

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

4-BOYUTLU BASKILAMA İLE FONKSİYONEL İSKELET KASI DOKU
MÜHENDİSLİĞİ

Emre Ergene

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Pınar Yılgör Huri

Eş Danışman

Prof. Dr. Gökhan Demirel

Aralık

2022

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Emre Ergene

ONAY

Prof. Dr. Pınar Yılgör Huri danışmanlığında ve Prof. Dr. Gökhan Demirel eş-danışmanlığında Emre Ergene tarafından hazırlanan bu çalışma 20/12/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Urartu Özgür Şafak Şeker

İmza:

Üye: Prof. Dr. Pınar Yılgör Huri

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk Engin

İmza:

Üye: Doç. Dr. Batur Ercan

İmza:

Üye: Doç. Dr. Sedat Odabaş

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

4-Boyutlu Baskılama ile Fonksiyonel İskelet Kası Doku Mühendisliği

Emre Ergene

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Pınar Yılğör Huri ve Eş Danışman Prof. Dr. Gökhan Demirel

İskelet kasları güçlü bir yenilenme kapasitesine sahip olsa da yüksek enerjili travmalar sonrasında büyük hacimli kas kayıpları meydana gelebilir ve bu durum kas işlevselliğinin kaybına yol açabilir. Günümüz literatüründe otolog kas transferi iskelet kası onarımı için altın standart olarak kabul edilse nakledilebilecek kas miktarı sınırlı olduğu için çeşitli alternatifler araştırılmaktadır. Bunların başında hücre transplantasyonları gelmektedir. Uydu hücreleri, kas öncül hücreleri, mezenkimal kök hücreler gibi hücrelerin doğrudan yara bölgesine nakilleri çoğunlukla başarılı olmamaktadır. Literatürde hücre tedavilerin fiziksel bir destek sistemi olan taşıyıcı iskeleler vasıtasıyla uygulanmasının etkin sonuçlar almak için bir gereklilik olduğu görüşü hakimdir. Diğer yandan taşıyıcı iskelelerin hedeflenen dokunun geometrik şekline benzer olduğu durumlarda daha başarılı sonuçlar alınmaktadır. Doğal dokuların kendilerine has geometrileri oldukça karmaşıktır. Bu karmaşık geometrilerin üretimi için aralarında 3 boyutlu (3B) ve 4 boyutlu (4B) basım stratejilerinin de olduğu pek çok yenilikçi üretim metodu geliştirilmektedir. Bir uyaran altında “şekil hafızası” veya “kendiliğinden harekete geçme” gibi bir davranış sergileyebilen akıllı malzeme ve sistemler 4B basım stratejilerinin ana odağını oluşturmaktadır.

Bu tez çalışması iskelet kasının kendine has iç içe geçmiş hücre tabakalarına benzer bir modeli 3B ve 4B basım stratejileri vasıtasıyla üretmeye odaklanmıştır. Çalışmanın birinci kısmında sıcaklık duyarlı bir polimer olan N-izopropilakrilamid (PNIPAm)’in uygun koşullar altında şekil değişim potansiyeli incelenmiştir. Bu amaçla aktif (sıcaklık duyarlı) ve pasif katmanlardan oluşan bir akıllı hidrojel platformu üretilmiştir. Literatürdeki geleneksel direkt ısıtma yönteminden farklı olarak ışık enerjisi yardımıyla sıcaklığın seçili bölgelerde artırılması sağlanmış ve böylelikle platformun şekil değişimi kontrol edilmiştir. Sıcaklığın 470 nm mavi ışık yardımıyla seçili bölgelerde artırılması için PNIPAm desenler ışığın daha fazla soğurulmasını sağlayacak şekilde sarı, kırmızı ve yeşil boylarla renklendirilmiştir. Hareketin yönü, bu renklendirilmiş desenlerin platform üzerindeki konumlanışı ile doğrudan ilişkilidir. Bulgularımıza göre sarı renkli desenler üzerindeki sıcaklık diğer renkli desenlere göre daha erken ve daha fazla gerçekleşmiştir. Bu durum hem tepki süresini daha aşağıya çekmiş hem de uygun desenle bir araya getirildiğinde istenilen son şeklin verilebilmesini sağlamıştır. Düz bir platforma bu sayede tübüler bir şekil verilmesinin ardından sarı renkli desenleme kullanılarak dört kollu yeni bir model üretilmiştir. Bir kavram kanıtı uygulaması gerçekleştirmek için bu platformun kollarıyla bir hedefin yakalanması sağlanmıştır. Daha sonra platformlar üzerinde 7 günlük bir hücre kültürü deneyi yürütülmüş ancak hücre tutunmasının zayıf olduğu gözlenmiştir.

Birinci kısım çalışmamız bir kavram-kanıtı çalışmasıdır. Çalışma sayesinde akıllı malzemelerin üretimi, kullanımı ve püf noktaları analiz edilmiş ve ikinci kısım çalışmada 4B basım konsepti ile bir biyolojik uygulama amaçlanmıştır.

Çalışmamızın ikinci kısmında, hücrelerle olan yüksek uyumluluğu ile bilinen jelatin polimeri metakrilat reaksiyonu (GELMA) ile foto-çapraz bağlanabilir hale getirilmiş ve aljinat malzemesi ile vizkozitesi artırılarak 3B yazıcıda kullanılabilecek bir biyomürekkep elde edilmiştir. Bu biyomürekkep C2C12 fare miyoblast hücreleriyle yüklü bir şekilde, sonradan 4B şekil değişimi için kullanılacak bir substrat üzerine basılmıştır. Substrat, silikon rubber (EcoFlex) ve karbonil demir tozları kullanılarak manyetik özellikli olacak şekilde üretilmiştir. 3B basımın ardından biyomürekkep substrat üzerinde önce CaCl_2 , sonra 470 nm mavi ışık kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Ardından bir permanent mıknatıs yardımıyla manyetik substratlar rulo edilmiştir. Kontrol grubu olarak, bu örneklerin rulo edilmeden açık şekildeki halleri kullanılmıştır. Örnekler Açık ve Rulo grupları olmak üzere 7 günlük hücre kültürü yapılmıştır. Yapılan gözlemde hücrelerin polimer matris içerisinde yayılamadıkları anlaşılmış ve matris yoğunluğunun azaltılması için aljinat, kültürün 24. saatinde aljinat liyaz enzimi yardımıyla sistemden çıkartılmıştır. Bu uygulamanın ardından hem hidrojel yapısında gözeneklilik sağlanmış hem de hidrojinin elastisite modülü literatürde C2C12 hücrelerinin tutunması için uygun sertlik değeri olarak belirtilen 13-45kPa seviyesine indirilmiştir. Yapılan hücre canlılığı analizlerinde hücrelerin hayatta kaldığı ve 7 günlük deney sonuna kadar çoğalmayı başardıkları gözlenmiştir. İmmünfloresan uygulaması sonucunda ise C2C12 hücrelerinin 7.gün itibarıyla farklılaşarak miyotüpler oluşturmaya başladığı gözlenmiştir. Rulo edilmiş örneklerde Açık gruba göre MyoD1 ifadesi ile çakışmayan daha az hücre çekirdeği gözlenmesi bu örneklerde bulunan hücrelerin daha dar bir alanda daha fazla hücre-hücre etkileşiminde bulunduğu ve bu nedenle daha fazla miyotüp oluşturma eğiliminde olduğu göstermektedir.

2022 126 sayfa

Anahtar kelimeler: 3 boyutlu basım, 4 boyutlu basım, duyarlı hidrojeller, akıllı malzemeler, doku mühendisliği, iskelet kası, biyomalzemeler, kendiliğinden katlanma, jelatin metakrilat, N-izopropilakrilamid

ABSTRACT

PhD Thesis

Functional Skeletal Muscle Tissue Engineering with 4-Dimensional Printing

Emre Ergene

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Pınar Yılmaz Huri and Co-Supervisor Prof. Dr. Gökhan Demirel

Although skeletal muscles have a strong regenerative capacity, large volumes of muscle wasting may occur after high-energy trauma, leading to loss of muscle function. Although autologous muscle transfer is accepted as the gold standard for skeletal muscle repair in today's literature, various alternatives are being investigated since the amount of muscle that can be transplanted is limited. Cell transplantation is one of them. Transplantation of satellite cells, muscle progenitor cells, and mesenchymal stem cells directly to the wound site are often unsuccessful. In the literature, the view is that application of cellular therapies through a physical support system is necessary for obtaining effective results.

This thesis focuses on producing a similar model of skeletal muscle's unique nested cell layers through 3D and 4D printing strategies. In the first part of the study, the shape change potential of N-isopropyl acrylamide (PNIPAm), a thermo-sensitive polymer, was investigated under suitable conditions. For this purpose, a smart hydrogel platform consisting of active (thermo-sensitive) and passive layers has been produced. Unlike the traditional direct heating method in the literature, the temperature was increased in selected regions with the help of light energy. Thus light illumination controlled the shape change of the platform. To increase the temperature in selected regions with the use of 470 nm blue light, PNIPAm patterns were colored with yellow, red, and green dyes to provide more light absorption. The direction of the movement is directly related to the positioning of these colored patterns on the platform. According to our findings, the temperature on the yellow-colored patterns raised earlier and more than the other colored patterns. This situation reduced the response time and provided the desired final shape when combined with the appropriate pattern. After giving a flat platform a tubular form in this way, a new four-armed model was produced using yellow patterning. A target has been captured with the arms of this platform to perform a proof-of-concept application. Afterward, a 7-day cell culture experiment was carried out on the platforms, but poor cell adhesion was observed.

Our first part study is a proof-of-concept study. Thanks to the study, smart materials' production, use, and tricks were analyzed, and a biological application was aimed at the concept of 4D printing in the second part of the study.

In the second part of the study, gelatin polymer, known for its high compatibility with cells, was made photo-cross-linkable by the methacrylate reaction (GELMA), and a bio-ink that can be used in 3D printers was obtained by increasing its viscosity with the alginate material. This bio-ink was printed with C2C12 mouse myoblast cells loaded onto a substrate that will subsequently be used for 4D shape-shifting. The substrate is produced to be magnetic using silicon rubber (EcoFlex) and carbonyl iron powders. After 3D printing, the bio-ink was crosslinked on the substrate using CaCl₂ and 470 nm blue light. Then, the magnetic substrates were rolled with the help of a permanent

magnet. These samples were used as unrolled (open) as the control group. Seven days of cell culture was performed on the samples as Open and Rolled groups. However, it was understood that the cells could not spread in the polymer matrix. To reduce the matrix density, alginate was removed from the system with the help of the alginate lyase enzyme at the 24th hour of culture. Alginate lyase ensured the porosity of the hydrogel structure. Moreover, it reduced the stiffness to 13-45 kPa, specified as the appropriate stiffness value for the adhesion of C2C12 cells in the literature. In the cell viability analyses, it was observed that the cells survived and could proliferate until the end of the 7-day experiment. As a result of immunofluorescence application, it was observed that C2C12 cells started to differentiate and form myotubes as of the 7th day. Fewer cell nuclei were observed in the rolled samples that did not overlap with MyoD1 expression compared to the Open group, indicating that the cells in these samples had more cell-cell interaction in a narrower area and therefore tended to form more myotubes.

2022 126 pages

Keywords: 3D printing, 4D printing, responsive hydrogels, smart materials, tissue engineering, skeletal muscle, biomaterials, self-folding, gelatin methacrylate, N-isopropylacrylamide



TEŞEKKÜR

Kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, tez çalışmalarım için her türlü imkandan faydalanmamı sağlayan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Pınar Yılğör Huri'ye ve sağladığı laboratuvar imkanlarının yanı sıra tez çalışmamı farklı bir boyuta taşıyan danışmanlığı için eş-danışman hocam sayın Prof. Dr. Gökhan Demirel'e sonsuz şükran ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarım sürecinde tavsiye ve tecrübelerinden yararlandığım hocalarım Doç. Dr. Sedat Odabaş ve Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk Engin'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca verdikleri finansal destek için TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Doktora Burs programı ile YÖK 100/2000 Doktora Burs programına teşekkür ederim.

Eğitim sürecinde verdikleri ders ve imkanlar için Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne, cihaz ve laboratuvar imkanları için Gazi Üniversitesi Kimya Bölümü'ne ve tezimin baştan sona her türlü çalışmasında gerek danışmanlık gerekse laboratuvar imkanları seviyesinde destek veren Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın büyük bir bölümü laboratuvar emeğidir. Kuşkusuz ki bu çalışmalar öğrenci olmalarının yanı sıra birer laboratuvar emekçisi olan dostlarım Şeyda Gökyer, Görkem Liman ve Emrecan Yıldız olmadan başarılamazdı. Onlara verdikleri destek ve fikirler için çok teşekkür ederim. Tüm çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Meriç Göker, Utku Serhat Derici, Barış Altunay, Işıl Yazgan ve Osama Ali Alhindy'e teşekkür ederim.

Benim için tüm bu yolculuğu kolaylaştıran, koşulsuz desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tüm iyi ve kötü günlerimde yanımda olan, kıymetli eşim Dr. Arzu Ergene'ye şükranlarımı sunarım.

Son olarak çalışmalarım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan anneme, babama ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Aralık 2022

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. İSKELET KASININ YAPISI	3
2.1.1. ANATOMİK YAPI.....	3
2.1.2. EKSTRASELÜLER MATRİSİN KOMPOZİSYONU	4
2.1.3. MATRİS SERTLİĞİ.....	4
2.1.4. KAS DOKUSUNDA YARALANMA.....	5
2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİ	6
2.2.1. İSKELET KASI DOKU MÜHENDİSLİĞİ	7
2.2.1.1. Hücre Temelli Yöntemler	7
2.2.1.2. Taşıyıcı İskele Bazlı Yöntemler.....	9
2.2.1.2.1. Malzemeler	10
2.2.1.2.2. 3B Basım ile Üretim	11

2.3. AKILLI MALZEMELER VE 4B BASIM	12
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	14
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	16
4.1. MATERYAL	16
4.2. YÖNTEM.....	17
4.2.1. SICAKLIK DUYARLI HİDROJEL PLATFROMU ÜRETİMİ.....	17
4.2.1.1. 3B Yazıcı ile Rehber Kalıpların Üretilmesi.....	18
4.2.1.2. P(NIPAM) ve P(AAM)’nin Hazırlanması	18
4.2.1.3. Hücre Kültürü	21
4.2.2. 4B BASIM İLE ÜRETİLEN TAŞIYICI İSKELE SİSTEMİ	23
4.2.2.1. Jelatin Metakrilat (GELMA) Sentezi.....	23
4.2.2.1.1. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) Kullanılarak GELMA Sentezi	23
4.2.2.1.2. Karbonat-Bikarbonat Tamponu (CB) Kullanılarak GELMA Sentezi	23
4.2.2.2. Foto-Çapraz Bağlanabilir Biyomürekkebin Hazırlanması.....	24
4.2.2.3. Manyetik Substratların Üretimi	25
4.2.2.3.1. Manyetik Substratların Yüzey Modifikasyonları	26
4.2.2.3.2. Temas Açısı Ölçümü	26
4.2.2.4. 4B Basım Prosedürü	27
4.2.2.5. Aljinat Liyaz Uygulaması	30
4.2.2.6. Şişme Oranı Ölçümü.....	31
4.2.2.7. Mekanik Test	31

4.2.2.8. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	31
4.2.2.9. Sitotoksosite Testi.....	32
4.2.2.10. Hücre Kültürü	34
4.2.2.11. Alamar Blue Hücre Canlılık Testi	35
4.2.2.12. Hücre Morfolojisi ve Yayılımı	36
4.2.2.13. İmmünfloresan Boyama.....	36
4.2.2.14. İstatistiksel Analiz.....	37
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	38
5.1. SICAKLIK DUYARLI HİDROJEL PLATFORMU	38
5.2. 4B BASIM İLE ÜRETİLEN TAŞIYICI İSKELE SİSTEMİ.....	47
5.2.1. GELMA ÜRETİM BULGULARI	47
5.2.2. MANYETİK SUBSTRAT ÜRETİM BULGULARI.....	49
5.2.3. 4B BASIM OPTİMİZASYON BULGULARI.....	54
5.2.4. ALJİNAT LİYAZ UYGULAMASI BULGULARI.....	63
5.2.5. HÜCRE CANLILIĞI VE YAYILIMI	68
5.2.5.1. Alamar Blue Testi ile Canlılık Analizi	68
5.2.5.2. Hücre Morfolojisi ve Yayılımı	70
5.2.6. İMMÜNFLORESAN BOYAMA BULGULARI	80
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	87
6.1. TARTIŞMA	87
6.1.1. SICAKLIK DUYARLI HİDROJEL PLATFORMU ÇALIŞMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	87

6.1.1.1. Katman Tasarımının Etkisi	87
6.1.1.2. Direkt Isıtmanın Hidrojel Platformlar Üzerine Etkisi.....	88
6.1.1.3. Katlanma Kontrolünün Işık Aydınlatması ile Sağlanması	88
6.1.2. 4B BASIM İLE ÜRETİLEN TAŞIYICI İSKELE SİSTEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	90
6.1.2.1. GELMA Üretiminin Değerlendirilmesi.....	91
6.1.2.2. Manyetik Substrat Üretiminin Değerlendirilmesi.....	92
6.1.2.3. 4B Basım Optimizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi	94
6.1.2.4. Aljinat Liyaz Uygulamasının Değerlendirilmesi	96
6.1.2.5. Hücre Canlılığı ve Yayılımının Değerlendirilmesi.....	98
6.1.2.6. İmmünfloresan Boyama Bulgularının Değerlendirilmesi.....	100
6.2. SONUÇ.....	101
<u>KAYNAKLAR.....</u>	104
<u>EKLER</u>	115
EK-1 TERMAL KAMERA GÖRÜNTÜLERİ.....	115
EK-2 C2C12 ALAMAR BLUE TESTİ KALİBRASYON EĞRİSİ	116
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	117
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	120

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İskelet kas doku hiyerarşisini, içerdiği fiber yapıları, kan damarlarını ve sinir ağlarını anlatan ilüstrasyon (16).	3
Şekil 2.2. Yaralanma sonrası kas dokusunun kendini onarım mekanizması. (A) Normal durumdaki kas dokusu. B) Küçük hacimli kas kaybının onarımı, uydu hücre aktivasyonu. (C) Öncü miyofiberlerin oluşumu ve kalan uydu hücrelerin geri dönüşümü. (D) Bölgedeki sağlam miyofiberlerle kaynaşma ve rejenerasyon. (E) Büyük hacimli kas kaybı yaralanması, Fibroblastların bölgeye göçü ve (F) kolajenle boşluğun doldurulması. (G) Yara dokusu oluşumu (7).....	5
Şekil 2.3. Doku mühendisliği süreçlerini anlatan ilustrasyon. (<i>Biorender ile tasarlanmıştır.</i>)	6
Şekil 2.4. Miyoblast enjekte edilen kasın hematoksilan/eozin boyaması (17).....	9
Şekil 4.1. 3B basılmış kalıp modelleri. (a) 3B yazıcı, (b) model FA, (c) model V5, (d) model H3, (e) model D4.	18
Şekil 4.2. Hidrojel platformun kalıplanması şematik gösterim. (a) P(NIPAm) ve P(AAm)’nin sentezi. (b) Kalıplara doldurma. (c) Kalıptan çıkarma. (d) Işıkla aktive etme yöntemiyle platformun hareket kontrolü.	20
Şekil 4.3. Üç katmanlı hidrojel platformları için üretim sürecinin şematik gösterimi. (a) 3D yazıcı ile kalıpların basılması (1). Desenlerin renkli P(NIPAm) (2) ile, ara katman renksiz P(NIPAm) (3) ve pasif katman P(AAm) (4) ile doldurulması. Çapraz bağlamadan sonra hidrojel platformlarının kalıptan çıkarılması (5). (b) Kalıptan çıkarma işleminden sonra üretilen hidrojellerin farklı modellerinin katman boyutları. (c) Hidrojel platformun su altında mavi ışık ile uyarılması.	22
Şekil 4.4. Jelatin metakrilat (GELMA) sentezinin şematik gösterimi (79).	24
Şekil 4.5. EcoFlex manyetik substratın üretimi.....	26

Şekil 4.6. Manyetik substrat üzerine 3B hücre yüklü hidrojin basım süreci. (1) Temas açısını düşürmek için uygulanan yüzey işlemleri. (2) 3B biyo-basım. (3) Çapraz bağlama. Basılan farklı modeller ve ölçüler.	28
Şekil 4.7. 3B basım ve kayıt düzeneği ile başarılı basımlardan oluşan kolaj.....	29
Şekil 4.8. Basım sonrası örneklerin katlanması. Örneklerin (a) manyetik alan üzerine yerleştirilmesi, (b) katlanarak rulo haline getirilmesi, (c) PLA tutucu içine yerleştirilmesi, (d) yerleştirme sonrası görüntü ve (e) hücre kültürüne hazırlık.	30
Şekil 5.1. (a) Desenler tarafından belirlenen katlanma eksen. (b) Mavi bir LED ile aydınlatmadan önceki ve sonraki katlanma durumu.	38
Şekil 5.2. Üç katmanlı örneklerin direkt olarak ısıtıldığı deneyden alınan periyodik fotoğraflar.	39
Şekil 5.3. Üç katmanlı renksiz örneklerin mavi LED ışık aydınlatması altında alınmış olan periyodik fotoğrafları.....	40
Şekil 5.4. Farklı derişimlerde boyanın hidrojin katlanma açısı ve tepki zamanına etkisi.	41
Şekil 5.5. (a) Mavi Led ışık aydınlatması altında kendi kendine katlanan hidrojinlerin şematik gösterimi ve videodan alınmış periyodik fotoğraflar. (b) Zamana karşı V5 modeli için katlama açılarının değışimi. (c) Zamana karşı H3 modeli için katlama açılarının değışimi.	43
Şekil 5.6. Manyetik filmlili dört kollu hidrojin platformlarının (Model FA) şematik gösterimi. Örneğin manyetik alan etkisinde hareketi ve hedefi yakalamasının videodan alınan fotoğrafları. (b) Zamana karşı dört kollu platformlar için katlanma açılarının değışimi. (c) Zamana karşı sıcaklık ve katlama açısı arasındaki ilişki.	45
Şekil 5.7. Hidrojin platformu üzerine ekilen hücrelerin 7. günde Phalloidin-DAPI boyama görüntüleri. (a) Ölçek 1 mm, (b) Ölçek 100µm.....	46
Şekil 5.8. GELMA üretimi. (a) Üretim özeti. (b) 3B basım ve ışıkla çapraz bağlama. (c) CB tamponu kullanılarak üretilmiş GELMA'nın 1 dk. ışıkla çapraz bağlama sonrası alınmış	

fotoğrafi. (d) PBS tamponu üretilmiş GELMA'nın 1 dk. ışıkla çapraz bağlama sonrası alınmış fotoğrafı.	47
Şekil 5.9. İki farklı reçete ile üretilen GELMA'ların kütlece %verimi.	48
Şekil 5.10. Katlama boynunun etkisi. (a) Boyun tasarımının olduğu örneğin manyetik alan etkisinde katlanma videosundan alınan görüntüler. (1) İlk hareketin uzunluğu boyun tarafından belirlenir. (2) Mıknatıs ilerledikçe uç kısım boyundan bükülerek substrat üzerine düşer. (3) Uç kısım içerde kalır ve rulo şeklinde iç içe katlama gerçekleşir. (b) Boyun tasarımının olmadığı örneğin katlanma videosundan alınan görüntüler. (1) İlk hareket rastgele gerçekleşmiştir. (2) Bir bükülme noktası olmadığı için uç kısım substrat üzerine kapanmaz. (3) Mıknatıs diğer uca ulaştığında ağırlık merkezinin değişmesinden dolayı rastgele bir katlanma gerçekleşmiştir.	50
Şekil 5.11. Farklı boyun-baş mesafesinin katlanma üzerine etkisi. (a) 2,4 mm, (b) 3,2 mm, (c) 4 mm. (d) uzaklık-iç çap arası ilişki grafiği.	51
Şekil 5.12. Temas açısı ölçümleri. Hidrofilik olan cam yüzey ve hidrofobik olan teflon yüzey ile karşılaştırılarak EcoFlex substratın temas açısının modifiye edilmesi.	52
Şekil 5.13. Ekstraksiyon sıvılarının eklenmesinin ardından 24, 48 ve 72. Saatlerde alınan görüntüler. Hücre yayılımı ve morfolojik değişim bu görüntülere göre değerlendirilmiştir. (+) pozitif kontrol, (-) negatif kontrol.	53
Şekil 5.14. 72. saat sonunda kuyucuklardaki canlı hücre sayısının belirlendiği Alamar Blue testi sonuçları.	54
Şekil 5.15. GELMA10 hidrojelinin EcoFlex-APTES manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C	55
Şekil 5.16. GELMA101 hidrojelinin EcoFlex-APTES manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C	56
Şekil 5.17. GELMA20 hidrojelinin EcoFlex manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C	57

Şekil 5.18. GELMA20 hidrojelinin EcoFlex-UVOzon manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C	58
Şekil 5.19. GELMA20 hidrojelinin EcoFlex-APTES manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C	59
Şekil 5.20. GELMA1g201 hidrojelinin 17°C tabla sıcaklığında 3B basımı. (a) 97° temas açısına sahip EcoFlex substrat üzerine basım. (b) 85° temas açısına sahip EcoFlex-UVOzon substrat üzerine basım. (c) 45° temas açısına sahip EcoFlex-APTES substrat üzerine basım.	60
Şekil 5.21. Tasarlanan ölçüler ile gerçekleşen ölçüler arasındaki fark.	61
Şekil 5.22. 3B basımdan hemen sonra uygulanan foto-çapraz bağlama sonrası desenlerin durumu.....	62
Şekil 5.23. 3B basımdan hemen sonra CaCl ₂ püskürtmesi ile çapraz bağlama ve ardından mavi LED ışık kullanılarak foto-çapraz bağlama sonrası desenlerin durumu.....	62
Şekil 5.24. Aljinat liyaz enzimi uygulanmamış örneğin SEM görüntüsü. (a) 50X büyütme, (b) 250X büyütme.....	63
Şekil 5.25. Aljinat liyaz uygulaması yapılmış örneğin SEM görüntüsü. (a) 50X büyütme, (b) 250X büyütme.	64
Şekil 5.26. 3. gün Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Aljinat liyaz uygulaması yapılmamış örneğin floresan mikroskopi görüntüsü. (b) Aljinat liyaz uygulaması yapılmış örneğin floresan mikroskopi görüntüsü. Ölçek: 100 µm.	65
Şekil 5.27. AL uygulaması yapılan ve yapılmayan örneklerin şişme oranı grafiği.....	66
Şekil 5.28. AL uygulaması yapılan ve yapılmayan örneklere uygulanan çekme testi sonucu elde edilen temsili gerilim-gerinim grafiği. Grafikten elde edilen elastisite modülleri.....	67
Şekil 5.29. Alamar Blue canlılık analizi grafiği. 1. 3. ve 7. günde açık durumda kültür edilen örnekler içerisinde canlılığını sürdüren hücre sayıları.	68

