020.102526.

[141] A. K. Ahuja, L. Pontiggia, U. Moehrlen, and T. Biedermann, "The Dynamic Nature of Human Dermal Fibroblasts Is Defined by Marked Variation in the Gene Expression of Specific Cytoskeletal Markers," *Life*, vol. 12, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.3390/LIFE12070935/S1.

[142] K. Wang, R. Li, J. H. Ma, Y. K. Jian, and J. N. Che, “Extracting keratin from wool by using L-cysteine,” *Green Chem.*, vol. 18, no. 2, pp. 476–481, Jan. 2016, doi: 10.1039/C5GC01254F.

[143] D. Baykara *et al.*, “Fabrication and optimization of 3D printed gelatin methacryloyl microneedle arrays based on vat photopolymerization,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 11, p. 1157541, Apr. 2023, doi: 10.3389/FBIOE.2023.1157541/BIBTEX.

[144] K. F. Yu *et al.*, “Design and Synthesis of Stem Cell-Laden Keratin/Glycol Chitosan Methacrylate Bioinks for 3D Bioprinting,” *Biomacromolecules*, vol. 23, no. 7, pp. 2814–2826, Jul. 2022, doi: 10.1021/ACS.BIOMAC.2C00191/SUPPL_FILE/BM2C00191_SI_001.PDF.

[145] S. Chen, Y. Wang, J. Lai, S. Tan, and M. Wang, “Structure and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesized in Different Reaction Systems,” *Biomacromolecules*, vol. 24, no. 6, pp. 2928–2941, 2023, doi: 10.1021/acs.biomac.3c00302.

[146] Z. Karavelioglu and R. Cakir-Koc, “Preparation of chitosan nanoparticles as Ginkgo Biloba extract carrier: In vitro neuroprotective effect on oxidative stress-induced human neuroblastoma cells (SH-SY5Y),” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 192, pp. 675–683, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.10.023.

[147] R. Guarnieri, R. Reda, D. Di Nardo, G. Miccoli, A. Zanza, and L. Testarelli, “In Vitro Direct and Indirect Cytotoxicity Comparative Analysis of One Pre-Hydrated versus One Dried Acellular Porcine Dermal Matrix,” *Mater. (Basel, Switzerland)*, vol. 15, no. 5, Mar. 2022, doi: 10.3390/MA15051937.

[148] P. Sharma, K. G. Jain, P. M. Pandey, and S. Mohanty, “In vitro degradation behaviour, cytocompatibility and hemocompatibility of topologically ordered porous iron scaffold prepared using 3D printing and pressureless microwave sintering,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 106, p. 110247, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.MSEC.2019.110247.

[149] Y. Zhuang, H. Shen, F. Yang, X. Wang, and D. Wu, “Synthesis and characterization of PLGA nanoparticle/4-arm-PEG hybrid hydrogels with controlled porous structures,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 59, pp. 53804–53812, Jun. 2016, doi: 10.1039/C6RA08404D.

[150] S. C. Wu, W. H. Chang, G. C. Dong, K. Y. Chen, Y. S. Chen, and C. H. Yao, “Cell adhesion and proliferation enhancement by gelatin nanofiber scaffolds,” *http://dx.doi.org/10.1177/0883911511423563*, vol. 26, no. 6, pp. 565–577, Oct. 2011, doi: 10.1177/0883911511423563.

[151] B. Süngü Mısırlıoğlu, Ö. Çakır, H. Calik, and R. Cakir-Koc, “Assessment of structural and cytotoxic properties of cobalt ferrite nanoparticles for biomedical applications,” *Inorg. Nano-Metal Chem.*, vol. 52, no. 1, pp. 57–62, 2022, doi: 10.1080/24701556.2020.1862216.

[152] A. Farasatkia, M. Kharaziha, F. Ashrafizadeh, and S. Salehi, “Transparent silk/gelatin methacrylate (GelMA) fibrillar film for corneal regeneration,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 120, no. October 2020, p. 111744, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111744.

[153] N. Thattaruparambil Raveendran, C. Vaquette, C. Meinert, D. Samuel Ipe, and S. Ivanovski, “Optimization of 3D bioprinting of periodontal ligament cells,” *Dent. Mater.*, vol. 35, no. 12, pp. 1683–1694, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.DENTAL.2019.08.114.

[154] Y. Xiang *et al.*, “Production and Characterization of an Integrated Multi-Layer 3D Printed PLGA/GelMA Scaffold Aimed for Bile Duct Restoration and Detection,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 543063, Aug. 2020, doi: 10.3389/FBIOE.2020.00971/BIBTEX.

[155] D. F. S. Fonseca *et al.*, “Swellable Gelatin Methacryloyl Microneedles for Extraction of Interstitial Skin Fluid toward Minimally Invasive Monitoring of Urea,” *Macromol. Biosci.*, vol. 20, no. 10, p. 2000195, Oct. 2020, doi: 10.1002/MABI.202000195.