Şekil 5.30. Alamar Blue canlılık analizi grafiği. 1. 3. ve 7. günde rulo halde kültür edilen örnekler içerisinde canlılığını sürdüren hücre sayıları.	69
Şekil 5.31. Açık-Düz örneklerle 1. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Ölçek: 50 µm	72
Şekil 5.32. Açık-Düz örneklerle 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Ölçek: 50 µm	73
Şekil 5.33. Açık-30 örneklerle 1. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Ölçek: 50 µm	74
Şekil 5.34. Açık-30 örneklerle 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Alt katmandan alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm (c) Desen üzerinden alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm	75
Şekil 5.35. Açık-90 örneklerle 1. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Ölçek: 50 µm	76
Şekil 5.36. Açık-90 örneklerle 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Alt katmandan alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm (c) Desen üzerinden alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm	77
Şekil 5.37. Rulo-30 örneklerle 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Ölçek: 50 µm	78
Şekil 5.38. Rulo-90 örneklerle 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, farklı bölgelerden alınmış yakınlaştırmalar; (b) Ölçek: 50 µm (c) Ölçek: 50 µm	79
Şekil 5.39. Açık-30 örneklerle 7. günde yapılan MyoD1/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Desen üzerinden alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm (c) Alt katmandan alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm	82
Şekil 5.40. Açık-90 örneklerle 7. günde yapılan MyoD1/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Desen üzerinden alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm (c) Alt katmandan alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm	83

Şekil 5.41. Rulo-30 örneklerden alınan kesitlere 7. günde yapılan MyoD1/DAPI boyaması.
(a) Ölçek: 200 µm. Farklı bölgelerden yakınlaştırmalar; (b) Ölçek: 50 µm (c) Ölçek: 100 µm
..... 84

Şekil 5.42. Rulo-90 örneklerden alınan kesitlere 7. günde yapılan MyoD1/DAPI boyaması.
(a) Ölçek: 200 µm, Farklı bölgelerden yakınlaştırmalar; (b) Ölçek: 100 µm (c) Ölçek: 50 µm
..... 85

Şekil 5.43 MyoD1 hücre çekirdeği başına ortalama boyama yoğunluğu. ImageJ programı
kullanılarak Açık ve Rulo örnekleri arasındaki MyoD1 boyama yoğunluğunun farkı. 86



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları.....	16
Çizelge 4.2. Deney grupları ve kullanılan konsantrasyonlar.....	24
Çizelge 4.3. 4B basım baskı parametreleri.	27
Çizelge 4.4. Sitotoksikite testi değerlendirme kriterleri (81).....	33
Çizelge 4.5. Sitotoksik cevap notunun değerlendirilmesi (81).....	33
Çizelge 5.1. PBS ve CB tamponları kullanılarak yapılan metakrilat reaksiyonları sonucu üretilen GELMA miktarları.	48
Çizelge 5.2. Şişme oranı testi için ağırlıkları ölçülen örnekler, şişme oranı, ortalama ve standart sapması.....	66
Çizelge 6.1. Değerlendirme kriterleri sonuçları	94

SİMGELER DİZİNİ

3B	3 Boyut
3BBB	3 Boyutlu Biyo-basım
4B	4 Boyut
AAm	Akrilamid
AL	Aljinat Liyaz
APS	Amonyum Persülfat
ATCC	American Type Culture Collection
APTES	(3-Aminopropil) trietoksisilan
BSA	Bovin Serum Albumin
CB	Karbonat-Bikarbonat Tamponu
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
ECM	Ekstraselüler Matris
EY	Eosin Y
GELMA	Jelatin Metakrilat
MA	Metakrilik Asit
MAA	Metakrilik Anhidrit
MBAm	Metilenbis(akrilamid)
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
mg	Miligram
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
MyoD1	Miyojenik transkripsiyonel düzenleyici protein
NIPAm	N-izopropilakrilamid

ns	İstatistiksel olarak anlamlı değil
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PGA	Poliglikolik Asit
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
sn	Saniye
OCT	Optimum Cutting Temperature
TEA	Trietanolamin
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletildiamin
V2P	1-vinyl-2-pyrrolidone

1. GİRİŞ

Başarılı doku ve organ nakli operasyonlarının gerçekleştirilebilmesinde hayati öneme sahip olan bağışçı miktarının azlığı küresel bir sağlık sorunu olarak güncelliğini korumaktadır. Yapılan araştırmalar 2014 yılında ABD’de günde 18 hastanın organ bekleme listelerinde kendilerine sıra gelmeden önce hayatını kaybettiğini göstermektedir (1). Öte yandan, yıllar itibarıyla organ nakline ihtiyaç duyan hasta sayısı hızla artarken, organ bağışçısı miktarında belirgin bir artış gözlenmemektedir. Ülkemiz özelinde ise gelişmiş ülkelerin aksine kadavradan organ eldesinin düşük olması, organ eldesinin çoğunlukla hastanın yakınlarından sağlanması nedeniyle nakil edilebilecek organ kısıtı yaşanmaktadır (2). Bu sınırlı mevcudiyet ve naklin immün yanıt riskinin yüksekliği, doku ve organ ihtiyacının karşılanmasında yeni yöntemlerin geliştirilmesine motivasyon sağlamaktadır (3). Bu yöntemlerin geliştirilmesinde doku mühendisliği stratejilerinin kullanılması küresel çapta yükselen bir ilgi görmektedir.

İskelet kası yetişkin insan vücut ağırlığının %40-45’ini oluşturur ve istemli hareketin gerçekleştirilmesinde etkindir (4). Tümör çıkarma, yüksek enerjili kazalar, spor yaralanmaları, yaşlanma ve genetik miyopatiler gibi çeşitli travmalar sebebiyle büyük hacimli kas kayıpları yaşanabilir. Kas dokusunun küçük yaralanmalar için gelişmiş bir kendini onarım mekanizması olsa da yukarıda bahsi geçen büyük hacimli kas kayıplarının rejenerasyon süreci fibröz yara dokusu oluşumu tarafından baskılanır ve bu nedenle iskelet kası işlevselliğini yitirebilir (5–7). Bu gibi durumlar için fibröz yara dokusunun yerine kas iyileşmesini tetikleyebilecek etkin bir ilaç tedavisi bulunmamaktadır.

Günümüz literatüründe ve klinik uygulamalarda otolog kas transferi iskelet kası onarımı için altın standart olarak kabul edilmektedir. Yaralanma bölgesine yapılacak otogreftleme işlemi çoğunlukla kas yenilenmesini kolaylaştırmaktadır. Ancak bu stratejide eksik dokuyu kapatabilecek miktarda sağlıklı bir transfer yapılabilmesi her zaman mümkün olmamaktadır (8). Bu nedenle büyük hacimli kas kayıplarında eğer otolog kas transferi tedavi sürecinde mümkün olmazsa genellikle uzvun amputasyonu yoluna gidilmektedir.

Kas öncü hücrelerinin transplantasyonu gibi diğer alternatifler uzun yıllardır araştırılmaktadır (9–11). Fareler üzerinde yapılan uydu hücre transplantasyonu deneyi kayda

değer kas lifi rejenerasyonu ve kasılma işlevselliği göstermiştir (11). Bununla birlikte, uydu hücrelerinin düşük verimli izolasyonu, düşük proliferasyon kapasitesi ve bağışıklık reddinin neden olduğu düşük hücre hayatta kalma oranı hücre kaynağı olarak kullanımını kısıtlamaktadır (12).

Otolog kas transferi ve hücre transplantasyonu gibi çözümlerin karşılaştığı bu gibi ciddi kısıtlar, rejenerasyon sürecini kolaylaştıracak sağlam ve özgün bir in vitro iskelet kası modeline olan ihtiyacı gün geçtikçe artırmaktadır.

Yapılan çalışmalar iskelet kas dokusu iyileşmesinde hücresel tedavilerin tek başlarına yeterli olamayacağını göstermektedir. Hücrelerin iskele (ing. scaffold) adı verilen taşıyıcı sistemler vasıtasıyla defekt bölgelerine yerleştirilmesi prensibinin daha etkili olduğu anlaşılmıştır (13). Bu iskelelerin inşasında mühendislik bilimlerden yararlanan doku mühendisliği alanında eksojen faktörlerin (fiziksel, kimyasal, elektriksel, manyetik vb.) kullanımı ile in vitro iskelet kası dokusu modelleri oluşturmak için çeşitli stratejiler uygulanmaktadır. İskelet kası ortamını taklit etmek için çeşitli tasarım yöntemleri popüler olmuştur. Elektro eğirme (ing. electrospinnig), ıslak eğirme (ing. wet spinnig), gözenekli hidrojeller, kontrollü büyüme faktörü salıcılar gibi yöntemler ile özellikle son yıllarda hızla gelişen üç boyutlu (3B) biyobasım teknolojisi iskele üretiminde kayda değer bir ilerleme yaşanmasına sebep olmuştur. 3B biyobasım elektroğrılmış fiberler, mikro akışkanlar, kontrollü salım teknolojileri gibi ayrı ayrı teknolojileri de bünyesinde birleştirme potansiyeli de olan bir teknolojidir.

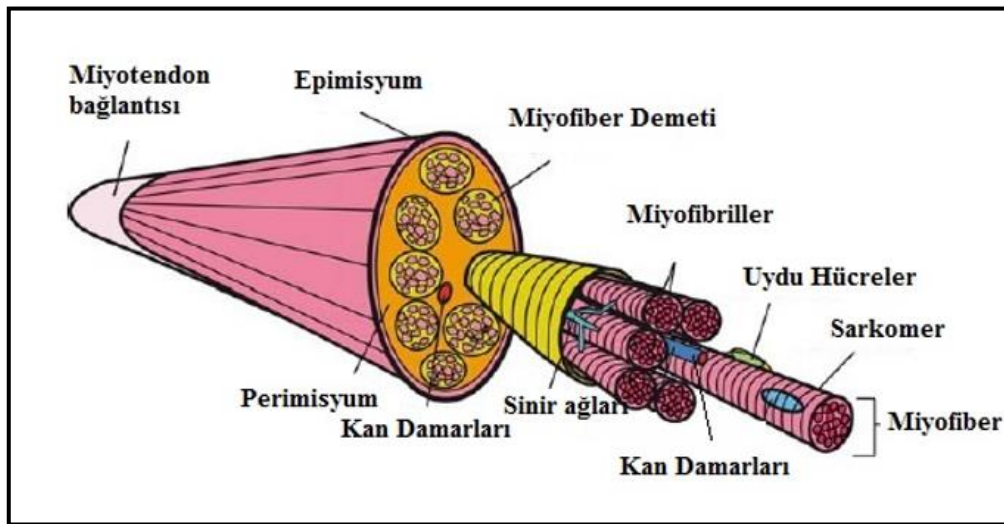
3B basım teknolojisi her ne kadar kısa sürede hızlı bir gelişme göstermiş olsa da söz konusu yaklaşım “biyobasım” olduğunda hala çözülmesi gereken pek çok optimizasyon aşaması bulunmaktadır. Malzeme içerisinde hücre canlılığının ve homojen dağılımının sağlanması, optimum reolojik özelliklerin belirlenmesi, çapraz bağlama gibi üretim sonrası yöntemlerle istenilen şeklin korunumu bunların en önemlileridir. Son yıllarda literatüre girmiş olan dört boyutlu (4B) basım kavramı ise bu optimizasyon aşamalarını kolaylaştırma potansiyeli ile dikkat çekmektedir. 4B basım, 3B basım ile elde edilen bir yapının, “şekil hafızası” veya “kendiliğinden harekete geçme” gibi en az bir tür akıllı davranış sergilemesi ile gerçekleştirilen konsepte verilen addır (14,15).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. İSKELET KASININ YAPISI

2.1.1. ANATOMİK YAPI

İskelet kası birbirine paralel yönlenmiş miyofiberlerden oluşan dinamik bir dokudur (Şekil 2.1.). İskelet kası anatomik olarak oldukça organize, yoğun şekilde paketlenmiş her biri çok çekirdekli tek kas hücrelerini temsil eden miyofiberlerden, kan damarlarından, sinir ağlarından ve bunları sarmalayan bağ dokudan (perimisyum) oluşur. Perimisyum ile kaplı bu miyofiber demetlerini ise epimisyum adı verilen bir diğer bağ doku sarmalar. Tek bir miyofiber ise uydu hücreleri içeren bazal bir tabaka ile kaplıdır. Bunları ise miyoblastların birbiri ile kaynaşması sonucu üretilen miyofibril adlı daha ince lifler bir araya gelerek oluşturur. Miyofibriller ise sarkomerlerin tekrar eden bölümlerinden oluşur. İskelet kasının en küçük fonksiyonel birimi, miyozin olarak bilinen bir proteinden yapılmış kalın bir filament ve aktin olarak bilinen bir proteinden yapılmış ince bir filamentten oluşan sarkomerdir (16). İskelet kasındaki hücre organizasyonu doku fonksiyonu ile doğrudan ilişkilidir, bu nedenle hücre hizalamasını indüklemek için kas hiyerarşisini geometrik açıdan taklit edebilmek, miyojenik süreçteki ilk adımı temsil eder (17,18).



Şekil 2.1. İskelet kas doku hiyerarşisini, içerdiği fiber yapıları, kan damarlarını ve sinir ağlarını anlatan ilüstrasyon (16).

2.1.2. EKSTRASELÜLER MATRİSİN KOMPOZİSYONU

Ekstraselüler matris (ECM), hücre bileşenleri için mekanik bir destek olarak görev yapmasının yanı sıra hücre davranışının yönlendirilmesinde de görev üstlenir (19). Bu nedenle matris kompozisyonun incelenmesi hücre iskelesi üretimi için malzeme seçiminde fayda sağlayabilir. İskelet kası, bazal tabaka ve kas içi bağ dokularından oluşur. Bazal tabaka sarkomer, miyofibril, miyofiber ve uydu hücrelerini bağ dokudan ayıran bir bariyer görevi görür (20). Adhezyon, migrasyon, kaynaşma, farklılaşma gibi tüm aktiviteler bu tabakanın altında görülür. Çoğunlukla laminin, kollajen tip IV, nidojen ve perlekan içerir (21). Organize bir yapıya sahip olan bağ doku ise üç katmana ayrılır. Endomisyum bazal tabakanın kapladığı bireysel miyofiberleri sarmalar ve kolajen liflerden meydana gelmiştir (22). Bir araya gelmiş miyofiber demetleri kolajen tip I bakımından zengin perimisyum ile kaplanır. Bu yapıyı ise epimisyum adı verilen bir diğer kolajen bazlı lif tabakası sıkıca sarar (23). Literatürden de görüldüğü üzere iskelet kaslarında yapısal bütünlük değişik tiplerde kolajen ile sağlanmaktadır.

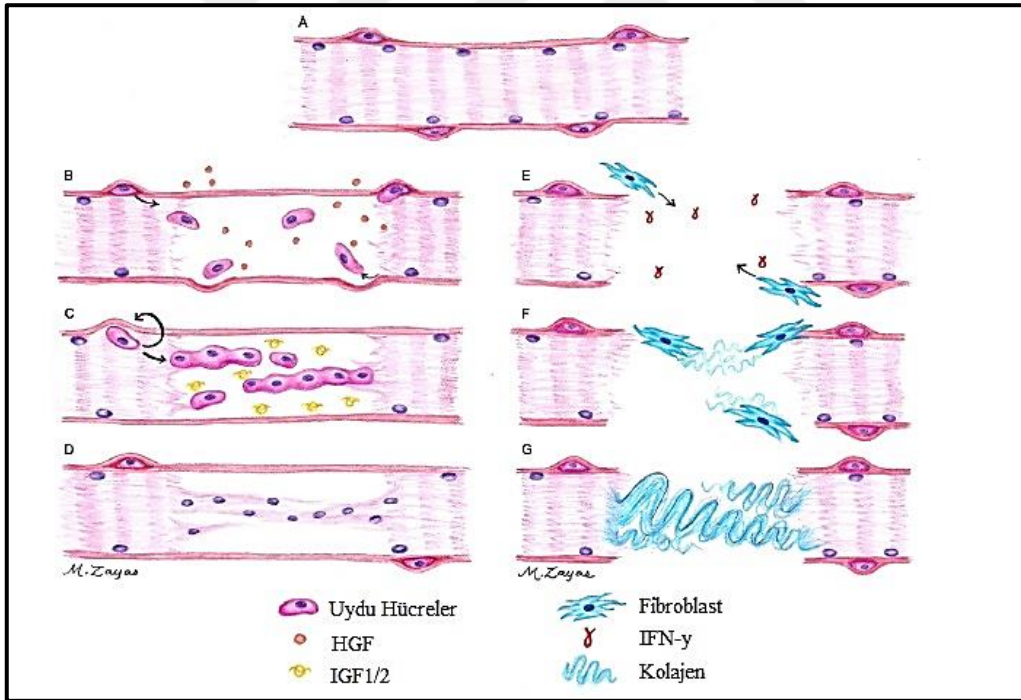
2.1.3. MATRİS SERTLİĞİ

Bulundukları ortam ve yüzeylerin mekanik özelliklerinin hücre davranışı üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması, ortam sertliği (ing. stiffness) ile kontrol edilebilir. Örneğin daha yumuşak yüzeylerde (0.1-1 kPa) (24) nöronal fenotipi benimserlerken 8-17 kPa sertliğe sahip matrisler üzerinde miyojenik olma eğilimindedirler (25,26). Sert bir substratta ise (30-40 kPa), osteojenik farklılaşma geçirdikleri rapor edilmiştir (27).

Sağlıklı kasın elastik modülü yaklaşık 12 kPa iken, yaşlanmış, dejenere olmuş ve yaralanmış kasların elastik modülü 18 kPa'nın üzerindedir [23]. Kas dokusu olgunlaşmasının sertlikle yüksek oranda ilgili olduğuna dair literatürde pek çok çalışma vardır. Örneğin, fare miyoblast hücre hattı (C2C12) ve insan miyoblastları, uygun fizyolojik sertliğe sahip substratlar üzerinde kültürlendiğinde gelişmiş doku olgunlaşmasının göstergesi olan miyosin/aktin çizgilenmesi gözlemlenmiştir (28).

2.1.4. KAS DOKUSUNDA YARALANMA

Kas dokusunda meydana gelen bir yaralanma sonrasında Şekil 2.2.'de izah edildiği üzere kas dokusunun iki olası durumu vardır. Bazal tabaka altında bulunan ve normal durumda uyku durumunda bulunan uydu hücreleri işlevsellik kazanarak hasarlı bölgeye göç ederler ve hızla çoğalırlar. Yara bölgesinin ihtiyacı olan miyofiberlerin üretilmesinden sorumlu olan uydu hücrelerinin bir bölümü kendi içlerinde kaynaşarak öncü miyofiberleri oluşturur. İhtiyaç fazlası olarak çoğalmış olanlar ise daha sonraki bir ihtiyaç döneminde kullanılmak üzere bazal tabaka altına geri dönerler. Oluşan öncü miyofiberler ise hasarlı bölge yakınında sağlam durumda bulunan miyofiberlerle kaynaşarak olgunlaşırlar. Ancak hasarlı bölgenin büyük hacimli bir kas kaybı yaşadığı durumda bazal tabaka parçalandığı için kendini onarım süreci fibröz yara dokusu oluşumu tarafından baskılanır. Uydu hücrelerinin aktivitesi yetersiz kalır ve hasarlı bölgedeki boşluk fibroblastlar tarafından kolajen doldurularak hızla kapatılır. Bu nedenle bölgede işlevsel bir kas dokusu yerine bir yara dokusu oluşmuş olur (7).

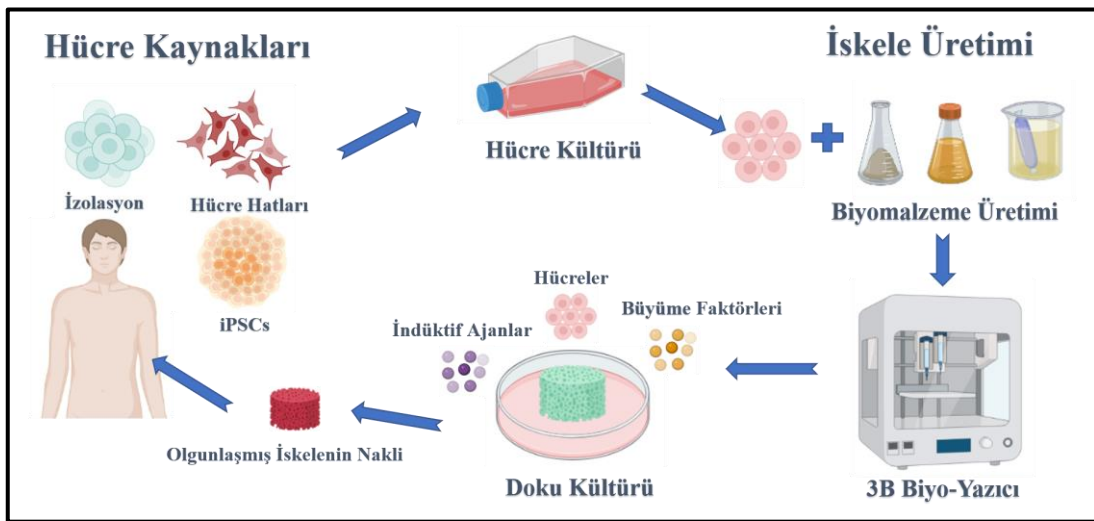


Şekil 2.2. Yaralanma sonrası kas dokusunun kendini onarım mekanizması. (A) Normal durumdaki kas dokusu. (B) Küçük hacimli kas kaybının onarımı, uydu hücre aktivasyonu. (C) Öncü miyofiberlerin oluşumu ve kalan uydu hücrelerin geri dönüşümü. (D) Bölgedeki sağlam miyofiberlerle kaynaşma ve rejenerasyon. (E) Büyük hacimli kas kaybı yaralanması, Fibroblastların bölgeye göçü ve (F) kolajenle boşluğun doldurulması. (G) Yara dokusu oluşumu (7).

2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Organ ve doku ihtiyacının giderek arttığı ancak donör sayısının artmadığı günümüz dünyasında laboratuvar ortamında doku ve organ üretimi fikri son yıllarda popülerlik kazanmıştır. Doku mühendisliği, biyo-uyumlu malzemelerden üretilmiş taşıyıcı iskeleler (ing. scaffold), hücreler ve büyüme faktörü ajanlarının bir bileşimi ile eksik ya da hasarlı dokuları onarmayı ve yenilemeyi amaçlayan disiplinler arası bir araştırma alanıdır (29). Taşıyıcı iskele, doku onarımını yerinde kontrol etmek ve yönlendirmek için kullanılan bir araçtır. Taşıyıcı iskeleler hücrelere geçici bir ekstraselüler matris (ECM) sağlayan, yerini alması planlanan doku veya organın özelliklerini taklit eden sentetik veya doğal polimerlerden yapılmış üç boyutlu yapılar halinde tasarlanıp üretilirler. Taşıyıcı iskeleler biyoyumlulukları sayesinde besiyeri geçişine izin verirken, protein ve büyüme faktörü gibi biyoaktif ajanların tutulmasına izin verir. Ayrıca üzerinde veya içerisinde kültür edilen hücrelerin adhezyonuna ve çoğalmasına ortam oluşturarak kendi ECM'lerini oluşturmaya kadar hücrelere gerekli olan mekanik stabiliteyi sağlar (17).

Doku mühendisliği süreci Şekil 2.3.'de özetlendiği üzere genellikle beş aşamadan oluşur. Hücre izolasyonu ya da uygun hücre temini ile süreç başlar. Daha sonra bu hücreler in vitro ortamda çoğaltılır. Üçüncü aşamada uygun biyomalzeme seçimi yapılarak taşıyıcı iskele üretimi hücreli ya da hücreli olarak tamamlanır. Bir sonraki adımda hücreler ve biyoaktif ajanlarla birlikte iskele üzerinde hücre kültürü (doku kültürü) gerçekleştirilir. Son olarak ise olgunlaşmış iskelenin vücuda nakli ile süreç tamamlanır.



Şekil 2.3. Doku mühendisliği süreçlerini anlatan ilustrasyon. (Biorender ile tasarlanmıştır.)

2.2.1. İSKELET KASI DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Kas dokusu mühendisliği ve rejenerasyonu için yeni stratejiler oluşturulması günümüz doku mühendisliği literatüründe artan bir ilgiye sahiptir. Kas doku biyomühendisliği yaklaşımları implantasyon ve hasarlı kasların / yara dokularının değiştirilmesi stratejisiyle hareket ederek karmaşık kas yapılarını in vitro olarak inşa etmeyi amaçlar. Rejenerasyon yaklaşımı ise, in-vivo olarak kalan dokudan hasarlı bölgeye yeni kas oluşumunu arttırmak implant edilebilecek doku benzeri iskeleler geliştirmeyi amaçlar (30,31). Her iki yaklaşım da temel olarak hücreler, taşıyıcı iskeleler ve moleküler sinyal kombinasyonlarına dayanırlar (8). Taşıyıcı iskele bazlı yöntemlerin yanı sıra iskelenin kullanılmadığı direk olarak hasarlı bölgeye hücre transplantasyon terapisinin uygulandığı hücre temelli yaklaşımlar da mevcuttur.

2.2.1.1. Hücre Temelli Yöntemler

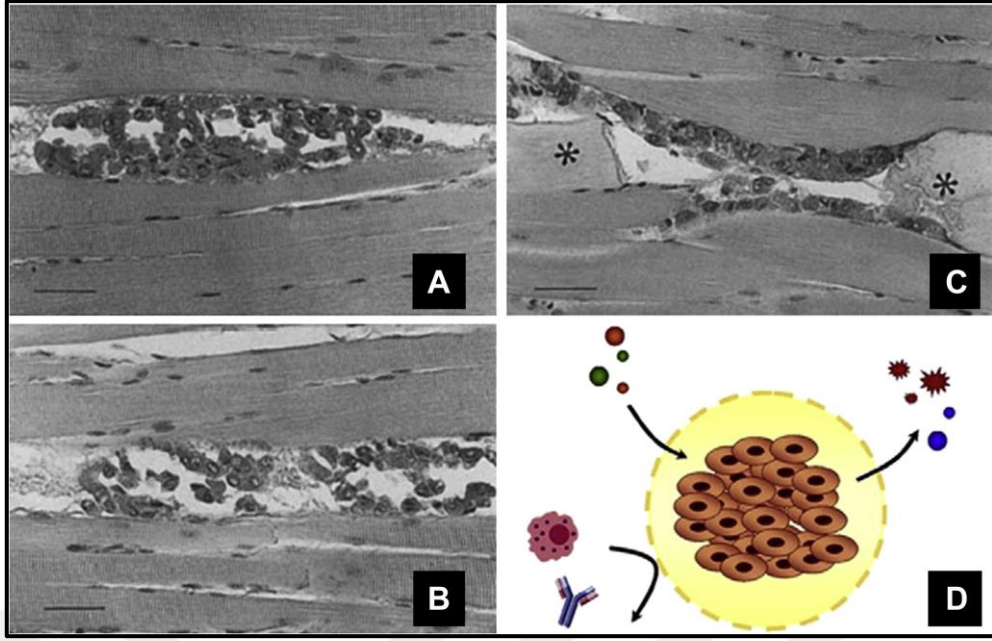
İskelet kası hasarlarının tedavisinde kas yenilenmesini doğrudan ya da dolaylı olarak artırabilen öncül kas hücreleri (ing. myoprogenitor) potansiyel vadetmektedir. Yüksek çoğalma oranları, kendini yenileme kapasitesi ve miyojenik farklılaşma yeteneğine sahip uydu hücreleri gibi hücreler, hasarlı dokuya entegre olarak yeni miyofiber oluşumunu teşvik ederler. Parakrin sinyal iletimi yoluyla komşu hücreleri aktive eden mezenkimal kök hücreler (MSC) ise dolaylı olarak kas işlevselliğinin rejenerasyonuna katkıda bulunabilirler (32). Uydu hücreleri ve MSC'lerin yanı sıra miyoblastlar (33,34), CD133+ miyoprogenitör hücreler (35), uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPSCs)'den türetilen öncü hücreler (36,37) ve embriyonik kök hücrelerin (36,38) iskelet kası gelişimine ve rejenerasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Uydu hücreleri, iskelet kasının toplam hücre çekirdeği içeriğinin yaklaşık %2-7'sini oluşturur (39). Bazal lamina ile her bir lifi çevreleyen plazma zarı arasında yer alırlar ve iskelet kasında varsayılan kök hücreler olarak işlev görürler. Uydu hücreleri, kas lifi onarımında çok önemli bir rol oynar. Hasar alınan durumda uyku modundan aktif duruma geçerek hasarlı bölgeye göç eder, çoğalır, miyojenik farklılaşmaya uğrar, yeni kas liflerini oluşturur ve bölgedeki sağlam kas lifleri ile bütünleşir (17). Collins ve arkadaşları yedi uydu hücreyi, radyasyona maruz bırakılmış fare kaslarına transplante etmişler ve 100'den fazla miyofiber ürettiğini ve dinamik kendini yenileme yoluyla kastaki uydu hücre havuzunu

genişlettiğini göstermişlerdir (40). Alternatif bir yaklaşım olarak uydu hücrelerinin transplantasyondan önce büyük sayılara ex vivo olarak genişletilmesi düşünülmüştür. Ancak çok sayıda çalışma, uydu hücrelerin in vitro olarak çoğaltılmasının ve kültürünün, sadece birkaç gün için bile olsa, çoğalma kapasitesini ve yenilenme yeteneklerini ciddi şekilde sınırlayabileceğini bildirmiştir (41,42).

Alternatif olarak daha yüksek verimle izole edilebilen bir başka hücre tipi olan MSC'lerin kullanımı da araştırılmaktadır. MSC'ler osteojenik, kondrojenik ve adipojenik soylara farklılaşan multipotent hücrelerdir (43).  nceki çalışmalarımızda bizim de rapor ettiğimiz üzere, bazı  alışmalar MSC'lerin miyojenik farklılaşma geçirerek kas onarımına katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir (44,45). Ferrari ve arkadaşları kemik iliği kaynaklı MSC'leri fare  n tibialis kaslarına enjekte ederek bu hücrelerin yaralanma bölgesine g   edebileceğini, miyojenik farklılaşma geçirebileceğini ve mevcut dokuyla entegre olabileceğini göstermiştir (46).

Literatürde MSC'lerin terapötik etkilerini parakrin salgılaması yoluyla gösterdikleri konusunda genel bir fikir birliği vardır. Yapılan bazı  alışmalar MSC'lerin nakledildikleri bölgede canlılıklarını koruduğu sürece parakrin gibi faktörleri salgıladığını ve kas onarımına katkıda bulunmaya devam ettiklerini rapor etmişlerdir (47,48). Fakat hücrelerin enjeksiyon uygulamasıyla hasarlı bölgeye nakli çeşitli dezavantajlara sahiptir. Hücrelerin büyük çoğunluğu v coda girdikten kısa bir süre sonra sert yaralanma sonrası bağışıklık ortamında canlılıklarını yitirmektedirler (şekil 2.4. A-C) (49,50). Bağışıklık baskılayıcı ilaçlar kullanılarak yapılan çalışmalarda enjekte edilen hücrelerin canlılığı önemli  l de artmıştır (51). Ancak bir dizi istenmeyen komplikasyon ve ilaç yan etkileri, hücre nakli için alternatif yaklaşımların geliştirilmesini gerekli kılmıştır (52).



Şekil 2.4. Miyoblast enjekte edilen kasın hematoksilen/eozin boyaması (17).

Bu alternatiflerin bir örneği olarak Murua ve arkadaşları hücreleri doğrudan enjekte etmek yerine, hücreleri konakçı bağışıklık sisteminden korurken hücreden salgılanan faktörlerin dışarı difüzyonuna izin veren polimer bazlı bir mikrokapsül içerisinde hasarlı bölgeye nakletmişlerdir (Şekil 2.4. D) (53).

Yağ dokusu, kemik iliği, göbek kordon kanı gibi farklı kaynaklardan elde edilen MSC'lerin yeniden üretilebilir şekilde iskelet kası miyoblastlarına nasıl farklılaştırılabileceği henüz tam anlamıyla keşfedilmemiştir. Bu noktadan hareketle yöntem ve stratejilerin geliştirilme aşamasında ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarının kullanımı literatürde hala yaygın seviyededir. Rejeneratif tıp ve doku onarımının kritik özelliği, hücresel büyümeyi ve farklılaşmayı kontrol eden faktörleri daha iyi anlama ihtiyacıdır. Ölümsüzleştirilmiş hücre hatları bu çabalarda çok faydalı olmuştur. Örneğin, orijinal olarak fare kasından izole edilen kas öncül hücre hattı C2C12, bir kas öncü hücresinden, bir miyoblasta, ardından bir miyosite ve son olarak da çok çekirdekli bir hücreye farklılaşma adımlarından geçmek üzere uyarılabilen bir hücre hattıdır.

2.2.1.2. Taşıyıcı İskele Bazlı Yöntemler

Biyouyumlu malzemelerden üretilen taşıyıcı iskeleler, nakledilen hücrelerin veya konak kas hücrelerinin hayatta kalma oranlarını artırmak, fonksiyonel olgunlaşmalarını desteklemek,

bağışıklık reddinden korumak ve hasarlı bölgedeki sağlam kas dokuları ile entegre olana dek mekanik stabilite sağlamak gibi fiziksel ve kimyasal destekler sağlayabilir (54). Taşıyıcı iskeleler çeşitli *in-vitro* ve *in-vivo* doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmıştır. Son yıllarda büyük hacimli kas kaybı vakaları için klinik öncesi modeller ve stratejiler oluşturmak adına sıklıkla çalışılmaktadır. Genel olarak, doğal ve sentetik polimerler veya hücreleştirilmiş ECM'ler biyo-uyumlu malzeme kaynağı olarak kullanılmaktadır. Özet olarak, taşıyıcı iskele kullanımının amacı; hedeflenen dokunun onarımını sağlamak ve hücre davranışını kontrol edebilmek için doğal dokunun mikro-çevresini en yakın haliyle taklit edebilmektir.

Doku iskelesi üretiminde doğal ya da sentetik biyouyumlu polimerlerden sıklıkla yararlanılır. Kolajen, aljinat, hiyalüronik asit, fibrinojen gibi doğal polimerler biyolojik olarak iyi bir uyuma sahip olsa da genellikle zayıf mekanik özelliklere sahiptir. Daha yüksek mekanik dayanıma sahip polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) polikaprolakton (PCL), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi sentetik polimerler ise hazırlanmaları ve maliyet açısından daha erişilebilir olmaları açısından tercih edilmektedir. Ancak bu malzemelerin de düşük biyouyumluluğu karşılaşılan kısıtlar arasındadır. Bu kısıtların üstesinden gelmek için kombine malzemeler de sıklıkla kullanılmaktadır (55,56).

2.2.1.2.1. Malzemeler

Biyouyumlu taşıyıcı iskele olarak sentetik polimerlerin (örneğin; PCL, PLA, PLGA vd.) iskelet kası dokusu rejenerasyonunu verimli bir şekilde desteklediği rapor edilmiştir (17,57). Bununla birlikte, çoğunlukla taşıyıcı iskele imalatı sırasında kullanılan kimyasal çözücülerle ilgili sitotoksikite sorunları ve 3B biyo-basım gibi yeni teknolojilerle olan uyumsuzluklarının yanı sıra, hücre tutunması ve çoğalmasını destekleyici niteliklerinin de limitli olması, daha yüksek biyouyumluluk ve biyomimetik özelliklere sahip alternatif biyomalzemelerin araştırılmasına yol açmıştır (58). Bunlar arasında, hidrojel bazlı biyomalzemeler, iskelet kası dokusu mühendisliği için umut verici adaylar olarak kabul edilir. Hidrojeller, doğal ya da sentetik polimerlerden elde edilebilirler ve daha yüksek su içeriği, biyokimyasal destekler ve ayarlanabilir fiziksel ve mekanik özellikler dahil olmak üzere benzersiz biyomimetik özelliklere sahiptir (59). Ayrıca, hidrojellerin düşük sıcaklıkta işlenebilirlikleri ve sulu çözelti halinde hazırlanabiliyor olmaları sayesinde 3B biyo-basım gibi yeni tekniklerle de uyumludur.

Sentetik Polimerler

PGA, PLA, PCL ve PLGA gibi sentetik polimerler, mekanik dayanımları, ucuz olmaları ve kolay işlenebilir olmaları nedeniyle iskelet kası rejenerasyonu için pek çok çalışmada kullanılmıştır. 3B yüksek sıcaklıklı basım, elektro eğirme, ıslak eğirme, döküm, kalıplama gibi tekniklerle istenilen geometrilerde üretilebilirler. Guex ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, elektro eğirme yöntemiyle hizalanmış PCL nanofiber ağlar üretilmiş ve üzerlerine ekilen miyoblastların yüksek düzeyde hizalı miyotüpler oluşturdukları rapor edilmiştir (60). Ayrıca, kas rejenerasyonunu indüklemek için büyüme faktörlerinin kontrollü salınımını kolaylaştırmak için sentetik yapı iskeleleri de tasarlanmıştır (8,61).

Her ne kadar mekanik dayanımları sebebiyle tercih ediliyor olsalar da sentetik polimerlere yönelik yaygın bir sorun, yüzeylerinin her zaman hücre tutunmasını kolayca desteklememesidir (62).

Doğal Polimerler

Doku mühendisliği uygulamalarında, kolajen, aljinat, jelatin, fibrinojen, kitosan gibi doğal polimerler sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların içinden protein bazlı polimerler olan kolajen jelatin ve fibrinojen, hücre dışı matrisin birçok özelliğini taklit etme avantajına sahiptir ve bu nedenle doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesi sırasında hücrelerin göçünü, büyümesini ve organizasyonunu yönlendirme potansiyeline sahiptirler (63). Polisakkarit bazlı polimerler olan aljinat ve kitosan ise mekanik stabiliteleri yüksek, toksik olmayan ve canlı hücrelerle etkileşim gösterebilen, kolajen gibi diğer biyopolimerlere kıyasla düşük maliyetli oldukları için tercih edilirler (64).

2.2.1.2.2. 3B Basım ile Üretim

Son yıllarda sıklıkla adından söz ettiren bir teknoloji olarak 3B basım, doku mühendisliğine hücre ve biyolojik ajanların birlikte basımına izin veren 3B biyo-basım (3BBB) olarak girmiştir. 3B biyo-basım, literatürde doku onarımında (12), hücre taşıyıcı iskeleler üretiminde (65), hastalık ve defekt modeli oluşturmada (65) ve ilaç salınımı ve izleme uygulamaları (66) başta olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır.

3BBB kullanılarak karmaşık yapıların basım zorluğu, basım hassasiyeti ve basılacak yapıların karmaşıklığı ile orantılıdır. 3BBB için kullanılan malzemeler biyo-mürekkep olarak adlandırılırlar. Biyo-mürekkepler 3B hücre ortamının oluşması için hücreleri de içeren sulu hidrojel çözeltileridir. Yüksek su içeriği ve düşük çapraz bağlama yoğunluğuna sahip olan biyo-mürekkepler, biyo-performansları ve basılabilirlikleri arasında çoğu zaman ters orantı olan malzemelerdir. 3BBB sürecinin başarılı olabilmesi için bu iki parametre arasında bir denge yakalamak gerekmektedir (67).

2.3. AKILLI MALZEMELER VE 4B BASIM

Akıllı malzemeler kullanılarak üretilen yapılar, ortamda mevcut uyaranlara bağlı olarak önceden tanımlanmış bir şekle kendi kendine dönüşebilir veya önceden tanımlı bir işlev uygulayabilir (14). 4B basım, 3B basım tekniğinde kullanılan üretim tekniği ile başlanarak, baskı sonrası malzemenin uyaranlar ile şekil değiştirmesiyle nihai yapısını alması prensibine dayanmaktadır. Dolayısıyla, iki terim arasındaki temel fark, kullanılan malzemelerin statik (3B basımda) ya da dinamik (4B basımda) olan doğasıdır.

3B basım ile elde edilen bir yapının 4B baskılanmış olarak kabul edilmesi için, “şekil hafızası” veya “kendiliğinden harekete geçme” gibi en az bir tür akıllı davranış sergilemesi gerekir (68). 4B basımın 3B basıma göre birçok avantajı vardır. 3B düzenlemeye ek olarak 4B, üretilen yapı üzerinde istenilen şekil değişimi ya da fonksiyon için zamansal bir kontrol sağlar. Bu nedenle, 4B basım, 3B basımın en büyük dezavantajlarından birinin üstesinden gelerek dinamik yapılar üretebilir. Akıllı malzemeler; ısı, nem, ışık, manyetik alan veya pH gibi harici bir uyarana maruz kaldığında kontrollü ve işlevsel bir şekilde fiziksel veya kimyasal özelliklerde değişiklik gösteren malzemeler olarak tanımlanırlar (69). Böylece, 4B basılmış yapı, bu uyaran türlerine yanıt olarak şeklini, rengini, işlevini veya diğer fiziksel veya kimyasal özelliklerini değiştirebilir. 4B basım ile üretilen yapılar, malzemenin akıllı özelliği sayesinde üretim sonrası fazladan yapılması gereken işlemleri ve ekstra cihaz kullanımı ihtiyacını ortadan kaldırabilir ve üretim süresini kısaltabilir. Örneğin, *in-vivo* uygulama öncesi daha basit şekillerde üretilen doku iskeleleri, implantasyon sonrası gerekli karmaşık şekle kendi kendine ulaşabilir. Bu yolla karmaşık yapıların üretim süreci kolaylaşıp hızlandırılabilir (70).

3B basım teknikleri biyomalzeme ve doku mühendisliği alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Hastaya özel şekil ve organizasyona sahip yapılara olan ihtiyaç, 4B basım tekniğinin bu alanlara uyarlanmasına ilham kaynağı olmaktadır. Mevcut uyarıların hangi malzemeleri nasıl etkilediği konusu bilinmektedir. Limitli sayıdaki malzeme ve uyarıların geliştirilmesi, çoklu uyarılara cevap verebilen yeni malzemelerin geliştirilmesi süreci popüler bir araştırma konusu olarak devam etmektedir (71).



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kas dokusunun nispeten küçük yaralanmalar için kendini tamir mekanizması bulunsa da büyük hacimli kas kaybının gerçekleştiği durumlarda, kas kaybının yaşandığı bölgede fonksiyonel olmayan bir yara dokusu oluşur. Günümüzde bu sorun için uygulanan tedaviler çoğunlukla otolog kas transferi ile mümkündür (5–8). Doku mühendisliği alanında bu tedaviye alternatif bulma çalışmaları gün geçtikçe artmaktadır. Genel yaklaşım, hücre taşıyan biyo-uyumlu bir iskenin laboratuvar ortamında üretilmesi, olgunlaştırılması ve otolog kas transferinin yerini almasıdır (13).

Doğal dokuların embriyonik gelişim sürecinde kendilerine has geometrileri elde ettikleri mekanizmalar oldukça karmaşıktır ve halen açıklanmaya muhtaçtır. Bu karmaşık yapının birebir fabrikasyon sürecinde üretilmesi için günümüzdeki teknolojilerin yetersiz kaldığı açıktır. Bu nedenle son on yılda pek çok üretim stratejisi geliştirilmiştir. Bilgisayar kontrollü tasarım desteği ve bunun katmanlı şekilde üretiminden meydana gelen 3B basım tekniği de bunlardan biridir. Her ne kadar karmaşık modeller bilgisayar desteğiyle tasarlanabilse de 3B olarak basılabilmelerinin pek çok zorluğu bulunmaktadır. Son yıllarda yeni bir konsept olarak ortaya çıkmış olan 4B basım kavramı, karmaşık şekilleri, 3B basılan daha basit bir şekilden akıllı malzemeler yoluyla elde etmeyi amaçlar (14,72).

Kendinden katlanma ve 4B basım ile ilgili literatür incelenmiş ve bu öncü çalışmaların çoğunun biyolojik uygulamalar için uygun olmadığı görülmüştür. Bu çalışmalarda şekil değişiminin kontrolü çoğunlukla yüksek enerjili UV (ultra viyole) (73) ya da IR (kızıl ötesi) lazer (74) kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Bazı çalışmalarda ise hidrojellerde 40°C üstü sıcaklıklarda hareketin kontrol edilebildiği rapor edilmiştir (75,76). 4B biyo-basım çalışması başlığında yapılan yayınlarda ise kullanılan hidrojellerin hücre etkileşimlerinin yeterince iyi olmaması nedeniyle hücre canlılığı ve yayılımında başarılı olunamamıştır (77). Bu taramalardan elde edilen veriler ışığında 4B basımı yapılması planlanan taşıyıcı iskenin; (i) düşük sıcaklıkta duyarlı olması, (ii) çapraz bağlama reaktiflerinin toksik olmaması (iii) hücreleri tutunma çoğalma ve yayılma süreçlerinde desteklemesi beklenmektedir.

Bu beklentiler ışığında, bu tez çalışmasında;

- a) Sıcaklık-duyarlı bir hidrojel olan N-izopropilakrilamid (NIPAm)'in ışık aydınlatması yoluyla şekil değişimi kontrol edilmiş ve bu stratejinin kavram kanıtı uygulamalı olarak gösterilmiştir.
- b) Manyetik bir substrat üzerine 3B olarak basılan bir biyomürekkep üretilmiş ve bu substratın manyetik alan etkisinde katlanması ile iskelet kas dokusunun kendine has iç içe geçmiş hücre tabakalarına benzer bir modeli üretilmiştir.

Bu tez çalışmasında; doğal kas dokusu hiyerarşisinde bulunan iç içe hücre tabakalarına benzer bir taşıyıcı iskele modeline 4. boyut katlaması ile ulaşılması hedeflenmiştir. Bu hedefe ulaşmak için seçilen sentetik ve doğal polimerler, sentezlenme süreçleri, üretim yöntemleri ve hücre etkileşimleri analiz edilmiştir. Elde edilen verilerden 4B basım ile fonksiyonel iskelet kası dokusu üretimi için bir strateji geliştirilmesi amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Kullanılan C2C12 fare miyoblast hücre hattı ATCC (ABD) şirketinden alınmış olup devam pasajları kullanılmıştır. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları.

Pasaj no	Hücre hattı	Hücre adı	Kullanılan besiyeri katalog numaraları	Besiyeri özelliği	Ortam içeriği
3	C2C12	Fare miyoblast	Biological Industries, Ref.No: 01-052-1A, Lot.No: 2204092	Çoğaltma	DMEM (yüksek glukoz) içinde %10 FBS %1 P/S
5	C2C12	Fare miyoblast	Biological Industries, Ref.No: 01-050-1A, Lot.No: 2121432	Farklılaştırma	DMEM (düşük glukoz) içinde % 1 FBS % 1 P/S % 9 At Serum

Tez çalışması kapsamında iki farklı taşıyıcı iskele sistemi üzerinde çalışılmıştır. Bunlardan ilki, sıcaklık duyarlı N-izopropilakrilamid (NIPAm) malzemesinin kullanıldığı çalışma, *ACS Applied Polymer Materials* dergisinde yayınlamış olan *Folding Control of Hydrogel Platforms through Pattern Design and Light Illumination* başlıklı yayınumuza konu olmuştur. Materyal ve Yöntem başlıklarında anlatılan çalışmalardaki veri ve ilustrasyonların bazıları bu yayında kullanılmış olup, tarafımdan üretilmişlerdir.

Sıcaklık duyarlı taşıyıcı iskele çalışması kapsamında; N-izopropilakrilamid (NIPAm) %97, akrilamid (AAm), N,N'-metilenbis(akrilamid) (MBAm) %99, amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) %99,5 Sigma Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır ve alındığı haliyle kullanılmıştır. 3B yazıcıda üretilen kalıplar için polilaktik asit (PLA) filamentler eSUN'dan (Çin) temin edilmiştir. Su bazlı akrilik boyalar Südor (Türkiye) şirketinden satın alınmıştır.

Manyetik alan etkisiyle hareketlendirilen taşıyıcı iskele çalışması kapsamında; Tip A domuz derisi jelatini, metakrilik anhidrit (MAA) %94, sodyum aljinat (orta viskozite), 1-vinyl-2-pyrrolidone (V2P), Eosin Y (EY), aljinat liyaz (10,000 unites/g), Triton X-100, Sigma Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır. Trietanolamin (TEA) Merck'ten (Almanya) temin

edilmiştir. SnakeSkin™ diyaliz tüpü (10K MWCO, 22 mm), AlamarBlue solüsyonu ve aktin-çekirdek boyaması için Phalloidin (Alexa Fluor 488)-DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ThermoFisher (ABD)'den satın alınmıştır. Miyojenik farklılaşma analizi için primer antikor anti-MyoD1 (Abcam-ab16148) (İngiltere)'den, sekonder antikor Goat anti-Mouse (Alexa Fluor® 488) (ABD)'den temin edilmiştir. 3B basım çalışması için kullanılan plunger, iğne ucu ve diğer gerekli sarf malzemesi EnvisionTech (Almanya) şirketinden satın alınmıştır. EcoFlex silikon rubber ve kütleme kiti paket olarak Smooth-On şirketinden (ABD) temin edilmiştir. Manyetik substrat üretimi için 5 µm karbonil demir tozu (%99,5) Nanokar (Türkiye)'den satın alınmıştır. (3-Aminopropil) trietoksisilan (APTES) Sigma Aldrich (ABD)'den temin edilmiştir. Hücre kültürü sarf malzemeleri olarak DMEM (yüksek ve düşük glikoz) besiyeri, fetal bovin serum (FBS), bovin serum albümin (BSA), penisilin-streptomisin (P-S), at serumu (HS) ve tripsin Biological Industries (İsrail) şirketinden, OCT Tissue-Tek bileşiği Sakura (ABD)'den temin edilmiştir.

4.2. YÖNTEM

Bu bölümde tez çalışması kapsamında araştırılan iki farklı taşıyıcı iskele sisteminin yöntemi kendi başlıkları altında verilecektir. İlk çalışmada, sıcaklık duyarlı bir malzeme olan NIPAm'ın uygun koşullar altında kendiliğinden tübüler bir yapı oluşturma potansiyeli incelenmiştir. İkinci çalışmada ise ilk çalışmadan elde edilen bilgiler ışığında fare miyoblast hattı hücrelerinin içerisinde tutunup farklılaşabileceği, doğal kas ECM'inin de kompozisyonunda bulunan jelatin malzemesinin kimyasal modifikasyonu ve bu malzemeden üretilen taşıyıcı iskelenin hareketlendirilmesi için manyetik alan kuvveti yardımıyla fiziksel manipülasyonu anlatılmaktadır.

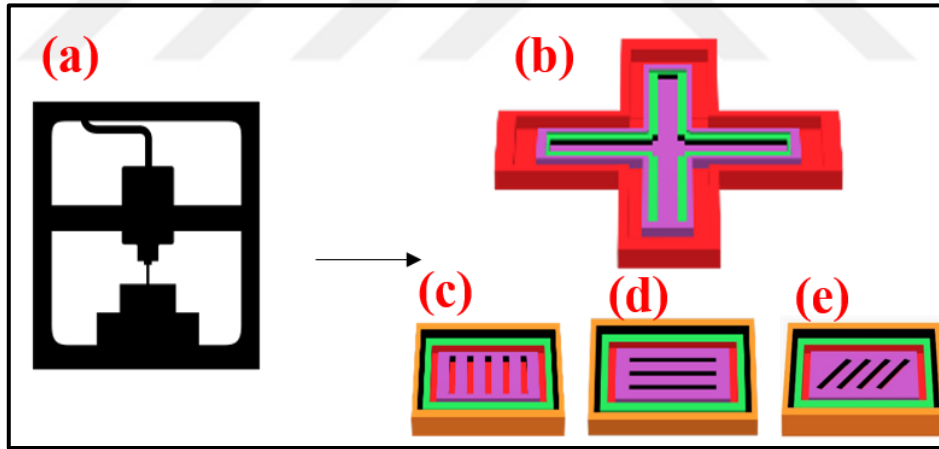
4.2.1. SICAKLIK DUYARLI HİDROJEL PLATFORMU ÜRETİMİ

Bu çalışmada, sıcaklığa duyarlı renkli bir desen, sıcaklığa duyarlı ara katman ve pasif (tepki vermeyen) katmandan oluşan üç katmanlı bir polimerik platform, platformların katlanma kabiliyetini manipüle etmek için kontrollü bir şekilde tasarlanmış ve üretilmiştir. Renklendirme reaktifleri olarak farklı renklerde akrilik boyalar kullanılmıştır. Aktif katmanlar üzerindeki desen tasarımları ve renkleri kontrol edilerek platformların katlanma kabiliyeti manipüle edilmiştir. Ek olarak, ortama konulan bir hedef numunenin platform tarafından yakalanmasını ve hareketini kontrol etme yeteneği gösterilmiştir.