[156] S. Sharma, A. Gupta, A. Kumar, C. G. Kee, H. Kamyab, and S. M. Saufi, “An efficient conversion of waste feather keratin into ecofriendly bioplastic film,” *Clean Technol. Environ. Policy*, vol. 20, no. 10, pp. 2157–2167, Dec. 2018, doi: 10.1007/S10098-018-1498-2/FIGURES/8.

[157] K. Rahali *et al.*, “Synthesis and characterization of nanofunctionalized gelatin methacrylate hydrogels,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 12, 2017, doi: 10.3390/ijms18122675.

[158] G. Chen and N. Kawazoe, “Preparation of Polymer Scaffolds by Ice Particulate Method for Tissue Engineering,” *Biomater. Nanoarchitectonics*, pp. 77–95, Jan. 2016, doi: 10.1016/B978-0-323-37127-8.00006-6.

[159] V. Cannella *et al.*, “Cytotoxicity Evaluation of Endodontic Pins on L929 Cell Line,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/3469525.

ÖZGEÇMİŞ

Zekiye AKDAĞ

Eğitim Bilgileri:

2022 Yüksek Lisans, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği

Fen Bilimleri Enstitüsü, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Songül ULAĞ

Eş-Danışman: Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

2015 Lisans, Biyomühendislik

Kimya-Metalurji Fakültesi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Projeler:

1. TÜSEB (Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı) A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı, Proje No: 35836, "Cilt Kanserine Yönelik Fucoidan Katkılı PLA/KerMA Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu", Çalışan Doktora Bursiyeri.
2. TÜSEB (Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı) Stratejik Sağlık Teknolojilerine Yönelik Ar-Ge Proje Çağrısı, Proje No: 31083, "Deri Hastalıklarına Yönelik Yerli Yara Örtüsü Üretimi", Yüksek Lisans Bursiyeri.
3. Marmara Üniversitesi Araştırma Üniversitesi Destek Programı, "Dirençli Epilepsi Tedavisinde Kontrollü İlaç Salımı Yapan İlaç Yüklü Gel-g-poliNIPAA Hidrojel Bazlı Mikroiğne Ve Ilaç Yüklü Ipek Fibroin (Silk-Ma) Bazlı Enjekte Edilebilir Hidrojellerin Kullanımı", Araştırmacı.
4. TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) 1004 - Mükemmeliyet Merkezi Destek Programı, Proje No: 23AG008, "Nöron Hasarına Yol Açan Hastalıkların Tanı, Tedavi ve İzlemine Yönelik Biyobelirteç ve İleri Teknolojik Uyarı Sistemlerinin Geliştirilmesi", Yüksek Lisans Bursiyeri.
5. TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) 1505 - Üniversite-Sanayi işbirliği Destek Programı, Proje No: 5210020, "3 Boyutlu Biyobaskı

Uygulamalarına Yönelik Keratin Bazlı Biyomürekkep Ürünlerinin Geliştirilmesi", Yüksek Lisans Bursiyeri.

Yayınlar:

1. **Akdag, Z.,** Ulag, S., Kalaskar, D. M., Duta, L., & Gunduz, O. (2023). Advanced Applications of Silk-Based Hydrogels for Tissue Engineering: A Short Review. *Biomimetics*, *8*(8), 612.
2. Karapehlivan, S. S., Danisik, M. N., **Akdag, Z.,** Yildiz, E. N., Okoro, O. V., Nie, L., ... & Gunduz, O. (2023). Fabrication and In Vitro Characterization of Polycaprolactone/Graphene Oxide/Collagen Nanofibers for Myocardial Repair. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2300189.
3. Ayran, M., **Akdag, Z.,** Ulag, S., & Gunduz, O. (2023). Alginate And Chitosan Composite Scaffold Coated With Curcumin Nanoparticles For Diabetic Wound Healing. *Revista Romana De Materiale/Romanian Journal Of Materials*, *53*(3).

Sözlü Sunumlar:

1. **Akdag, Z.,** Baykara, D., Durasi, E., Cakir, Koc, R., Gunduz, O., Ulag, S., (2023, Kasım). Fabrication and Characterization of GelMA/Keratin and GelMA/KerMA Hybrid Tissue Scaffolds by 3D Bioprinting. Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (Bucharest, Romania).
2. Yildiz, E., N., **Akdag, Z.,** Sahin, A., Ulag, S., Gunduz, O., (2023, Haziran). Fabrication and Characterization of Polylactic Acid/Hyaluronic Acid/Collagen Nanofibers for Tendon Tissue Engineering. Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (Bucharest, Romania).
3. Altan, E., **Akdag, Z.,** Pilavci, E., Sahin, A., Cesur, S., Gunduz, O., ((2023, Haziran). Production and Characterization of Drug-Loaded Wound Dressings by Electrospinning Method. Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (Bucharest, Romania).
4. **Akdag, Z.,** Yildiz, E., N., Calik, H., Ayran, M., Yildirim, R., Cakir, Koc, R., Ulag, S., Gunduz, O., (2022, Kasım). Fabrication and Characterization of Electrospun Polylactic-acid/β-KerMA Nanofibers for Wound Dressing Applications. Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (Bucharest, Romania).