4.2.1.1. 3B Yazıcı ile Rehber Kalıpların Üretilmesi

Bu çalışmada, kalıplar ilk olarak bir tasarım yazılımı aracılığıyla (3D Builder, Microsoft, ABD) tasarlanmış ve PLA filamentleri kullanılarak 3B yazıcı ile üretilmişlerdir (Şekil 4.3. (a)). Platformlar üzerindeki desen sayısı eşit aralıklarla tüm yüzeyi kaplayacak şekilde belirlenmiştir (Şekil 4.3. (b)). V5 modelinde beş adet lineer çizgi X eksenine göre 90°'lik bir açıyla yerleştirilirken, H3 modelinde X eksenine paralel üç lineer çizgi yerleştirilmiştir. D4 modeli için desenler (dört parça) X eksenine 120°'lik bir açıyla entegre edilmiştir.

3B basılmış kalıplar Şekil 4.1.'de görüldüğü üzere, doldurma yönüne göre ters şekilde dizayn edilmişlerdir. Yani hidrojel platform, kalıptan çıktıktan sonra en üstte kalan katman kalıp dizaynında en önce doldurulan kısımdır. Kalıpların modelleri ilk olarak 3D Builder yazılımı (Microsoft, ABD) kullanılarak çeşitli desenlerle oluşturulmuştur ve Cura yazılımı (Ultimaker, Hollanda) kullanılarak G kodlarına dönüştürülmüştür. G kodları 3B yazıcıların üretilen dizaynı tanıyıp basmasına yarayan kodlardır. Kalıplar daha sonra PLA filamentleri kullanılarak bir Ultimaker2+ 3D yazıcı ile basılmıştır. Baskı parametreleri; 0,4 mm nozıl çapı, 50 mm/s baskı hızı ve %5 dolgu yoğunluğu olarak belirlenmiştir.

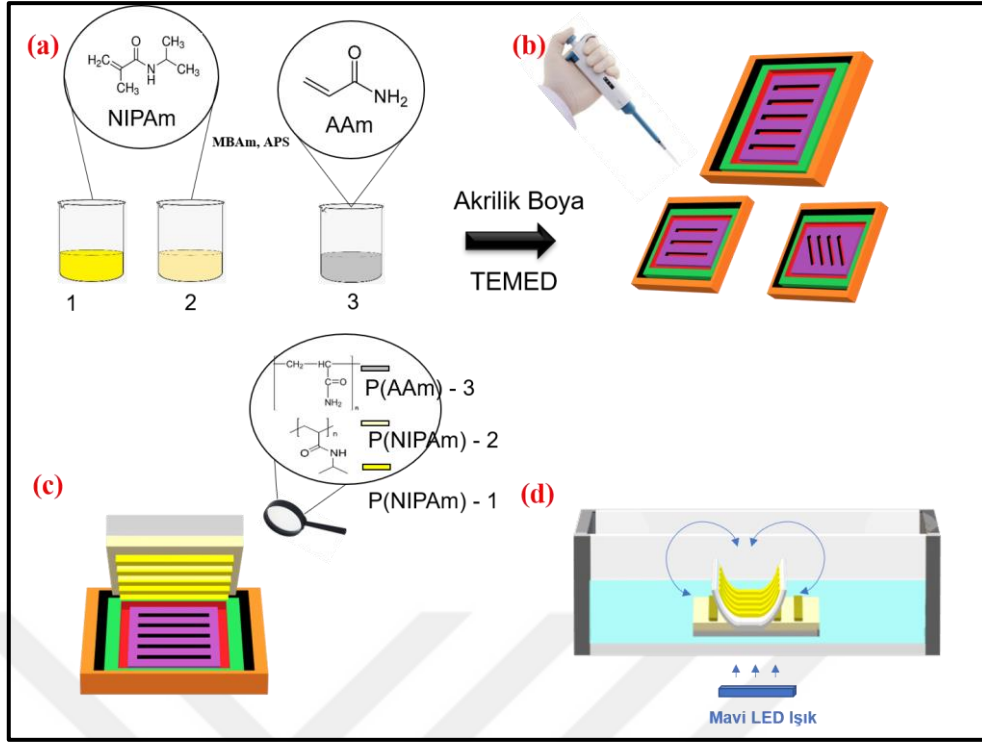


Şekil 4.1. 3B basılmış kalıp modelleri. (a) 3B yazıcı, (b) model FA, (c) model V5, (d) model H3, (e) model D4.

4.2.1.2. P(NIPAM) ve P(AAM)'nin Hazırlanması

Üç katmanlı hidrojellerin üretimi için, poli-N-izopropilakrilamid P(NIPAm) ve poli-akrilamid P(AAm) hidrojelleri, kalıplar içinde ardışık bir şekilde serbest radikal polimerizasyon tekniği kullanılarak sentezlenmiştir. MBAm çapraz bağlayıcı olarak seçilmiştir; APS ve TEMED de sırasıyla başlatıcı ve hızlandırıcı olarak kullanılmışlardır.

Sıcaklık duyarlı katmanlar için önce NIPA (0,4 g) ve MBAm (10 mg) birlikte 4 ml distile su içerisinde birlikte, APS (47 mg) ise 2 ml distile su içinde ayrıca çözülmüştür. Bu solüsyonlar kalıplara dökülmeden 15 dk. önce 2:1 oranında karıştırılmıştır (Şekil 4.2. (a-1)). Kalıp doldurma yönüne göre ilk önce sıcaklığa duyarlı desenli katman üretilmiştir. Bu katman için hazırlanan NIPA-APS (2:1) çözeltisine, kalıplara dökülmeden 5 dk önce, çeşitli renklerde (sarı, kırmızı, yeşil) %1'lik, %3'lük ve %5' (h/h)'lik akrilik boyalar eklenmiştir ve bu karışım yavaşça pipetlenerek polimer çözeltisinin homojen şekilde renklendirilmesi sağlanmıştır. Bu karışıma %0,1 (h/h)'lik TEMED ilave edildikten sonra hızlı bir şekilde kalıplara dökülmüştür. Bu işlemin püf noktası; TEMED ilavesinin ardından saniyeler içinde polimerin kalıptaki yerini almasıdır. Aksi takdirde homojen bir polimerleşme meydana gelmemektedir. Reaksiyon oda sıcaklığında 15 dakikada tamamlanmaktadır. Homojen bir polimerleşmenin başarılmasının ardından, kararlı ve çapraz bağlanmış sıcaklık duyarlı ve renkli bir katman oluşmuş olur. Bu desenli katmanlar sarı, kırmızı ve yeşil renklerde üretilmiştir. Bu aşamadan sonra desenli katman ile sabit katmanın birbirine bağlanmasını sağlayan renksiz orta katman üretilmiştir. En başta hazırlanmış olan NIPA ve APS solüsyonları yine dökümden 15 dk önce 2:1 oranında karıştırılmıştır ve aynı şekilde dökümden hemen önce %0,1 (h/h)'lik TEMED solüsyonu ile karıştırılarak kalıplara renkli desenlerin üzeri kaplanacak şekilde kalıptaki yerine dökülmüştür. Ardından oda sıcaklığında 15 dk'lık yeni bir beklemin ardından ısıya duyarlı katmanların çapraz bağlanması tamamlanmıştır.



Şekil 4.2. Hidrojel platformun kalıplanması şematik gösterim. (a) P(NIPAm) ve P(AAm)’nin sentezi. (b) Kalıplara doldurma. (c) Kalıptan çıkarma. (d) Işıkla aktive etme yöntemiyle platformun hareket kontrolü.

Pasif katmanın üretimi için AAm (1 g), MBAm (5 mg) ve APS (10 mg) 5 ml distile su içinde çözünmüştür (Şekil 4.2. (a-3)). Daha sonra bu karışıma dökümden hemen önce TEMED (%0.1 h/h) eklenmiş ve hızlı bir şekilde önceden çapraz bağlanmış aktif katmanların üzerine kalıptaki yerine dökülmüştür. Bu katmanın çapraz bağlaması oda sıcaklığında 30 dakika içinde tamamlanmıştır. Toplam bir saat sonunda, tüm reaksiyonlar tamamlanmış ve hazırladığımız katmanlar homojen şekilde birbiri üzerine çapraz bağlanmıştır.

Hazırlanan hidrojel platformu kalıptan kolay çıkarabilmek adına oda sıcaklığında 30 dakika damıtılmış suda bekletilmiştir. Kalıptan çıkartıldıktan sonra katmanların elde edilen yapısı Şekil 4.2. (c)’deki gibidir; yapının alt katmanı pasiftir (duyarlı olmayan; P(AAm)) ara katman sıcaklığa duyarlıdır (P(NIPAm)) ve üst katman renkli ve sıcaklığa duyarlıdır (P(NIPAm)).

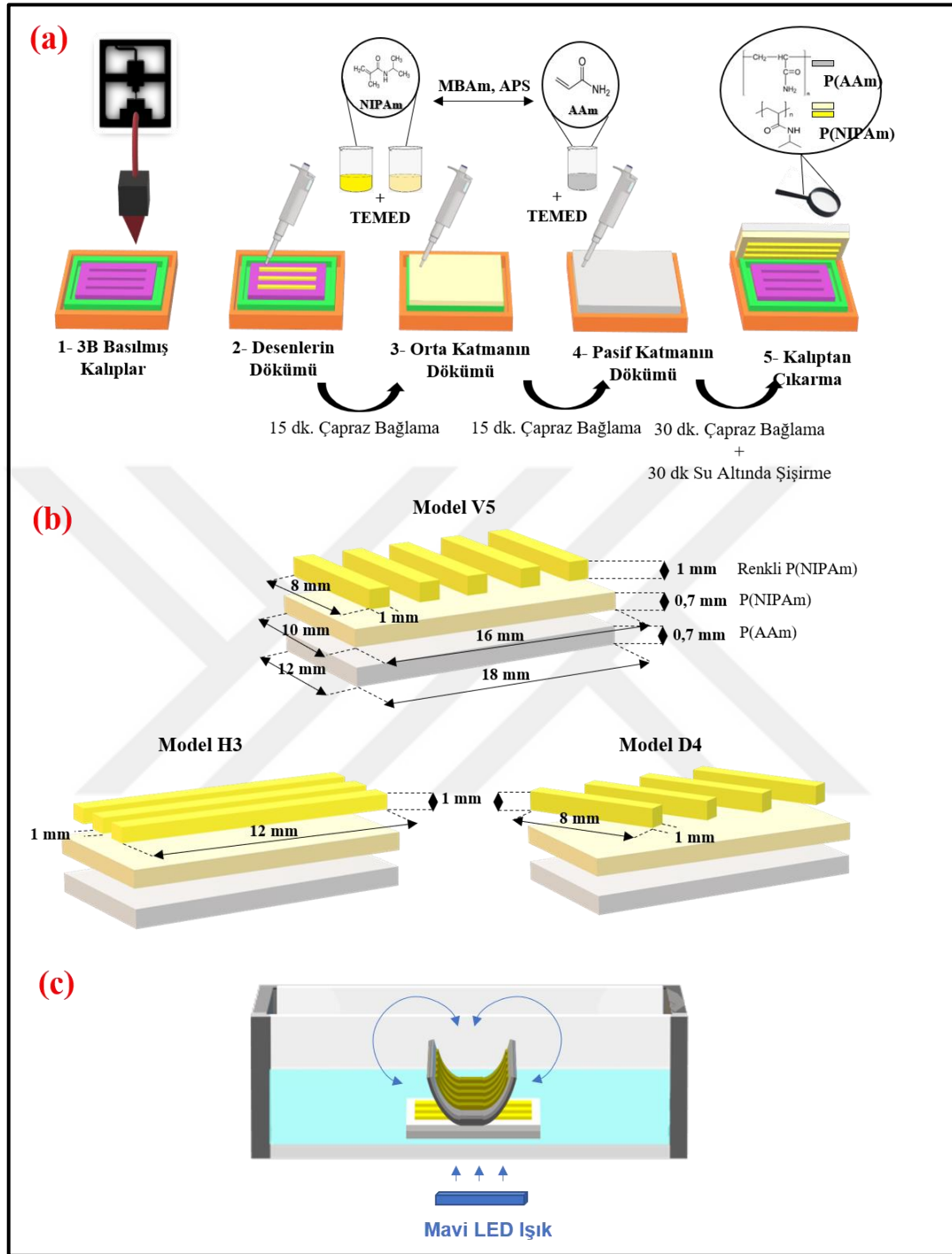
Üretim sürecinin ardından, sıcaklığa duyarlı hidrojelleri aktive etmek ve katlanmalarını kontrol etmek için Şekil 4.2. (d)’de gösterildiği şekliyle hidrojel platformları mavi bir LED ışık (470 nm, 50 W) ile uyarılmıştır. Tüm araştırmalar için ışık kaynağı ile platform arasındaki mesafe ~10 cm’de, aydınlatma açısı ise 90°’de sabit tutulmuştur.

4.2.1.3. Hücre Kültürü

Üretilen hidrojel platformlarının hücre etkileşimleri incelenmek üzere V5 modelinde bir örnek üzerine C2C12 hücreleri ekilmiştir. Hücre çoğaltma prosedürü 4.2.2.10 bölümünde anlatıldığı şekliyle gerçekleştirildikten sonra hücreler tripsin yardımıyla flasklardan ayrılmış taze besiyeri içerisinde yeniden dağıtılıp sayıldıktan sonra örnek başına 200.000 hücre olacak şekilde mikropipet yardımıyla örneklerin üzerine ekilmiştir. Daha sonra bu örnekler 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına alınmış ve hücrelerin yüzeye tutunmasını beklemek için 1 saat boyunca inkübe (37°C, %5 CO₂) edilmiştir. 1 saat sonunda üzerlerine 4 ml çoğaltma besiyeri konularak yeniden inkübatöre (37°C, %5 CO₂) kaldırılmıştır. Hücre kültürü 7 gün boyunca sürdürülmüştür. Her 48 saatte bir besiyeri tazelesiyle değiştirilmiştir.



Baştan sona tüm fabrikasyon ve uyarım-katlama süreci bir arada Şekil 4.3.'de özetlenmiştir.



Şekil 4.3. Üç katmanlı hidrojel platformları için üretim sürecinin şematik gösterimi. (a) 3D yazıcı ile kalıpların basılması (1). Desenlerin renkli P(NIPAm) (2) ile, ara katman renksiz P(NIPAm) (3) ve pasif katman P(AAm) (4) ile doldurulması. Çapraz bağlamadan sonra hidrojel platformlarının kalıptan çıkarılması (5). (b) Kalıptan çıkarma işleminden sonra üretilen hidrojellerin farklı modellerinin katman boyutları. (c) Hidrojel platformun su altında mavi ışık ile uyarılması.

4.2.2. 4B BASIM İLE ÜRETİLEN TAŞIYICI İSKELE SİSTEMİ

4.2.2.1. Jelatin Metakrilat (GELMA) Sentezi

Jelatin metakrilat (GELMA) literatürde farklı pek çok yöntemle sentezlenebilmektedir. Yapılan çalışmalarda öne çıkan en önemli parametrenin pH kontrolü olduğu görülmektedir. Çalışmamızda literatürde en fazla referans verilen iki çalışma baz alınarak iki farklı reçetede GELMA sentezi yapılmıştır (Şekil 4.4.).

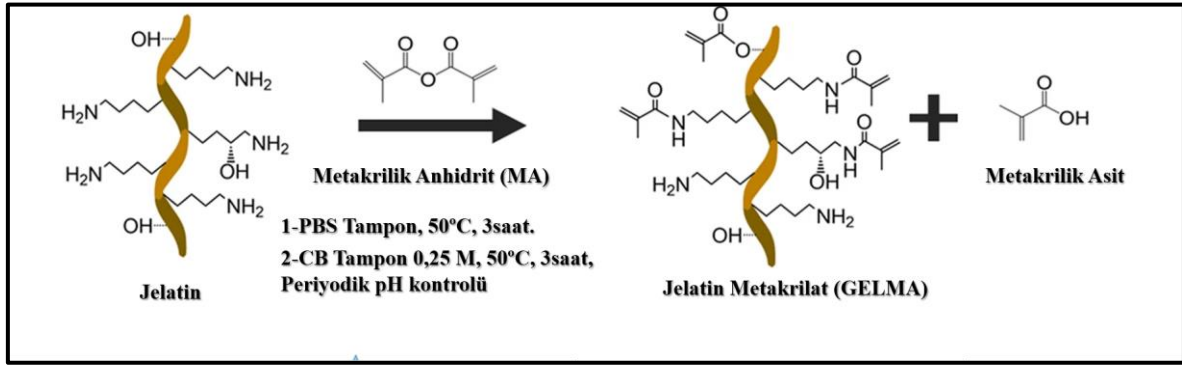
4.2.2.1.1. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) Kullanılarak GELMA Sentezi

Tip A domuz derisi jelatini, 60°C'ye ısıtılmış fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile %10 (a/h) oranında tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcı da karıştırılmıştır. Tam çözünme sağlandıktan sonra çözelti sıcaklığı 50°C'de sabitlenmiştir ve 1000 rpm karıştırma altında 0,8 ml/gram-jelatin MAA, 0,5 ml/dk. hızla hedef hacme ulaşılan kadar çözeltiye damla damla eklenmiştir. Daha sonra çözelti 3 saat boyunca 1000 rpm karıştırma hızı ve 50°C sıcaklık ile reaksiyona bırakılmıştır. 3 saat sonunda çözelti, 40°C'ye ısıtılmış PBS ile 5 kat seyreltilmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. Tuzların ve reaksiyona girmemiş metakrilik asitin uzaklaştırılması için çözelti 4 gün boyunca 40°C'de SnakeSkin™ diyaliz tüpü (10K MWCO, 22 mm) kullanılarak distile suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz prosesi sonunda çözelti 4 gün boyunca -50 °C'de dondurularak kurutma (liyofilizasyon) işlemine tabi tutulmuş ve kullanıma kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (78).

4.2.2.1.2. Karbonat-Bikarbonat Tamponu (CB) Kullanılarak GELMA Sentezi

Tip A domuz derisi jelatini, %10 (a/h) oranında 60°C'ye ısıtılmış pH:9, 0.25M CB tamponu içerisinde çözünene kadar manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Tam çözünme sağlandıktan sonra çözelti sıcaklığı 50°C'de sabitlenmiştir ve 500 rpm karıştırma altında 0,1 ml/gram-jelatin MAA, 0,5 ml/dk. hızla hedef hacme ulaşılan kadar çözeltiye damla damla eklenmiştir. 3 saatlik reaksiyon süresince her saat başı pH kontrol edilerek 9'a ayarlanmıştır. 3 saat sonunda pH 7.4'e ayarlanarak reaksiyon durdurulmuştur. Tuzların ve reaksiyona girmemiş metakrilik asitin (MA) uzaklaştırılması için çözelti 4 gün boyunca 40°C'de SnakeSkin™ diyaliz tüpü (10K MWCO, 22 mm) kullanılarak distile suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz prosesi sonunda çözelti 4 gün boyunca -50 °C'de dondurularak kurutma

(liyofilizasyon) işlemine tabi tutulmuş ve kullanıma kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir (79).



Şekil 4.4. Jelatin metakrilat (GELMA) sentezinin şematik gösterimi (79).

4.2.2.2. Foto-Çapraz Bağlanabilir Biyomürekkebin Hazırlanması

4B basım çalışmasının, 3B basım ayağında kullanacağımız biyomürekkebin polimer kompozisyonu, baskı kalitesini etkileyen en önemli parametredir. Basılabilirlik (ing. printability), çapraz-bağlama fonksiyonunu ve hücre yaşabilirliğini optimize edebilmek için Çizelge 4.2.’de gösterildiği şekliyle çeşitli kompozisyonlar denenmiştir. Bunlar; ağırlıkça %10’luk foto-çapraz bağlanabilir GELMA çözeltisi (GELMA10), ağırlıkça %10’luk GELMA / %1’lik aljinat çözeltisi (GELMA101), ağırlıkça %20 GELMA çözeltisi (GELMA20) ve ağırlıkça %20 GelMA/%1 aljinat çözeltisi (GELMA10201) olarak hazırlanmıştır.

Çizelge 4.2. Deney grupları ve kullanılan konsantrasyonlar.

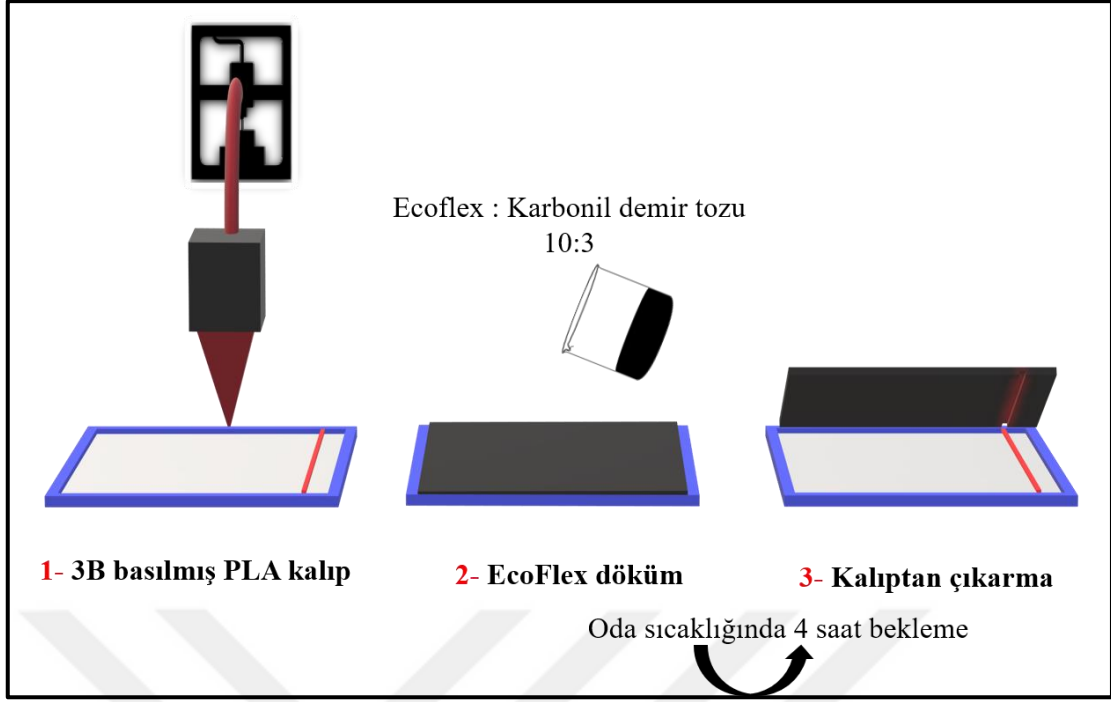
Kod	GELMA (% a/h)	Aljinat (% a/h)
GELMA10	10	-
GELMA20	20	-
GELMA101	10	1
GELMA10201	20	1

Biyomürekkebin hazırlanmasında EY ve TEA görünür ışık dalga boyunda (470nm) bir ışığa maruz bırakıldığında modifiye edilmiş polimer üzerindeki metakrilat kısımlarının serbest radikal polimerizasyonunu başlatacak bir foto-başlatıcı / eş-başlatıcı sistemi için, V2P ise

polimerizasyon sürecinin hızlandırılması için kullanılmıştır (80). GELMA %12,5 ve %25 (a/h) oranında olacak şekilde %1.875 (h/h) TEA, %1.25 (h/h) V2P ve olası bakteri kontaminasyonunu engellemek için %1 (h/h) penisilin-streptomisin (P-S) içeren distile su içerisinde çözünmüştür. EY 0,5 mM'lik bir konsantrasyonda olacak şekilde ayrı bir distile su içerisinde hazırlanmıştır. Bu çözeltiler 4:1 (GELMA:EY) oranında karıştırılmış ve böylelikle %10'luk ve %20'lik foto-çapraz bağlanabilir GELMA çözeltileri elde edilmiştir (77). %1 (a/h) aljinat içeren çözeltiler ise bu hazırlanmış olan %10 ve 20%'lik GELMA çözeltileri içerisinde sodyum aljinat tozunun çözünmesi ile hazırlanmıştır.

4.2.2.3. Manyetik Substratların Üretimi

Manyetik substratlar üzerine basılacak hidrojel baskı sonrasında manyetik alan yardımıyla tübüler bir şekle sokulması için kullanılmıştır. Bu nedenle, üretilen her bir substratın aynı kalınlık ve ölçülerde olması gerekmektedir. Ayrıca; yaptığımız denemelere göre, her bir örneğin her defasında aynı biçimde katlanabilmesi için substrat üzerinde bir katlayıcı boyun olması gerektiği belirlenmiştir. Bu amaçlarla, sitotoksik etkisi olmayan, kolaylıkla kürlenebilen ve esnek bir malzeme olan EcoFlex (silikon rubber) ve manyetik etki için paslanmaya karşı korumalı 5 µm parçacık boyutuna sahip karbonil demir tozları kullanılarak uygun bir substrat üretilmiştir. EcoFlex, kürleyicisi ile karışmadan önce oda sıcaklığında akışkan bir yapıya sahiptir. Bu sayede istenilen ölçü ve tasarımda bir substrat üretmek için manyetik parçacıklı EcoFlex karışımı 3B yazıcıda basılmış bir kalıp içerisinde kürlenmiştir. Şekil 4.5.'de şematik olarak gösterildiği üzere, EcoFlex silikon rubber ve kürleyicisi oda sıcaklığında 1:1 (a/a) oranında karıştırılmıştır, bu karışıma ağırlıkça %30 (a/a) oranında şekilde karbonil demir tozu ilave edilmiş ve homojen bir şekilde dağılana kadar spatula ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım, 3D Builder yazılımı ile tasarlanıp Ultimaker 3B yazıcısı ile PLA filamentler kullanılarak basılmış olan kalıplara dökülmüş ve oda sıcaklığında 4 saat boyunca kürlenmeye bırakılmıştır. Kürlenmiş malzemeler kalıplardan cımbız yardımıyla ayrılmıştır.



Şekil 4.5. EcoFlex manyetik substratın üretimi.

4.2.2.3.1. Manyetik Substratların Yüzey Modifikasyonları

Silikon rubber yüzeylerin hidrofobik olmaları nedeniyle üzerlerine viskozitesi düşük bir polimerin basımı oldukça zordur. Bu engeli aşabilmek için üretilmiş olan substratların yüzeyleri UV-Ozon uygulaması ve APTES ((3-Aminopropil) trietoksisilan) bağlaması ile hidrofilik hale getirilmiştir. Kürlenmiş örnekler 30 dk. boyunca UV-Ozon temizleyicisinde tutulmuş ve daha sonra saf etanol içerisinde hazırlanmış %3'lük (h/h) APTES çözeltisine daldırılarak oda sıcaklığında 24 saat boyunca bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler sırasıyla, %70'lik etanol ve distile suyla yıkanmıştır. Hazırlanan örnekler baskı zamanına kadar 4 °C'de bekletilmiştir.

4.2.2.3.2. Temas Açısı Ölçümü

Manyetik substratlar üzerinde oda sıcaklığında distile su kullanılarak su temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Numuneler hareketli bir sahneye yerleştirildikten sonra bir mikro şırınga kullanılarak filmin yüzeyine yaklaşık 5 µl distile su damlatılmıştır. Temas açıları değerleri bir Temas Açısı Ölçüm Aleti (CAM 100, KSV) kullanılarak ölçülmüştür. Her numunenin 4 farklı noktasından ölçümler yapılmıştır. Kontrol grubu olarak cam ve teflon örneklerden de aynı şekilde temas açısı ölçümü yapılmıştır.

4.2.2.4. 4B Basım Prosedürü

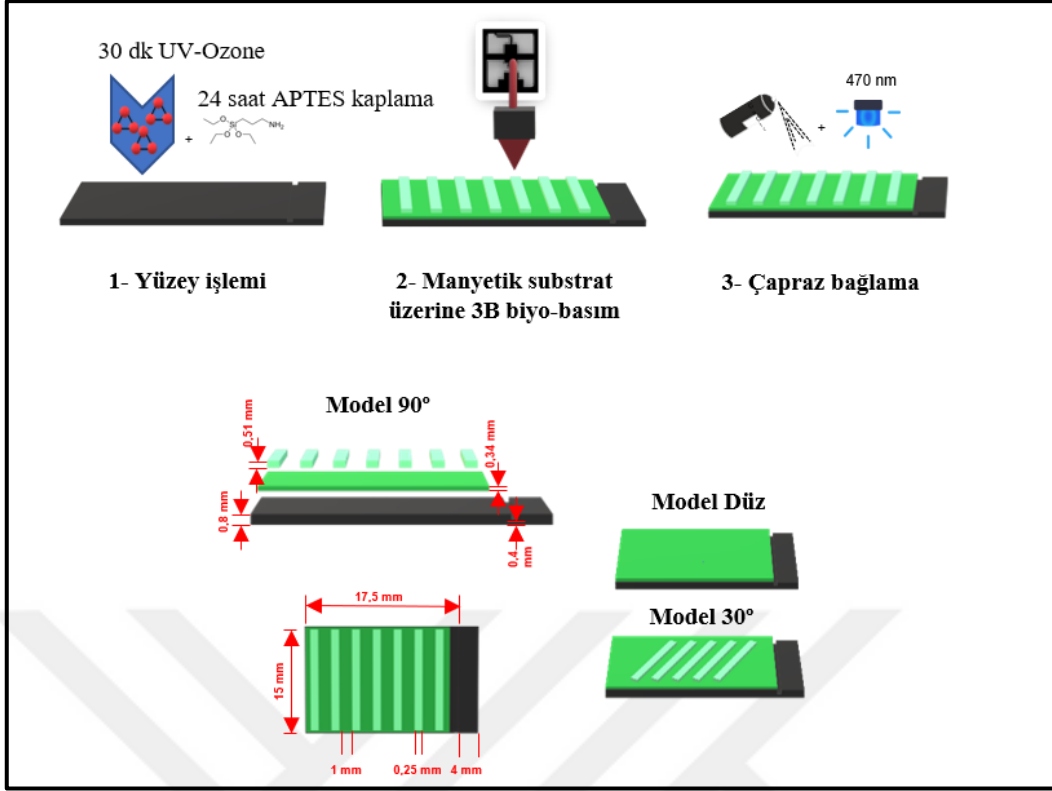
Bu çalışmada, Çizelge 4.2.'de tarif edilen 4 farklı hidrojel karışımı 4B basım için kullanılmıştır. Bunlardan aljinat malzemesini içermeyen hidrojeller GELMA10 ve GELMA20 için basım parametreleri; basınç 0,5 bar, katman kalınlığı 0,17 mm, baskı hızı 30 mm/sn olarak ayarlanmıştır. Diğer hidrojeller GELMAlg101 için basınç 0,9 bar, katman kalınlığı 0,17 mm, baskı hızı 25 mm/sn ve GELMAlg201 için ise basım parametreleri; basınç 1,2 bar, katman kalınlığı 0,17 mm, baskı hızı 17 mm/sn. olarak ayarlanmış olup tüm örneklerde basım için kullanılan iğne ucu iç çapı 0,21 mm (27Ga) olarak ayarlanmıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. 4B basım baskı parametreleri.

Kod	Basınç (bar)	Katman kalınlığı (mm)	Baskı hızı (mm/sn)	İğne iç çap (mm)
GELMA10	0,5	0,17	30	0,21
GELMA20	0,5	0,17	30	0,21
GELMAlg101	0,9	0,17	25	0,21
GELMAlg201	1,2	0,17	17	0,21

Tüm hidrojeller için basım, Envisiontech 3D Bio-plotter (Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm basımlar için robotik kafa sıcaklığı, cihazın robotik kafa için izin verdiği en düşük sıcaklığı olan 25°C'ye ayarlanmıştır. Baskı alınan tablanın sıcaklığı ise 17 °C ve 23 °C olarak iki farklı ayarda gerçekleştirilmiştir. Tüm hidrojeller üretilen manyetik substratlar üzerine basılmıştır. Her bir grup hem yüzey işlemi uygulanmamış hem de yüzey işlemi uygulanmış substratlar üzerine belirtilen tabla sıcaklıklarında basılmıştır.

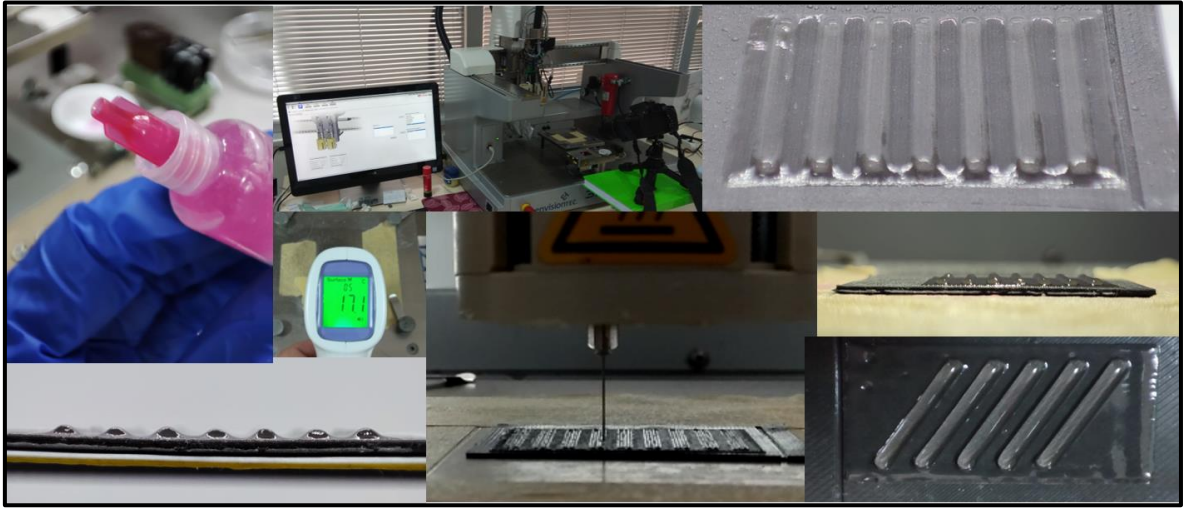
Hücrelerin farklı desenler üzerindeki davranışını gözlemlemek için manyetik substrat üzerine basılan hidrojeller üç farklı modelde basılmışlardır. Modeller ve ölçüler Şekil 4.6.'da verilmektedir.



Şekil 4.6. Manyetik substrat üzerine 3B hücre yüklü hidrojin basım süreci. (1) Temas açısını düşürmek için uygulanan yüzey işlemleri. (2) 3B biyo-basım. (3) Çapraz bağlama. Basılan farklı modeller ve ölçüler.

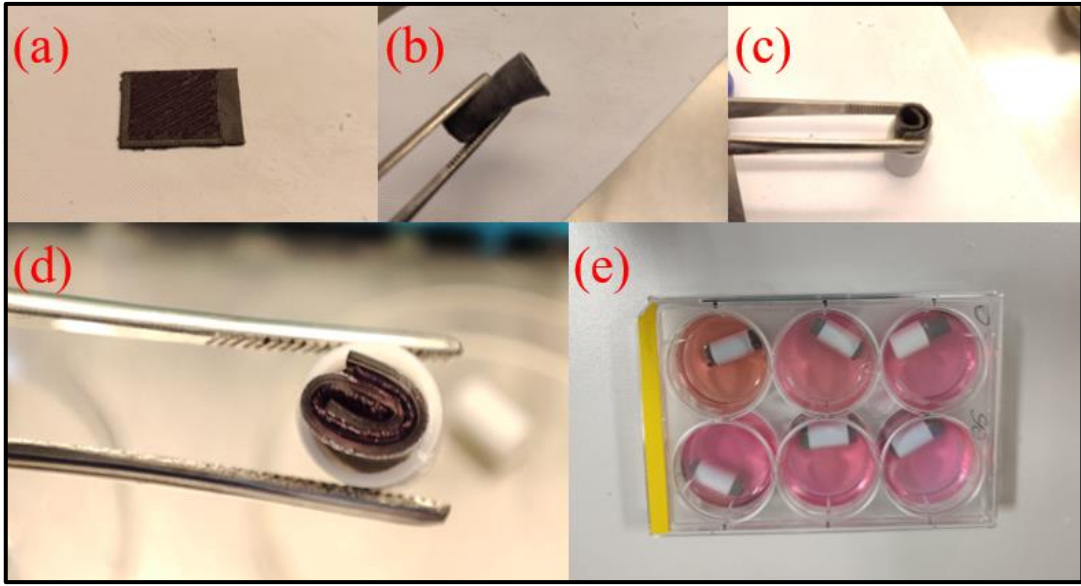
Basım yapılacak hidrojel çözeltisi, Bölüm 4.2.2.2.'de anlatıldığı şekliyle, steril bir şekilde hazırlanmıştır; GELMA ve aljinat tozları 30 dk. boyunca UV ışık altında bekletilerek steril edilmiş olup, sıvı durumdaki diğer malzemeler distile su içerisinde çözüldükten sonra 0,22 micron filtreden geçirilerek steril hale getirilmişlerdir. 3B yazıcıda kullanılacak olan plunger, iğne ucu, şırınga gibi aletlerin tümü 1 saatlik %70 etanol banyosunun ardından UV ışık altında kurutularak steril hale getirilmişlerdir. Tüm birleştirme ve doldurma işlemleri laminar akış kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hidrojel çözeltisi doldurulmuş yazıcı şırıngasının iğne ucu takma ve doldurma bölümleri parafilm ile itinayla sarılmıştır. Daha sonra üzeri pleksiglas bir kabinle örtülüp 1 saat boyunca UV'lenen 3B yazıcının robotik kafasına yerleştirilmiş ve basıma hazır hale getirilmiştir. Diğer yandan, baskı altlığı için kullanılacak olan manyetik substratlar %70 etanol içerisinde 1 saat bekletildikten sonra UV ışık altında kurutularak steril edilmişlerdir. Steril petriler içerisinde 3B yazıcı kabinine transfer edilen substratlar, UV ışık ile steril edilmiş olan 3B yazıcı baskı tablası üzerine yerleştirilerek basıma hazır hale getirilmiştir. Tüm yerleştirmeler tamamlandıktan sonra, robotik kafa sıcaklığı 25°C'ye, baskı tablası sıcaklığı ise 17°C ve 23°C'ye ayarlanmıştır.

Şırınga ve substratların belirlenen sıcaklıklara ulaşmasının ardından basım işlemi başlatılmıştır. Basım işlemi tamamlandıktan sonra 50 W, 470 nm dalga boyuna sahip mavi LED ışık kullanılarak GELMA, 0,25 M steril CaCl_2 çözeltisi kullanılarak da aljinat çapraz bağlaması yapılmıştır. Çapraz bağlama işleminde bu iki yöntem, birinci ve ikinci sırada kullanılmıştır. Mavi ışığın önce kullanıldığı çalışmada; baskı sonrası 17°C 'deki tabla üzerinde 5 cm uzaktan 1 dk boyunca mavi LED ışık ile GELMA, hemen ardından 4°C , 0,25M CaCl_2 püskürtmesi ile aljinat çapraz bağlaması sağlanmıştır. CaCl_2 'ün önce kullanıldığı çalışmada; baskı sonrası 4°C , 0,25M CaCl_2 püskürtme ile aljinat çapraz bağlaması yapılmış ve 5 dk'lık beklemeden sonra soğuk tabla üzerinde 5 cm uzaktan 1 dk boyunca mavi LED ışık ile GELMA çapraz bağlaması yapılmıştır. GELMA101 ve GELMA1201 örnekleri bu şekilde çift çapraz bağlama ile jelleştirilmiştir.



Şekil 4.7. 3B basım ve kayıt düzeneği ile başarılı basımlardan oluşan kolaj.

Basım işleminin tamamlanmasının ardından, örnekler steril petri kabı içerisinde laminar akış kabinine taşınmıştır. Şekil 4.8.'de anlatıldığı şekliyle, steril ortamdaki örnekler 1 cm kalınlığında bir platform üzerine konulmuştur. Platformun altında hareket ettirilen bir mıknatıs yardımıyla örnek üzerinde manyetik alan oluşturulmuş ve manyetik substratın katlama boynu tarafından örnek rulo şekline getirilmiştir. Manyetik alanın kaldırılmasından sonra cımbızla tutulan rulo halindeki örnekler, kültür esnasında açılmamaları için 3B yazıcıda basılmış PLA tutucular içerisine yerleştirilmiş ve 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında hücre kültürü için hazırlanmışlardır.



Şekil 4.8. Basım sonrası örneklerin katlanması. Örneklerin (a) manyetik alan üzerine yerleştirilmesi, (b) katlanarak rulo haline getirilmesi, (c) PLA tutucu içine yerleştirilmesi, (d) yerleştirme sonrası görüntü ve (e) hücre kültürüne hazırlık.

4.2.2.5. Aljinat Liyaz Uygulaması

3B basılabilirliğin artırılabilmesi ve katlama aşamalarında gereken mekanik dayanımın sağlanabilmesi için yapıya eklenmiş olan aljinat, çapraz bağlama ve katlama işleminin ardından hidrojel matrisi içerisindeki hücre yayılımını artırabilmek için sistemden aljinat liyaz (AL) enzimi uygulaması ile çıkarılmıştır. Basımdan 24 saat sonra, basılıp katlanmış olan hidrojinin kültür ortamına 0,05 U/ml aljinat liyaz enzimi eklenmiştir. Örnekler 15 dk. boyunca CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiş ve ardından kuyucuklardaki kültür ortamı tazeyle değiştirilerek kültüre devam edilmiştir.

4.2.2.6. Şişme Oranı Ölçümü

Hidrojellerin sıvı emme kapasitesinin ölçümü için şişme (ing. swelling) oranı hesaplaması yapılmıştır. Bu deney için GELMAIg201 örneğinin aljinat liyaz enzimi uygulanmış ve uygulanmamış örnekleri kullanılmıştır. Şişme davranışını değerlendirmek için 4.2.2.4. bölümünde anlatıldığı şekliyle basılıp çapraz bağlanan hidrojeller iki gruba ayrılmıştır. Gruplardan birine 4.2.2.5. bölümünde anlatıldığı şekliyle aljinat liyaz uygulaması yapılmıştır. Elde edilen hidrojeller 5 dk. boyunca PBS tamponu ile yıkanmış ve ardından 24 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası örneklerin kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra örnekler 24 saat boyunca PBS içerisinde 37°C’de inkübe edilmişler ve sonrasında yaş ağırlıkları ölçülmüştür. Şişme oranı, şişirmeden sonraki kütle değerinin, liyofilizasyondan sonra kurutulmuş örneklerin kütle değerine oranı olarak tanımlanmıştır.

4.2.2.7. Mekanik Test

Hücreli çalışmalarda asıl olarak kullanılan hidrojel grubu GELMAIg201 mekanik karakterizasyon için kullanılmıştır. Hidrojelin elastiklik modülü ve doğal kas nişi ile olan yapısal uyumunun değerlendirilebilmesi için çekme testi uygulanmıştır. Örnekler aljinat liyaz uygulanmış ve uygulanmamış olarak iki grup altında incelenmiştir. Mekanik test cihazının (Shimadzu Autograph AGS-X) çeneleri arasına yerleştirilen örnekler (L_0 : 14 mm, Kesit alanı: 3 mm²) 50N kapasiteli yük hücresi kullanılarak 5mm/dk. hızla kopma noktasına kadar çekilmiştir. Elde edilen verilerden gerilme-gerinim eğrisi oluşturulmuş ve elastisite modülü (Young modülü) hesaplanmıştır.

4.2.2.8. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

SEM çalışması aljinat liyaz uygulaması öncesi ve sonrası hidrojinin morfolojisini ve porozitesini incelemek üzere yapılmıştır. Örnekler PIPES tampon kullanılarak yıkanmış ve -80°C’de bir gece bekletildikten sonra liyofilize edilerek kurutulmuştur. Daha sonra yüzeyleri altın kaplanarak Hacettepe Üniversitesi Hünitek merkezinde SEM görüntüleri alınmıştır.

4.2.2.9. Sitotoksosite Testi

EcoFlex malzemesinin kullanım kılavuzu malzemenin sitotoksik olmadığını belirtmiş olsa da içerisine karıştırdığımız demir tozu ve yüzey işlemleri için kullanılan kimyasallar göz önüne alınarak sitotoksosite deneyi yapılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak, sitotoksik etkisi olduğu bilinen Latex malzemesi kullanılmıştır ve örneklerle aynı şekilde muamele edilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak, standart çoğaltma besiyeri kullanılmıştır. APTES kaplaması yapılmış ve yapılmamış olan örnekler ile latex malzemesi, %70 etanol çözeltisi içerisinde 2 saat süreyle sürekli çalkalanarak steril edilmiş ve PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra, örnekler 50 ml kapasiteli steril falkon tüplere yerleştirilmiş ve üzerlerinde 15 ml ekstraksiyon sıvısı (hücre kültürü besiyeri) eklenmiştir. Tüpler 37°C’de 24 saat süreyle 60 rpm’de sürekli çalkalama altında tutulmuştur. 24 saat sonunda ekstraksiyon sıvısı 0,22 mikron filtreden geçirilerek steril 50 ml falkon tüpler içine toplanmıştır. Sıvı azot tankı içerisinde dondurulmuş olarak bulunan pasaj 20 L929 hücre hattı hücreleri çözülerek hücre kültür besiyeri içerisinde (yüksek glikozlu DMEM içerisinde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin) T175 flasklara alınmıştır. 24 saat boyunca standart kültür şartlarında (37°C, %5 CO₂) inkübatör içerisinde kültür edilen hücreler daha sonra tripsin uygulaması ile flasktan ayrılarak sayılmıştır. Hücreler 10.000 hücre/cm² konsantrasyonunda 12 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. 12 kuyucuklu kapların hücre tutunmasına uygun yüzey alanı 3,8 cm²’dir. 24 saat süreyle CO₂ inkübatörü içerisinde standart kültür şartlarında kültür edilen hücreler yaklaşık %70 doluluk durumuna ulaştığında, ekstraksiyon sıvıları 1 ml/kuyucuk olacak şekilde hücre tabakalarının üzerine eklenmiştir. Ekstraksiyon sıvılarının eklenmesinden 24, 48 ve 72 saat sonra hücre tabakasının yayılımı, ölü hücre miktarı ve hücre morfolojisindeki değişimler mikroskopik inceleme ile değerlendirilmiştir. 72 saat sonunda, kuyucuklarda bulunan canlı hücre sayısı 4.2.2.11. bölümünde anlatıldığı şekliyle Alamar Blue yöntemi ile belirlenmiştir.

Mikroskopik incelemeden elde edilen veriler, Çizelge 4.4.’de verilen değerlendirme kriterlerine göre notlandırılmıştır. İlk üç kriterden (hücre tabakasının yayılımı, ölü hücre miktarı ve hücre morfolojisindeki değişim) elde edilen notların ortalaması alınmıştır. Bu ortalama not, son kriterden (hücre büyümesi inhibisyonu) alınan not ile toplanarak 0-8 arasında değişen son sitotoksik cevap notunun elde edilmesinde kullanılmıştır (Çizelge 4.5.).

Elde edilen bu değer malzemenin biyoyumlu olup olmadığının değerlendirilmesinde kullanılmıştır (81).

Çizelge 4.4. Sitotoksisite testi değerlendirme kriterleri (81).

İnceleme	Değerlendirme Kriteri	Not
Hücre yayılımı	%100	0
	%90-100	1
	%60-90	2
	%30-60	3
	%0-30	4
Ölü hücre (yüzen hücre)	%0	0
	%0-5	1
	%5-10	2
	%10-20	3
	>%20	4
Hücre morfolojisinde değişim	Değişim yok	0
	Düşük seviyede değişim var	1
	Orta seviyede değişim var	2
	Yüksek seviyede değişim var	3
	Çok yüksek seviyede değişim var	4
Hücre büyümesi inhibisyonu	%0-10	0
	%10-30	1
	%30-50	2
	%50-70	3
	%70-100	4

Çizelge 4.5. Sitotoksik cevap notunun değerlendirilmesi (81).

Sitotoksik cevap notu	Reaktivite	“Malzeme Sitotoksiktir”
0-1	Yok	Hayır
1-3	Az	Hayır
3-5	Orta	Yeniden değerlendir
5-7	Yüksek	Evet
7-8	Çok Yüksek	Evet

4.2.2.10. Hücre Kültürü

Çalışmalarımızda ATCC (ABD) şirketinden satın alınmış olan C2C12 fare miyoblast hücre hattının devam pasajları kullanılmıştır. Çalışma öncesi laminar akış kabini 15 dk boyunca UV'lenmiş ve sonraki 15 dk boyunca da kendi kendine çalıştırılarak steril çalışma için hazır edilmiştir. Akabinde, 5 ml çoğaltma besiyeri bir falkon tüpe ayrılıp 37°C'ye ısıtılmıştır. Daha önceden kullanılıp pasaj 3'te dondurularak sıvı azot tankında muhafaza edilen hücreler, sıvı azot içerisinden alınıp 37°C'ye ısıtılmış olan besiyerinden alınan 1 ml'lik miktarlarla dondurma ependorfunun içerisinde yavaşça pipetlenerek çözülmüştür. 5 ml'lik tüm besiyeri kullanıldıktan sonra santrifuj edilmiştir. Üzerindeki 5 ml besiyeri döküldükten sonra dipteki hücre peleti 5 ml'lik taze besiyeri içerisinde yeniden dağıtılmıştır. Elde edilen süspansiyondan 20 µl alınmış ve 20 µl tripan blue boyası ile karıştırılmıştır. Tripan blue boyası ölü hücreleri boyamaktadır. Bu sayede yaşayan hücreler ışık mikroskobu altında boyanmamış olarak ayırt edilerek sayılabilmektedir. Hücre boya karışımından alınan 10 µl, hemositometre üzerine damlatılmış ve lamel ile kapatılmıştır. Işık mikroskobu altında yaşayan hücreler sayılmış ve elimizdeki 5 ml hacim içerisindeki hücre sayısı bu sayıya orantılanarak tespit edilmiştir. Santimetrekareye 5.000 hücre konsantrasyonu olacak şekilde T75 flask için yaklaşık 375.000 hücreyi içeren solüsyon 5 ml'lik hacimden ayrılmıştır. 30 dk. önceden içerisine 10 ml çoğaltma besiyeri konularak 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilen T75 büyüklüğündeki flask, laminar akış kabinine alınmıştır. Ayrılmış olan hücre süspansiyonu pipet vasıtasıyla T75 flask içerisindeki besiyeri içinde dağıtılmıştır. Daha sonra, yeterli hücre çoğalmasını sağlamak üzere, flask 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. İnkübe edilen hücreler 24-36 saat arasında %70 konflüansa ulaşmışlardır. Bu aşamada pasajlanan hücreler T175 büyüklüğünde flasklara alınarak gerekli sayıda hücreye ulaşılması sağlanmıştır. Besiyeri her 2 günde bir yenisi ile değiştirilmiştir.

T175 flasklarda %70 konflüansa ulaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve flask yüzeyi 10 ml steril PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından flaskta 2 ml tripsin konulmuş ve tüm yüzey kaplanana kadar hafifçe çalkalanmıştır. Ardından 5 dk boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. 5 dk sonra hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı ışık mikroskobunda teyit edilmiş ve flaskta 5 ml taze besiyeri ilave edilerek tüm yüzey bu sıvı kullanılarak yıkanmıştır. Besiyeri, tripsin ve hücrelerden oluşan bu süspansiyon serolojik pipet yardımıyla bir falkona

alınıp santrifuj edilmiştir. Santrifuj sonunda tripsin ve besiyeri dökülmüş, dipte kalan hücre peleti sayılmak üzere taze besiyeri içerisinde dağıtılmıştır.

Bölüm 4.2.2.2.'de anlatıldığı şekliyle, steril şekilde hazırlanan hidrojel çözeltisi laminar akış kabinine alınmıştır. Sayılan hücreler tekrar santrifüjlenmiş ve elde edilen pelet 2×10^6 / ml konsantrasyon olacak şekilde hidrojel çözeltisi içerisinde yeniden dağılmıştır. Homojen bir karışım sağlamak için hücre yüklü hidrojel çözeltisi 37°C'de 20 dk boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Sonrasında hücre yüklü hidrojel çözeltisi 3B yazıcı şırıngasına doldurulmuş ve basım için cihaza yüklenmiştir.

Bölüm 4.2.2.4.'de anlatıldığı şekliyle basım ve katlama işlemi gerçekleştirilen hidrojeller 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına alınmış ve üzerlerine 4 ml çoğaltma besiyeri konularak inkübatöre (37°C, %5 CO₂) kaldırılmıştır. 24 saat sonra örnekler inkübatörden çıkartılmış ve 4.2.2.5. bölümünde anlatılan aljinat liyaz uygulaması gerçekleştirilmiştir. Ardından örnekler üzerine taze farklılaştırma besiyeri konularak yeniden inkübatöre kaldırılmıştır. Hücre kültürü 7 gün boyunca sürdürülmüştür. İkinci günden itibaren her 48 saatte bir besiyeri tazeyle değiştirilmiştir.

4.2.2.11. Alamar Blue Hücre Canlılık Testi

Hücre kültürü süresince hidrojel içinde bulunan hücrelerin canlılık analizi Alamar Blue testi ile ölçülmüştür. Bu testte hidrojellerin içinde bulunduğu besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS tampon ile yıkanmıştır. 30 dk öncesinde renksiz düşük glikozlu DMEM içerisinde hacimce %10'luk olarak hazırlanan Alamar Blue çözeltisi 37°C'ye ısıtılmıştır. Isınan çözelti yıkanan örneklerin bulunduğu kuyucuklara 4 ml olacak şekilde konulmuştur. Örnekler 1 saat boyunca inkübatör (37°C ve %5 CO₂) içerisinde karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda her kuyucuktan 200 ml test örneği alınmış ve 96 kuyucuklu mikrolakalara aktarılmıştır. Her bir örnek için 3 biyolojik ve 3 teknik replika kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikrolaka, mikrolaka okuyucusuna yerleştirilmiş ve 570nm-595nm dalga boylarında absorbans okuması gerçekleştirilmiştir. Örneklerin bulunduğu 6 kuyucuklu kaplardaki Alamar Blue çözeltisi çıkarılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Akabinde kuyucuklara taze farklılaştırma besiyeri konularak kültüre aynı örneklerle devam edilmiştir. Alamar Blue testinin bu özelliği sayesinde 1. 4. ve 7. gündeki Alamar Blue testleri de aynı örneklerle

yapılabilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri C2C12 hücre hattı için belirlenmiş bir kalibrasyon eğrisi sayesinde yaklaşık hücre sayısına çevrilmiştir.

4.2.2.12. Hücre Morfolojisi ve Yayılımı

Hidrojel içerisindeki hücre morfolojisinin izlenebilmesi için örnekler 1. ve 7. günlerde Phalloidin/DAPI boyaması yapılmıştır. Yöntemde hücreler sırasıyla aktin filamentlerin görüntülenmesi için Phalloidin ve çekirdek görüntülenmesi için DAPI ile işaretlenmektedir. Boyama uygulanacak örnekler temiz kuyucuklara aktarılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Ardından üzerlerine %3,7 (a/h) derişimde formaldehit çözeltisi eklenmiştir. 90 dk süreyle oda sıcaklığında hafif çalkalama altında formaldehit ile fikse edilen örnekler daha sonra 2 defa 5'er dk süreyle PBS ile yıkanmıştır. Ardından boya geçirgenliğini artırmak için örnekler oda sıcaklığında 5 dk boyunca % 0,1 (h/h) derişimde Triton X-100 içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra spesifik olmayan bağlanmanın önlenmesi için %1'lik BSA ile 2 saat boyunca 37°C'de inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler %0,1'lik BSA içerisinde 1:1000 konsantrasyonda hazırlanmış Phalloidin çözeltisi eklenmiş ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübasyon yapılmıştır. Ardından örnekler PBS ile yıkanmış ve 5 dk boyunca oda sıcaklığında 1:1000 konsantrasyonda hazırlanmış DAPI çözeltisi ile muamele edilmiştir. Son olarak, örnekler tekrar PBS ile yıkanmış ve hücre morfolojisi ve yayılımı inverted floresan mikroskop (Zeiss Axio Observer Z1) altında görüntülenmiştir.

4.2.2.13. İmmünfloresan Boyama

C2C12 hücrelerinin miyojenik farklılaşmasının belirlenmesi için kas spesifik belirteç olan MyoD1 kullanılarak immünfloresan boyama gerçekleştirilmiştir. Boyamanın gerçekleştirilmesi için örnekler kültürün 7. günlerinde fikse edilmiştir. Kısaca, örnekler temiz kuyucuklara alınmalarının ardından PBS ile yıkanmış ve üzerlerine %3,7 (w/v) derişimde formaldehit çözeltisi eklenmiştir. 90 dk süreyle oda sıcaklığında hafif çalkalama altında formaldehit ile fikse edilen örnekler daha sonra 2 defa 5'er dakika süreyle PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyonun ardından örnekler, sırasıyla %15 sükröz, %30 sükröz ve %30 Sükröz : OCT (1:1) çözeltileri içerisinde 15'er dk süreyle çalkalamalı şekilde inkübe edilerek OCT bileşiği (Tissue-Tek, ABD) içerisinde gömülme için hazırlanmıştır. Gömme işlemi için örnekler plastik kalıpların dibine yerleştirilmiş ve üzerleri OCT ile doldurulmuştur. Daha sonra kalıplar kuru buz içerisinde bulunan bir kap içerisinde soğutulan etanolde bekletilerek

dondurulmuştur. Dondurulan örnekler, -80°C'de muhafaza edilmiştir. Boyama işleminden önce örneklerden steril cerrahi neşter ile 10 mm kalınlığında enine kesitler alınmıştır. Gömme malzemesinin iyice temizlenebilmesi için kesitler oda sıcaklığında PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında spesifik olmayan bağlanmanın önlenmesi için %1'lik BSA ile 2 saat boyunca 37°C'de inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında; fare anti-MyoD1 (1:100) antikoru %0,1 BSA içeren PBS içerisinde uygulanmıştır. Primer antikor ile bağlanma gece boyu (18 saat) 4°C'de inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan itibaren, kesitler her basamak sonunda PBS ile yıkanmıştır. Primer antikorların bağlanmasının ardından, florofor bağlı sekonder antikor 1:200 Goat anti-Mouse ile 4 saat oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Ayrıca, tüm kesitler hücre çekirdeklerinin işaretlenmesi için 1:1000 DAPI çekirdek işaretçisiyle boyanmıştır. 50 µm ölçekli görüntülerden ImageJ programı yardımıyla ortalama boyama yoğunluğu tespit edilmiş ve aynı bölgede sayılan hücre çekirdeği sayısına bölünerek hücre çekirdeği başına ortalama MyoD1 boyama yoğunluğu hesaplanmıştır.

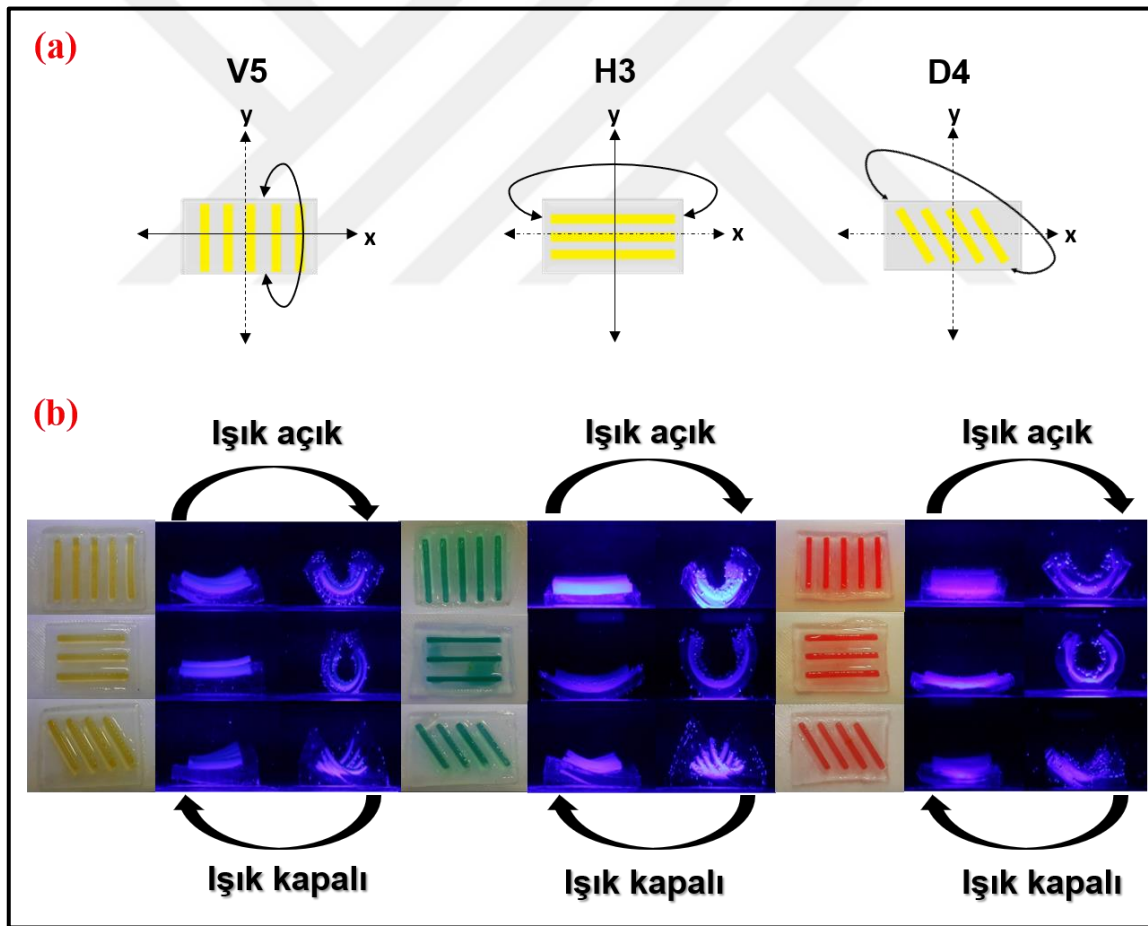
4.2.2.14. İstatistiksel Analiz

Tüm nicel sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3). Veriler, tek yönlü varyans (ANOVA) analizine dayalı olarak p değerinin 0,05'den küçük olduğu durumların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabulü ile analiz edilmiştir. Farklı gruplar arasındaki farkın anlamlılığının belirlenmesi için üç veya daha fazla grubun olduğu durumlarda Tukey testi, diğerlerinde t-test yapılmıştır. Analizler GraphPad Prism 6.0 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

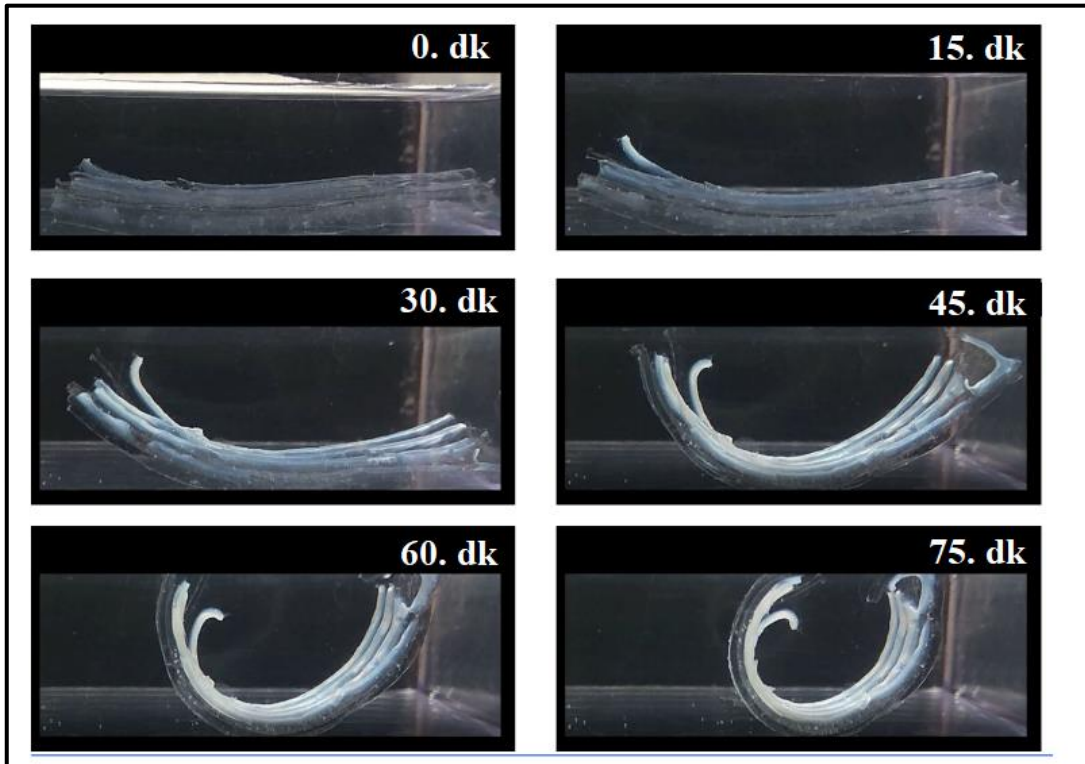
5.1. SICAKLIK DUYARLI HİDROJEL PLATFORMU

Şekil 5.1. (b), mavi ışıkla aydınlatmadan önce ve sonra sıcaklık duyarlı hidrojellerin katlanma davranışını göstermektedir. V5 modeli için katlanma hidrojin uzun kenarı boyunca gerçekleşirken, H3 modeli kullanılarak üretilen hidrojeller kısa kenarları boyunca katlanmışlardır. D4 modeli kullanılarak elde edilen hidrojel platformları ise mavi LED ile aydınlatıldıktan sonra desen ekseninin geçtiği köşelerinden katlanarak sarmal benzeri bir morfoloji oluşturmuştur (Şekil 5.1. (a)). Platformlardaki katmanların kalınlığının, katlama işleminde önemli bir rol oynadığına dikkat edilmelidir. Daha kalın pasif P(AAm) katmanı ($>0,7$ mm) veya daha ince aktif P(NIPAm) katmanı ($<1,0$ mm) üretildiğinde, ortaya çıkan platformlar herhangi bir katlanma yeteneği sergilememiştir.



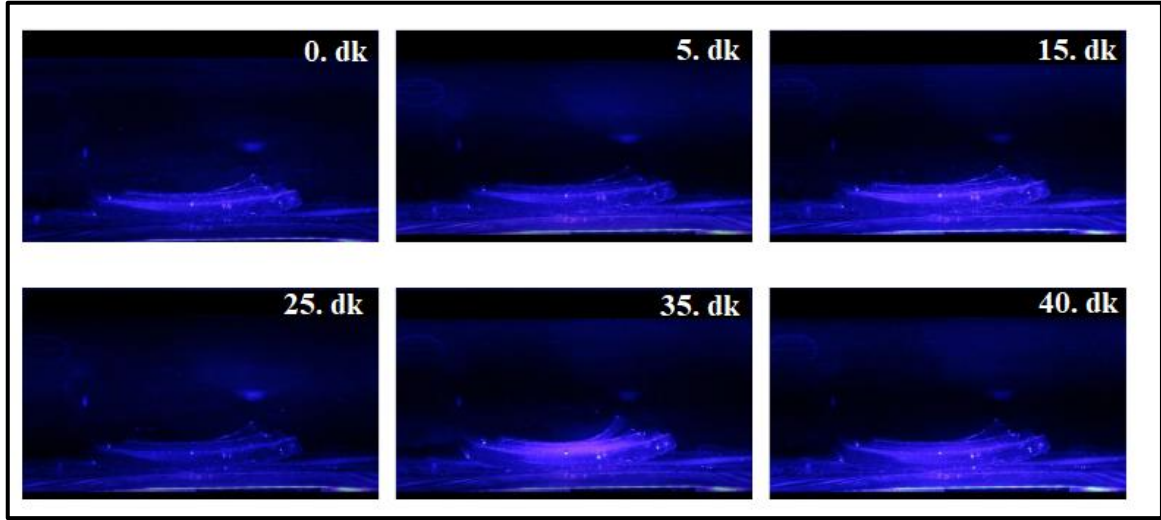
Şekil 5.1. (a) Desenler tarafından belirlenen katlanma eksen. (b) Mavi bir LED ile aydınlatmadan önceki ve sonraki katlanma durumu.

Benzer şekilde, platformlar doğrudan su ortamı içinde ısıtıldıklarında ($\sim 40^{\circ}\text{C}$) kontrollü katlanma yerine rastgele büzülme davranışı göstermişlerdir (Şekil 5.2.).



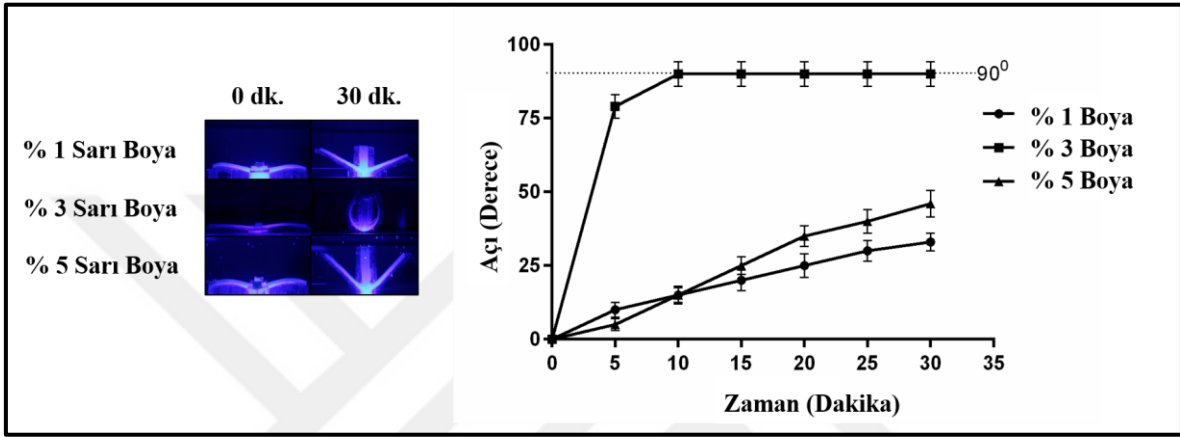
Şekil 5.2. Üç katmanlı örneklerin direkt olarak ısıtıldığı deneyden alınan periyodik fotoğraflar.

Renklendirilmemiş desenlerin kullanıldığı çalışmada ise ışık, desenlerde ve platformun içinde olduğu ortamda LCST'yi aşacak bir ısı üretememiş ve katlanma gerçekleşmemiştir (Şekil 5.3.). Bu özelliği test etmek için herhangi bir boya içermeyen üç katmanlı bir hidrojel platform üretilmiştir. Boya kullanılmadan platformların sıcaklık değişimi termal kamera (FLIR E5) kullanılarak izlenmiştir. Beklenildiği gibi, platformların ve ortamın sıcaklığı 40 dakikalık ışık aydınlatmasından sonra 23°C 'ten sadece ~25°C'ye yükselmiştir ve LCST'nin uzağında kalmıştır.



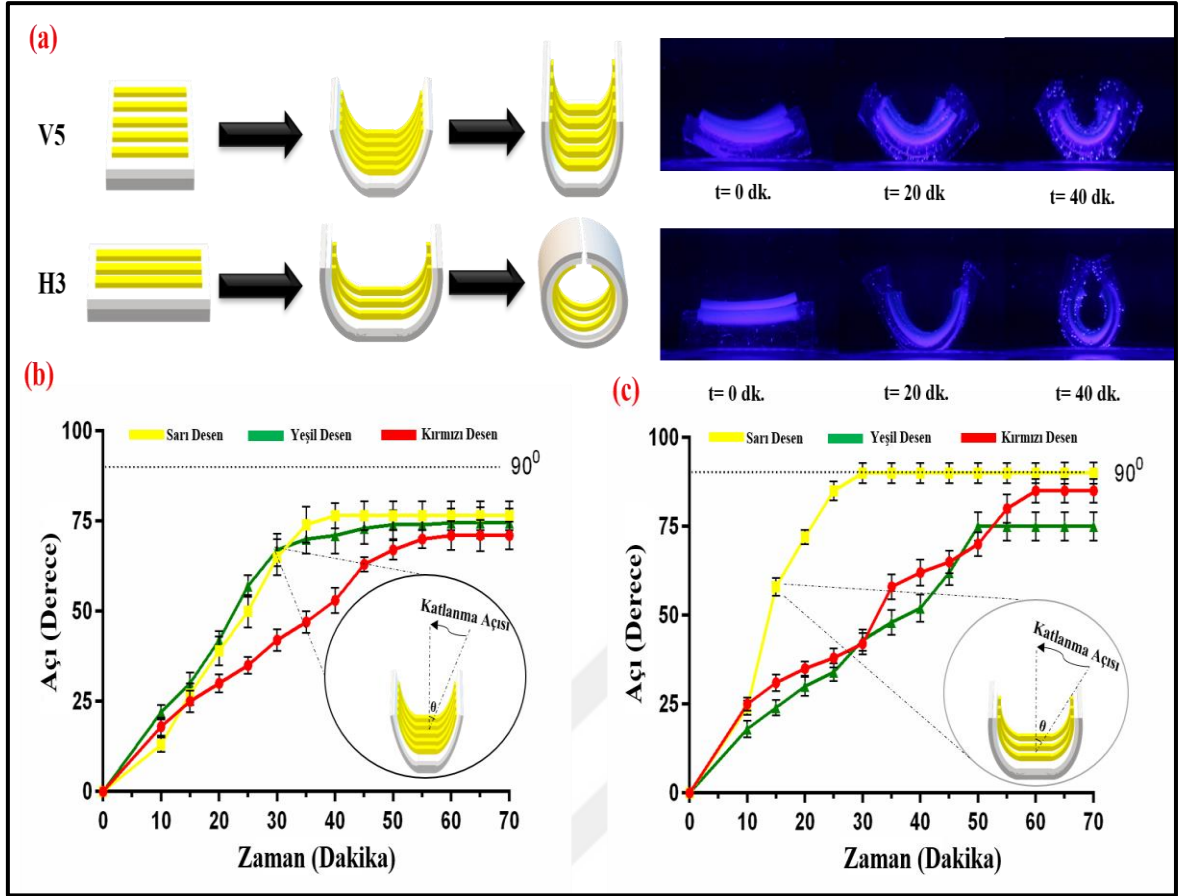
Şekil 5.3. Üç katmanlı renksiz örneklerin mavi LED ışık aydınlatması altında alınmış olan periyodik fotoğrafları.

Renklendirme için ne kadar boyanın daha etkili olacağını tespit edilebilmesi için çapraz bağlanacak polimer miktarının içerisine hacimce %1, %3 ve %5 olacak şekilde farklı hacimlerde boyalar konularak zamana karşı katlanma açısı incelenmiştir. %1 ve %5 derişimlerde eklenen boyalar 30 dakikalık deney sonucunda yeterli katlanma açısına ulaşamazken, %3 derişimde boya içeren örnek diğer örneklere göre anlamlı şekilde daha hızlı bir tepki süresine sahip olmuştur. Bu örnekle yapılan deneyde tam katlanma yaklaşık 10 dakikada tamamlanmıştır (Şekil 5.4.).



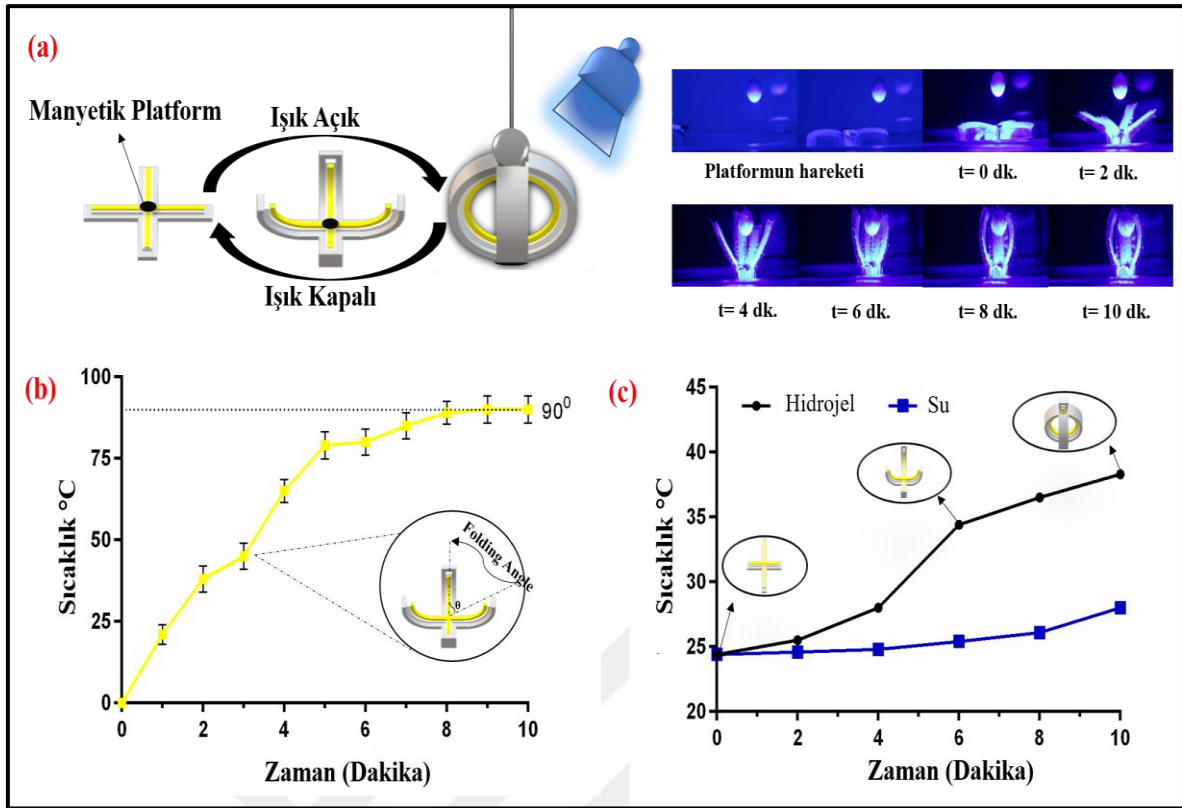
Şekil 5.4. Farklı derişimlerde boyanın hidrojel katlanma açısı ve tepki zamanına etkisi.

Üretilen hidrojellerin katlanma kabiliyetini daha iyi anlamak için V5 ve H3 model platformlar detaylı olarak incelenmiştir. Desen rengine ve geometrisine bağlı olarak hidrojel platformları farklı katlanma davranışları sergilemiştir (Şekil 5.5. (a)). V5 model tabanlı platformlar için desen renginin katlama üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Sarı ve yeşil renkli desenlerle karşılaştırıldığında, kırmızı renkli platformlar çok daha düşük ve daha yavaş katlama sergileyebilmiştir. Diğer yandan, V5 model tabanlı platformların hiçbirisi tam katlanmaya yani 90° katlanma açısına ulaşamamıştır. 40 dk sonra, hidrojel platformlar arasında en iyi katlanma kabiliyetini gösteren sarı renk desenli platformlar ancak $\sim 77^\circ$ katlanma açısına ulaşabilmiştir (Şekil 5.5. (b)). H3 model tabanlı platformlar incelendiğinde, V5 tabanlı platformlara kıyasla desen renklerine bağlı olarak katlama kabiliyetlerinin anlamlı bir şekilde farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Kırmızı ve yeşil boya ile renklendirilen platformlar 60 dk'da tam katlanmaya ulaşamazken, sarı boya ile renklendirilen platformlar ~ 30 dk içerisinde tam katlanmaya ulaştı (Şekil 5.5. (c)). Sonuçlarımız hem desen geometrisinin hem de desen renginin katlama işleminde önemli bir rol oynadığını ve hidrojel bazlı malzemelerin katlanma kabiliyetinin farklı platform tasarımı veya farklı renklendirmeler kullanılarak manipüle edilebileceğini göstermektedir.



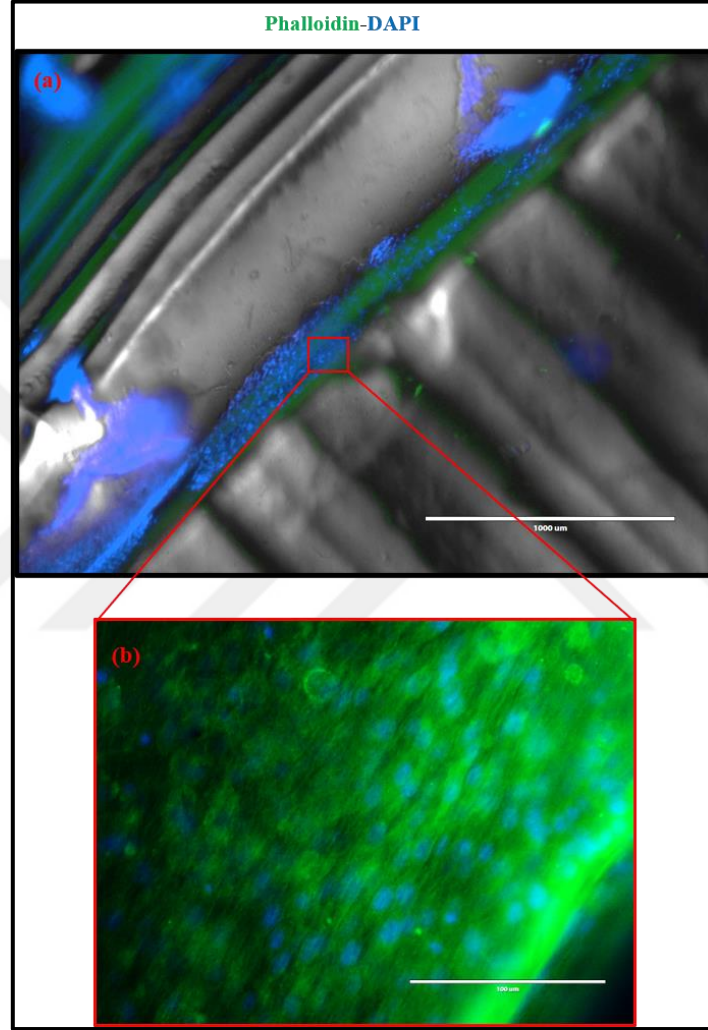
Şekil 5.5. (a) Mavi Led ışık aydınlatması altında kendi kendine katlanan hidrojellerin şematik gösterimi ve videodan alınmış periyodik fotoğraflar. (b) Zamana karşı V5 modeli için katlama açılarının değişimi. (c) Zamana karşı H3 modeli için katlama açılarının değişimi.

Üretilen konseptin doğrulamasını yapabilmek için bir uygulama deneyi tasarlanmıştır. Burada amaç, önceki bölümlerde anlatılan dizayn mantığı ile dört kollu bir hidrojel platform üretilip hem hareketini hem de katlanmasını kontrol ederek hedef noktadan bir numuneyi yakalamaktır. Hidrojel platformunun hareketini kontrol etmek için üretim sırasında hidrojin içerisinde kalacak bir manyetik film (2 mm x 2 mm, 0,4 mm kalınlık) tasarımın tam ortasına yerleştirilmiştir. Manyetik film, bir manyetik alan yardımıyla platformların hareketini sağlamıştır. Hedef numune olarak bir strafor top (~1 cm çapında) kullanılmıştır. Tüm deneyler su altında gerçekleştirilmiştir. Deneyde, dört kollu hidrojel platformu ilk olarak manyetik alan kontrol edilerek hedefi yakalayabileceği noktaya ulaştırılmıştır ve hedef noktada ışık kaynağı kullanılarak platformların kolları kapatılmış ve hedef numunenin yakalanması sağlanmıştır (Şekil 5.6. (a)). Katlama, ışık aydınlatması ile hidrojel platformu hedef noktaya ulaşır ulaşmaz başlatılmıştır ve 10 dk'da tamamlanmıştır (Şekil 5.6. (b)). Katlama işlemi sırasında hidrojin ve ortamın sıcaklığı termal kamera ile izlenmiştir. İşlem sonunda platformun sıcaklığı ~38°C'ye ulaşmasına rağmen ortam sıcaklığı ~26°C'de sabit kalmıştır (Şekil 5.6. (c)).



Şekil 5.6. Manyetik filmli dört kollu hidrojel platformlarının (Model FA) şematik gösterimi. Örneğin manyetik alan etkisinde hareketi ve hedefi yakalamasının videodan alınan fotoğrafları. (b) Zamana karşı dört kollu platformlar için katlanma açılarındaki değişimi. (c) Zamana karşı sıcaklık ve katlama açısı arasındaki ilişki.

Hidrojel platformu üzerine ekilen hücrelerin morfolojisi incelenmek üzere kültürün 7. gününde, Phalloidin ve hücre çekirdeği (DAPI) boyaması yapılmıştır. Ekim esnasında tüm yüzeyi kaplayacak şekilde bir hücre ekimi yapılmış olsa da hücreler sadece desen aralarında ve hidrojin kıyı ve köşelerine yığılmış şekilde gözlenmektedir. En üst yüzey olan PNIPAm desenler üzerinde tutunmuş bir hücre tabakası gözlenmemektedir.

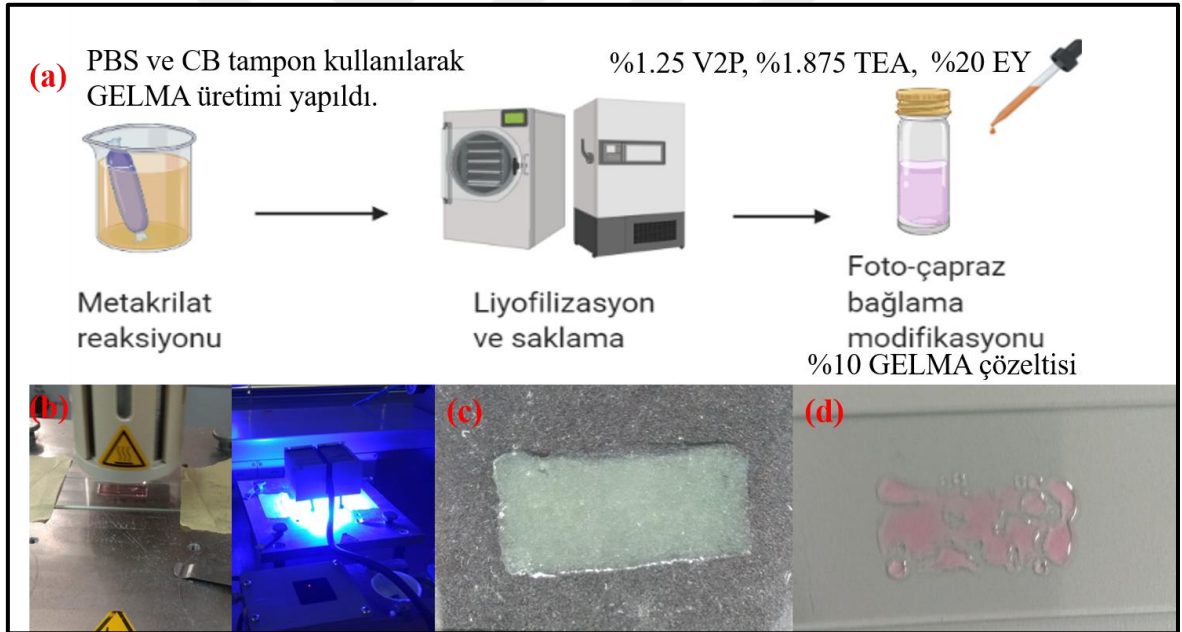


Şekil 5.7. Hidrojel platformu üzerine ekilen hücrelerin 7. günde Phalloidin-DAPI boyama görüntüleri. (a) Ölçek 1 mm, (b) Ölçek 100µm.

5.2. 4B BASIM İLE ÜRETİLEN TAŞIYICI İSKELE SİSTEMİ

5.2.1. GELMA ÜRETİM BULGULARI

PBS ve CB tamponu kullanılarak üretilen foto-çapraz bağlanabilir GELMA çözeltileri, hangi reçetenin daha iyi çalıştığını ölçmek için 3B yazıcıda basılmış ve 50W, 470 nm dalga boyuna sahip mavi LED ışıkla 1 dk. süreyle muamele edilmişlerdir (Şekil 5.8. (a,b)). Hücre canlılığının yüksek enerjili ışıktan zarar görmemesi için 1 dk'dan fazla ışıkla muamele tavsiye edilmemektedir. 1 dk'lık muamele sonrası, foto-çapraz bağlama modifikasyonunun ve GELMA konstrasyonunun aynı tutulduğu her iki reçete arasında Şekil 5.8. (c) ve (d) 'de görüldüğü şekliyle bir fark oluşmuştur. CB tamponu ile üretilen GELMA ürünü 1 dk'lık maruziyet sonunda tamamen çapraz bağlanarak rijit bir yapı meydana getirirken, PBS tamponu ile üretilen GELMA ürününün foto-çapraz bağlanmasının tamamlanmadığı ve basılan şeklin korunamadığı izlenmiştir.



Şekil 5.8. GELMA üretimi. (a) Üretim özet. (b) 3B basım ve ışıkla çapraz bağlama. (c) CB tamponu kullanılarak üretilmiş GELMA'nın 1 dk. ışıkla çapraz bağlama sonrası alınmış fotoğrafı. (d) PBS tamponu üretilmiş GELMA'nın 1 dk. ışıkla çapraz bağlama sonrası alınmış fotoğrafı.

Ayrıca, her iki reçete için yapılan 3'er farklı metakrilat reaksiyonu sonrası elde edilen GELMA miktarları üzerinden reaksiyon verimi hesaplanmıştır (Çizelge 5.1.). Verim hesabı Denklem 5.1.'e göre hesaplanıp ortalama alınmıştır. Δ GELMA reaksiyon sonrası liyofilize

edilen GELMA'nın kütlesini, μ Jelatin reaksiyon öncesi tampon içerisinde çözünen jelatinin kütlesini ifade etmektedir.

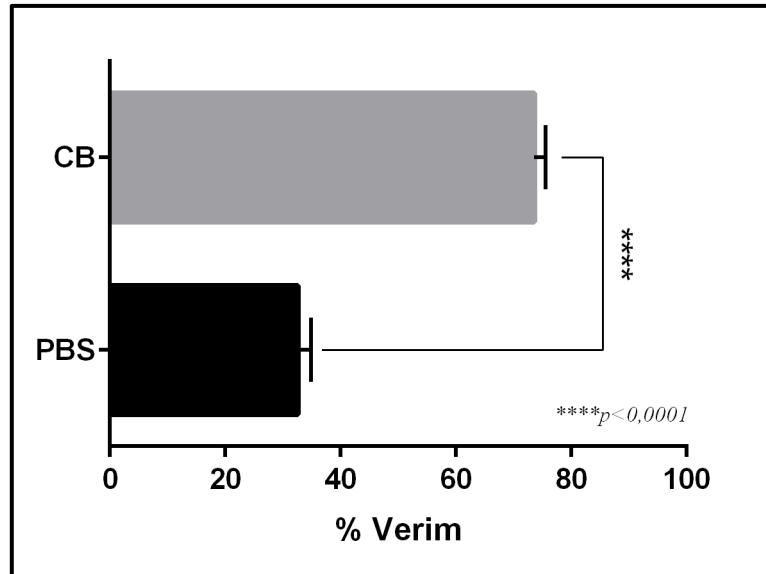
$$\%Verim = \frac{\mu_{GELMA}}{\mu_{Jelatin}} \times 100$$

Denklem 5.1.

Çizelge 5.1. PBS ve CB tamponları kullanılarak yapılan metakrilat reaksiyonları sonucu üretilen GELMA miktarları.

Deney No	Jelatin (gr.)	GELMA (gr.)
PBS-1	10	2,95
PBS-2	10	3,33
PBS-3	10	3,50
CB-1	10	7,10
CB-2	10	7,56
CB-3	10	7,44

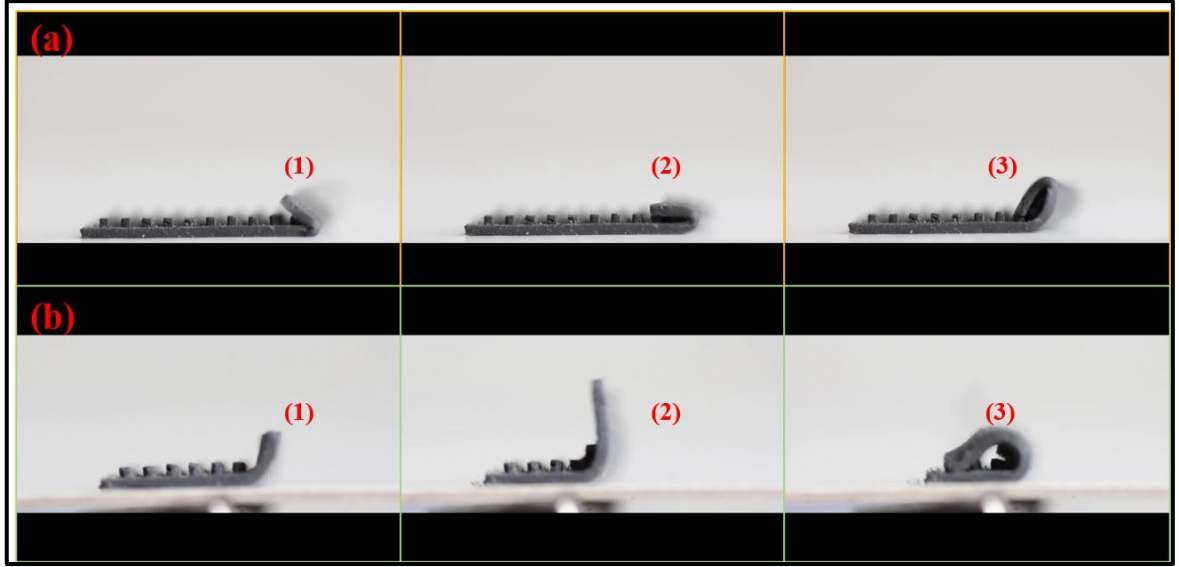
CB tamponu ile üretilen GELMA'nın, PBS tamponu ile üretilen GELMA'ya göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek verimle üretildiği gözlenmiştir (Şekil 5.9.).



Şekil 5.9. İki farklı reçete ile üretilen GELMA'ların kütlece %verimi.

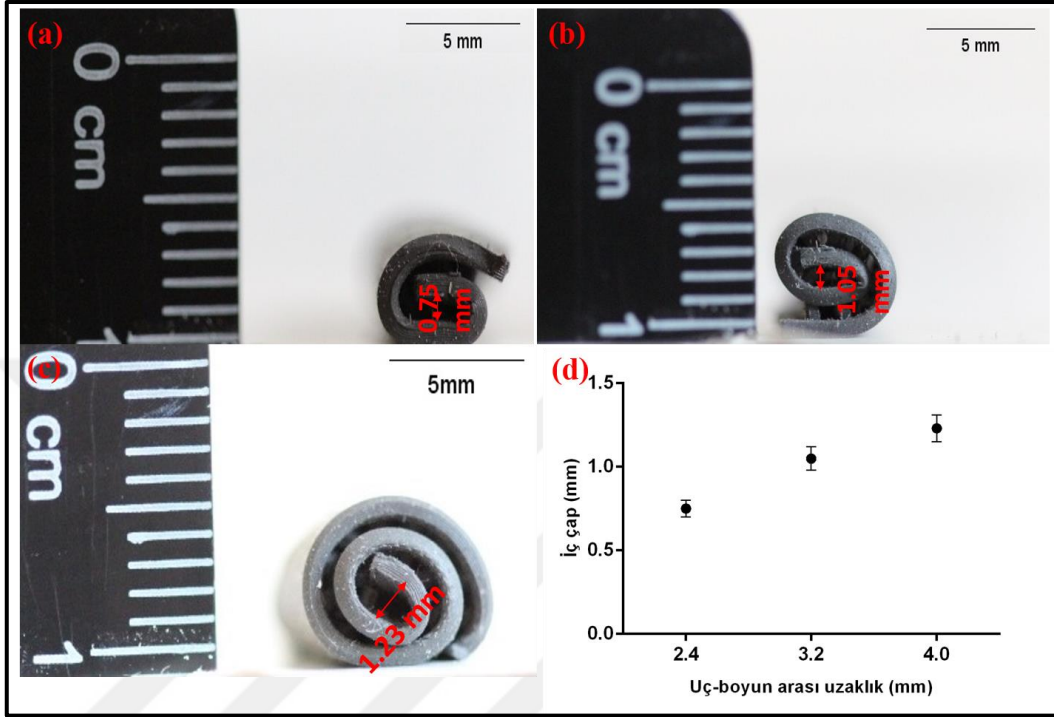
5.2.2. MANYETİK SUBSTRAT ÜRETİM BULGULARI

Manyetik substrat her örneğin her seferinde istenilen yerden ve istenilen eksenden katlanmasını sağlayacak bir tasarıma sahiptir. Şekil 4.5.'de substratın üretimi şematik olarak gösterilmiştir. Çizimde kırmızı ile gösterilen ve substrat üzerinde bir çentik olarak üretilen tasarım katlanma boynudur. Şekil 5.10.'da katlanma esnasında çekilen videodan alınmış görüntüler bulunmaktadır. Boyun tasarımı katlanma esnasında bir bükülme noktası görevi görür (a). Manyetik alan etkisinde substratın baş bölgesi öncelikle bulunduğu konumdan 90° olacak şekilde katlanır (a-1). Daha sonra, manyetik alan mıknatıs yardımıyla ilerletildikçe boyun tasarımının bulunduğu bölgenin üzerine düşer ve katlanma açısı 180°'ye ulaşır (a-2). Manyetik alan bir kademe daha ilerlediğinde substratın baş bölgesi içerde kalacak şekilde bir katlanma daha gerçekleşmiş olur ve bu şekilde sona kadar rulo bir şekilde substrat iç içe katlanmış olur (a-3). Bu boyun tasarımının konulmadığı örneklerde katlanma rastgele oluşmakta ve çoğu zaman iç içe geçmiş bir rulo tasarımı elde edilememektedir (b). Bu örneklerde boyun bölgesi olmadığı için baş bölgesi rastgele kalkar (b-1). Ağırlık merkezi değişene kadar ilk hareket devam eder (b-2). Ağırlık merkezi değiştiğinde rastgele bir kapanma meydana gelmektedir (b-3).



Şekil 5.10. Katlama boynunun etkisi. (a) Boyun tasarımının olduğu örneğin manyetik alan etkisinde katlanma videosundan alınan görüntüler. (1) İlk hareketin uzunluğu boyun tarafından belirlenir. (2) Mıknatıs ilerledikçe uç kısım boyundan bükülerek substrat üzerine düşer. (3) Uç kısım içerde kalır ve rulo şeklinde iç içe katlama gerçekleşir. (b) Boyun tasarımının olmadığı örneğin katlanma videosundan alınan görüntüler. (1) İlk hareket rastgele gerçekleşmiştir. (2) Bir bükülme noktası olmadığı için uç kısım substrat üzerine kapanmaz. (3) Mıknatıs diğer uca ulaştığında ağırlık merkezinin değişmesinden dolayı rastgele bir katlanma gerçekleşmiştir.

Baş-boyun arasındaki mesafe ilk katlanan uzunluk olduğu için rulo haline getirilmiş substratın iç çapını da belirlemektir. Şekil 5.11.'da boyun bölgesinin baş kısmı farklı uzaklıklarda bulunduğu örnekler üzerinde yapılan katlama deneyleri gösterilmiştir. Uzaklık-iç çap arasındaki ilişki (d) bölümünde verilmiştir.



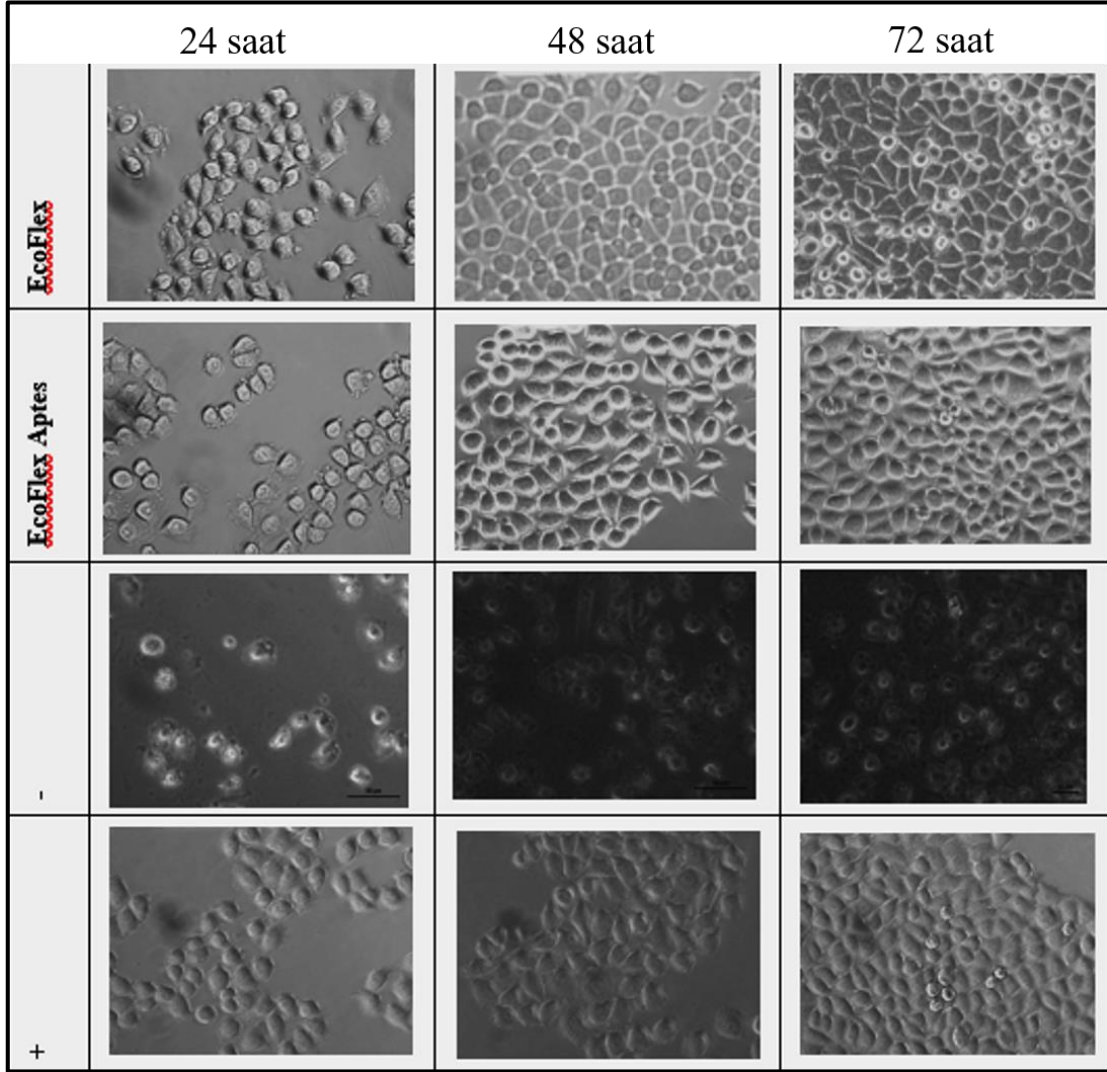
Şekil 5.11. Farklı boyun-baş mesafesinin katlanma üzerine etkisi. (a) 2,4 mm, (b) 3,2 mm, (c) 4 mm. (d) uzaklık-iç çap arası ilişki grafiği.

Substrat yüzeylerine düzgün basım yapılabilmesi için yüzeyin ıslatma temas açısı incelenmiştir. Şekil 5.12.'de gösterildiği üzere kontrol grubu olarak yüzeyine düzgün basım yapılabilen lam ve baskı almanın mümkün olmadığı teflon malzeme kullanılmıştır. Yapılan temas açısı deneylerinde cam yüzeyin 30°'lik bir temas açısına sahip olduğu ve hidrofilik bir yüzeye sahip olduğu anlaşılmıştır. Teflon yüzeye yapılan temas açısı deneyinde ise 95°'lik bir temas açısına sahip olduğu ve hidrofobik bir yüzeye sahip olduğu anlaşılmıştır. EcoFlex substrat üzerine yapılan temas açısı ölçümünde ise 97° ile teflon yüzeyden bile daha hidrofobik bir temas açısına sahip olduğu anlaşılmıştır. Bunun üzerine yüzeyin hidrofilik hale getirilmesi için ilk etapta UV-Ozon uygulaması ile yüzeyin temizlenmesi düşünülmüştür. 15 dk.'lık UV-Ozon fırınında bekletmenin ardından yapılan ölçümde temas açısının 90°'ye düşmüş olduğu belirlenmiştir. Süre etkisinin belirlenebilmesi için deney 30 dk.'lık bir bekletme ile tekrarlanmış ve temas açısının 85°'ye düştüğü izlenmiştir. Daha sonra yüzey temas açısının yeterli seviyede iyileştirilmesi için APTES (aminopropyltriethoxysilane) kaplama modifikasyonu uygulanmıştır. Bunun için 30 dk UV-Ozon uygulaması yapılan yüzeyler 24 saat boyunca APTES ile muamele edilmiş ve ardından temas açısı 45° olarak ölçülmüştür. Bu substratlara yapılan basım çalışmalarının başarılı olduğu görülmüştür (Şekil 5.20.).

Cam	Teflon	Eco-Flex
 Temas Açısı: 30 °	 Temas Açısı: 95 °	 Temas Açısı: 97 °
Eco-Flex 15 dk Uv-O ₃	Eco-Flex 30 dk Uv-O ₃	Eco-Flex 30 dk Uv-O ₃ + APTES 24 saat
 Temas Açısı: 90 °	 Temas Açısı: 85 °	 Temas Açısı: 45 °

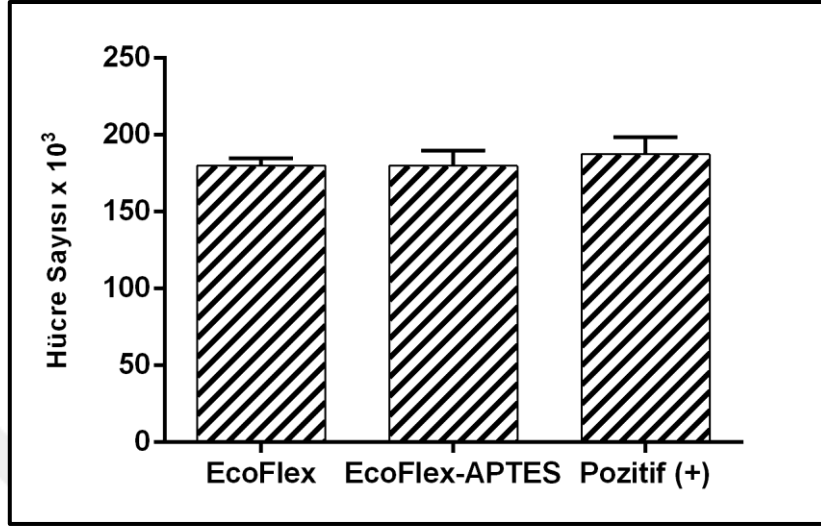
Şekil 5.12. Temas açısı ölçümleri. Hidrofilik olan cam yüzey ve hidrofobik olan teflon yüzey ile karşılaştırılarak EcoFlex substratın temas açısının modifiye edilmesi.

Hücre kültürü çalışması öncesi, EcoFlex malzemesi ile manyetik özellik kazandırmak üzere malzemeye eklenen demir tozunun toksik etki gösterip göstermediğinin tespiti yapılmıştır. 24 48 ve 72. saatlerde inverted ışık mikroskobu altında incelenmiş olan hücrelerin morfolojik anlamda bir değişikliğe uğramadığı izlenmiştir. Ölü hücre olarak değerlendirilen yüzen hücreler ise tüm gruplarda bir miktar görülse de düşük yoğunluklu olduğu gözlenmektedir (Şekil 5.13.).



Şekil 5.13. Ekstraksiyon sıvılarının eklenmesinin ardından 24, 48 ve 72. Saatlerde alınan görüntüler. Hücre yayılımı ve morfolojik değişim bu görüntülere göre değerlendirilmiştir. (+) pozitif kontrol, (-) negatif kontrol.

Hücre çoğalması analizi için kuyucuklarda ki hücre sayısı Alamar Blue testi ile belirlenmiştir. Hem APTES kaplı örneklerin hem de sadece EcoFlex malzemesinin pozitif kontrol (sitotoksik olmayan) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir hücre inhibisyonuna neden olmadığı gözlenmiştir (Şekil 5.14.).

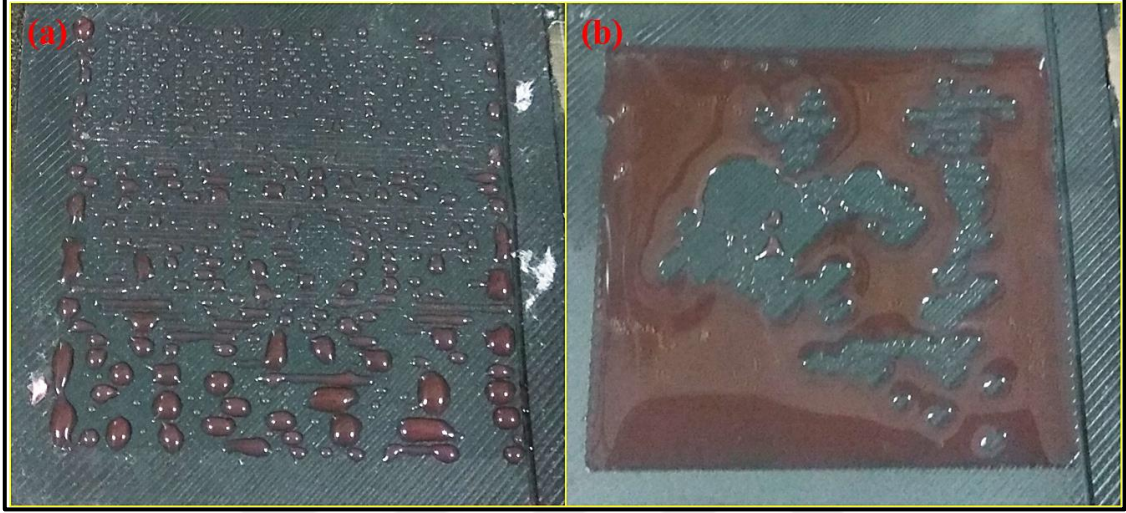


Şekil 5.14. 72. saat sonunda kuyucuklardaki canlı hücre sayısının belirlendiği Alamar Blue testi sonuçları.

5.2.3. 4B BASIM OPTİMİZASYON BULGULARI

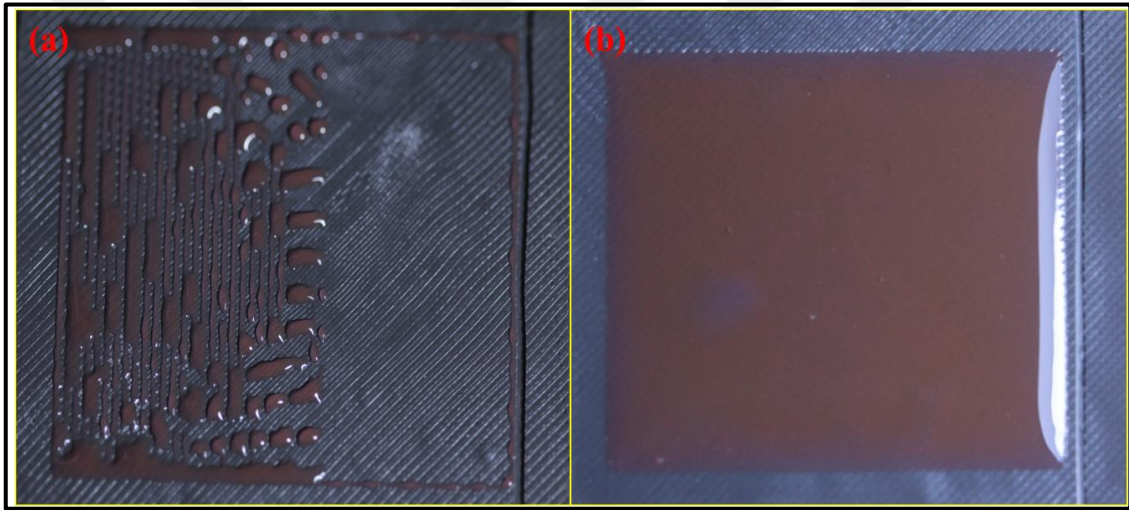
GELMA solüsyonları 21°C sıcaklık altında katı, üzerinde ise sıvı halde bulunurlar. Bu özellik sayesinde 3B basım çalışmalarında baskı tablası sıcaklığı kontrol edilerek daha iyi baskılar almakta kullanılabilir. Çalışmamızda bu sıcaklık farkının basım kalitesine olan etkisini gözlemlemek amacıyla 3B yazıcının baskı tablası önce 23°C'ye, daha sonra 17°C'ye ayarlanarak basım gerçekleştirilmiştir. Diğer yandan düzgün bir basım yapabilmek için substrat yüzeyinin hidrofilite derecesi ile basılan malzemenin vizkozitesinin doğrudan ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle 4.2.2.3.2. bölümünde yüzeylerin temas ölçüleri alınmış ve hidrofilik bir yüzey oluşturmak için bir dizi işlem gerçekleştirilmiştir. Farklı yüzey temas açılarının basım kalitesine etkisi de ayrıca incelenmiştir. 3B basım optimizasyon çalışmaları yapılırken, Çizelge 4.2.'de belirtilen malzeme kompozisyonları oluşturulmuş ve her grup belirtilen iki farklı tabla sıcaklığında basılmıştır. GELMA10 ve GELMA101 grupları EcoFlex-APTES yüzeyine diğer iki grup ise üç farklı yüzeye (EcoFlex, EcoFlex-UVOzon ve EcoFlex-APTES) basılarak basım kaliteleri gözlenmiştir.

GELMA10 hidrojelini Çizelge 4.3.'de belirtilen basım parametreleri kullanılarak 23°C tabla sıcaklığında basılmıştır. Ancak en düşük temas açısına sahip EcoFlex-APTES manyetik substrat üzerine dahi yerleştirilmesi mümkün olmamıştır (Şekil 5.15. (a)). 17°C tabla sıcaklığında basıldığında ise bir miktar iyileşme gözlenmiş olsa da istenilen şekilde bir basıma gerçekleşmemiştir (b).



Şekil 5.15. GELMA10 hidrojelini EcoFlex-APTES manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C

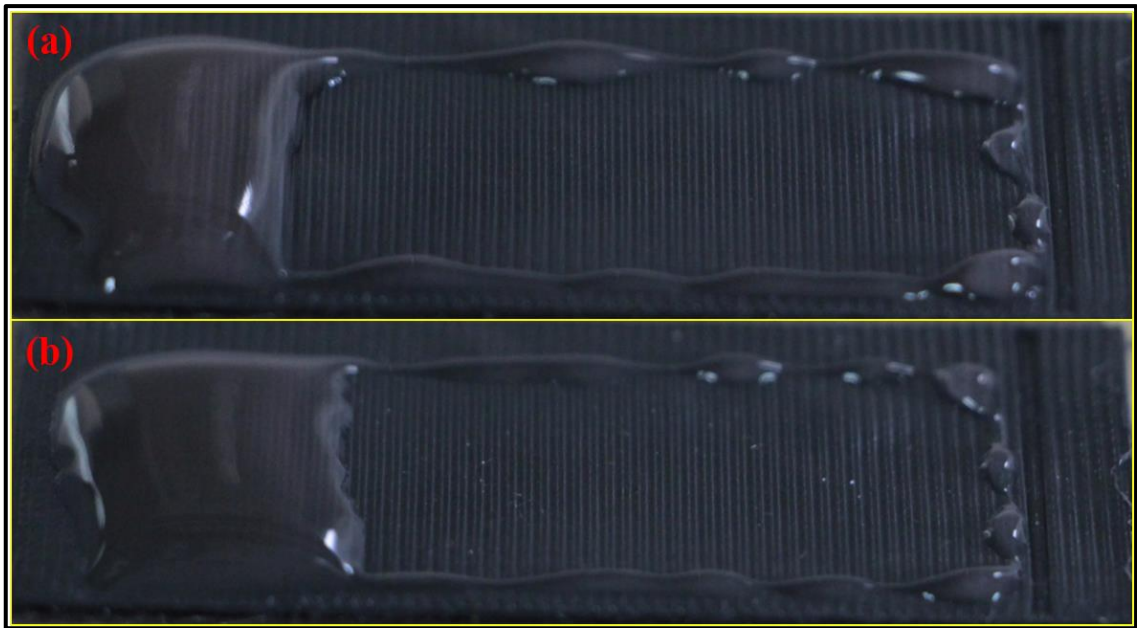
Yüzey temas açısının düşürülmesi açısından bir limite ulaştığımız düşünülerek, basım kalitesinin artışının vizkozite artışı ile çözülmesi düşünülmüştür. Bu sebeple GELMA10 kompozisyonuna %1'lik (a/h) aljinat katkısı yapılarak basılabilirlik artırılmak istenmiştir. GELMA101 hidrojel Çizelge 4.3.'de belirtilmiş olan basım parametreleri kullanılarak 23°C tabla sıcaklığında basılmıştır. GELMA10 ile karşılaştırıldığında vizkozite artışının bir az da olsa basım kalitesine etkisi görülmektedir. Yer yer basılan çizgilerin yüzeyde tutunduğu görülmüş olsa da düzgün bir basım gerçekleşmemiştir (Şekil 5.16. (a)). 17°C tabla sıcaklığında basıldığında ise hidrojel GELMA10'a kıyasla kenarları belli olan bir şekil çizebilmiş olsa da orta kısımlarda yine sıvı yığılmalar gözlenmektedir (b). Bu sonuçlara göre iki farklı sıcaklıkta %10'luk GELMA solüsyonu aljinat ile birlikte basılmış olsa dahi istenilen desenlerin basılabildiği bir sonuç verememiştir.



Şekil 5.16. GELMA101 hidrojelinin EcoFlex-APTES manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C

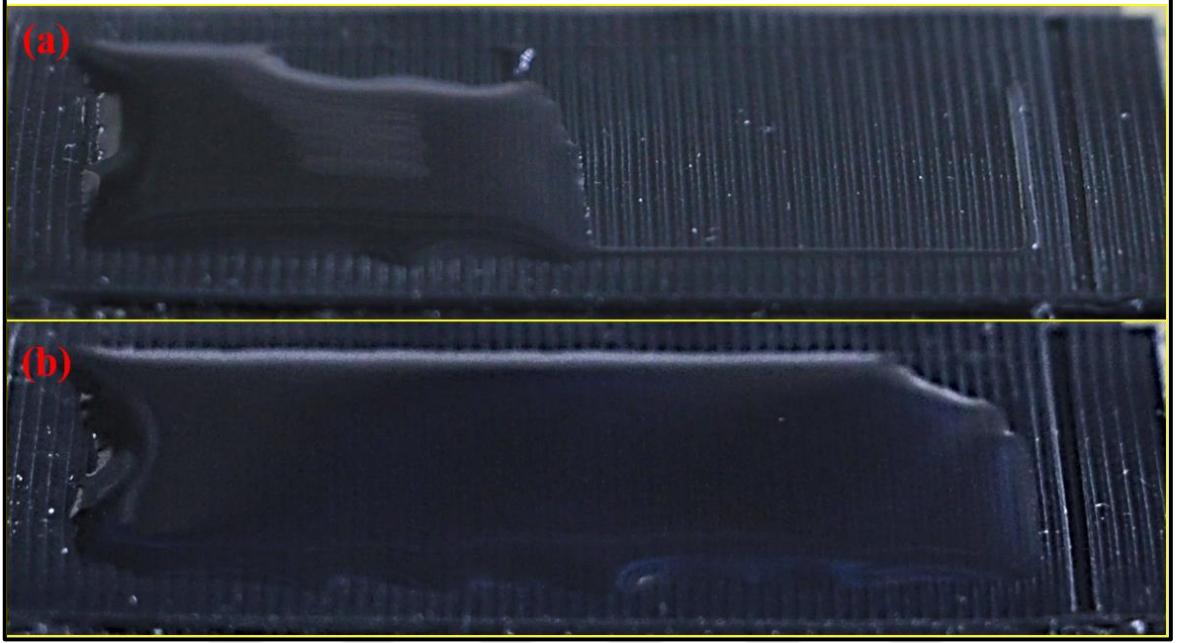
GELMA10 ve GELMA1g101 ile yapılan çalışmaların bulgularından yola çıkarak, GELMA miktarı artırılmıştır. GELMA20 ve GELMA1g201 kompozisyonlarının basımları üç farklı yüzey üzerinde yapılmıştır. GELMA20 hidrojelini hem 23°C’de hem de 17°C’de basılmıştır. Ancak 23°C’de istenilen basımların hem GELMA10’larda hem de GELMA20’de başarılamaması nedeniyle GELMA1g201 hidrojelini sadece 17°C’de basılmıştır.

Şekil 5.17.’da GELMA20 hidrojelini Çizelge 4.3.’de belirtilen basım parametreleri ile yüzey işlemi görmemiş EcoFlex substrat üzerine basıldığı deneyin görüntüleri verilmiştir. Tabla sıcaklığının hem 23°C hem 17°C’deki basım denemeleri başarılı olmamıştır. Her iki sıcaklıktaki basım arasında da bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 5.17. GELMA20 hidrojelini EcoFlex manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C

Şekil 5.18.'de GELMA20 hidrojelinin Çizelge 4.3.'de belirtilen basım parametreleri ile sadece UV-Ozon temizleme işlemi görmüş EcoFlex-UVOzon substrat üzerine basıldığı deneyin görüntüleri verilmiştir. Tabla sıcaklığının hem 23°C hem de 17°C'deki basım denemeleri başarılı olmamıştır.



Şekil 5.18. GELMA20 hidrojelinin EcoFlex-UVOzon manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C

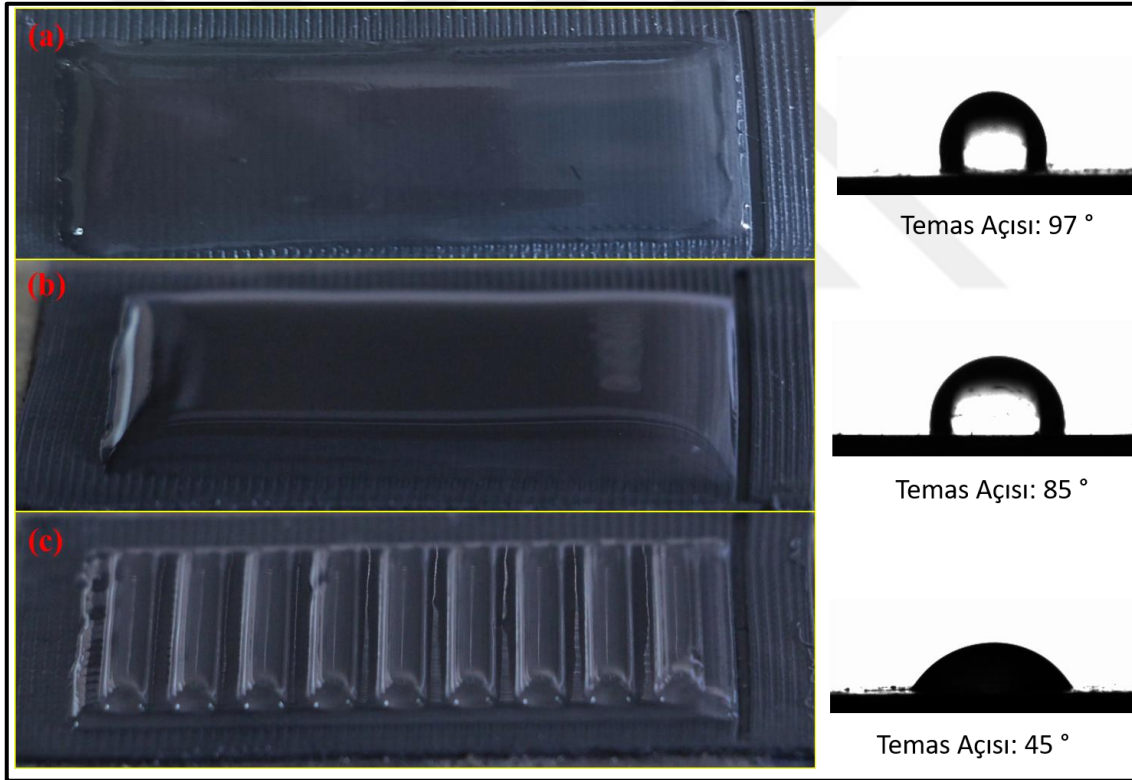
Şekil 5.19.'de GELMA20 hidrojelinin Çizelge 4.3.'de belirtilen basım parametreleri ile APTES kaplama işlemi görmüş EcoFlex-APTES substrat üzerine basıldığı deneyin görüntüleri verilmiştir. Tabla sıcaklığının hem 23°C hem de 17°C'deki basım denemeleri başarılı olmamıştır. GELMA20 hidrojeli en düşük temas açısına sahip substratta dahi 23°C'de yüzeyde tutunamamış, 17°C'de ise bir miktar tutunsa dahi yüzeyde sıvı şekilde bir yığılma meydana gelmiştir.



Şekil 5.19. GELMA20 hidrojelinin EcoFlex-APTES manyetik substrat üzerine 3B basımı. (a) Tabla sıcaklığı 23°C. (b) Tabla sıcaklığı 17°C

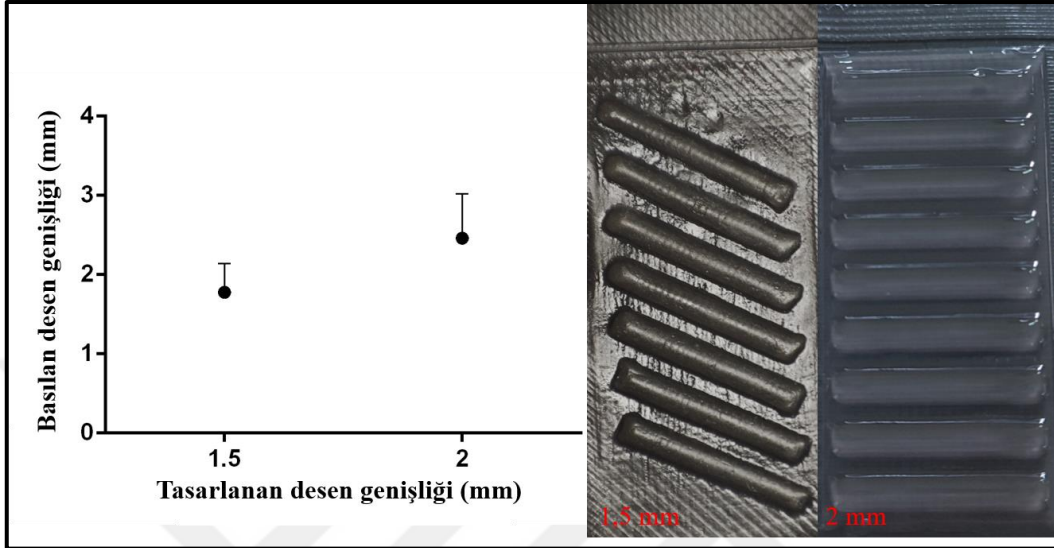
GELMA20 ile yapılan denemelerin sonuçları GELMA10 ile yapılan denemeler ile aynı şekilde sonuçlanmış olup, yüzey işlemleri yapılsa dahi basım malzemesinin istenilen düzeyde 3B basım yapmaya uygun olmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca tabla sıcaklığının 23°C olduğu deneylerin 3B basım için uygun olmadığı anlaşılmış olup, GELMA1g201 deneyleri sadece 17°C'de yapılmıştır.

Şekil 5.20.'da GELMAlg201 hidrojelinin Çizelge 4.3.'de belirtilen basım parametreleri ile 17°C tabla sıcaklığında (a) EcoFlex, (b) EcoFlex-UVOzon, (c) EcoFlex-APTES substratları üzerine basıldığı deneyin görüntüleri verilmiştir. Bu kompozisyonda yüzey işlemi görmemiş EcoFlex substratta kenarları belli olan ancak orta kısımların yine sıvı kaldığı bir basım gerçekleşmiştir (a). EcoFlex-UVOzon substratında ise ilk defa basım süreci durdurulmamış ve ikinci katmanın da basılmasına izin verilmiştir. Ancak yeterli temas açısı olmadığı için tüm desenler birleşmiştir (b). Son olarak EcoFlex-APTES substratı üzerinde yapılan 3B basım çalışması olumlu sonuç vermiştir. Basım süreci hiç durdurulmadan GelMAlg201 hidrojeli ile yapılan uygulamada tasarlanan tüm desenlerin yaklaşık ölçülerde basılabildiği gözlenmiştir (c). Temas açısı, tabla sıcaklığı ve GELMA ve aljinat miktarının bu verilerle optimize edildiği anlaşılmıştır. Deneylerin bundan sonrası GELMAlg201 kompozisyonuna sahip hidrojel ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.20. GELMAlg201 hidrojelinin 17°C tabla sıcaklığında 3B basımı. (a) 97° temas açısına sahip EcoFlex substrat üzerine basım. (b) 85° temas açısına sahip EcoFlex-UVOzon substrat üzerine basım. (c) 45° temas açısına sahip EcoFlex-APTES substrat üzerine basım.

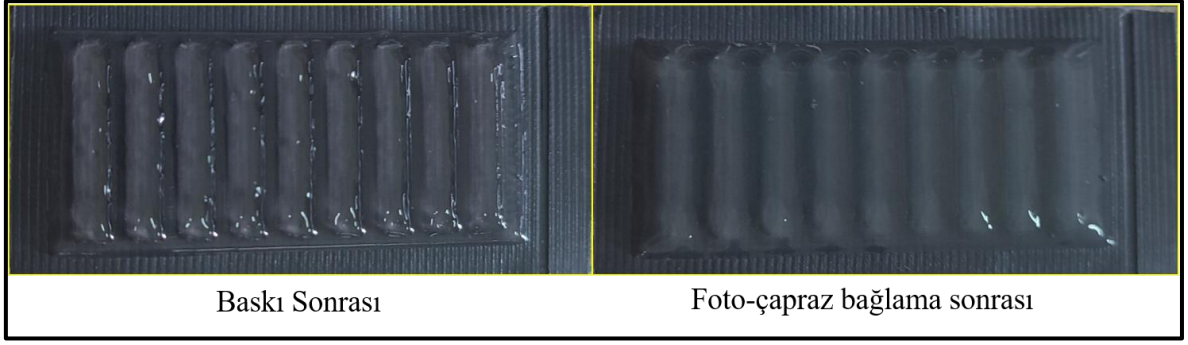
Tasarlanan desen ölçüleri ile gerçekleşen basım ölçülerinin kıyaslaması için 1,5 mm ve 2 mm genişliğe sahip desenler tasarlanmış ve optimize edilen parametrelerde basılmıştır. Gerçekleşen desen ölçüleri her iki tasarımdan bir miktar fazla gerçekleşmiştir. 2 mm olarak tasarlanan desenin hata payı 1,5 mm olana göre daha fazla gerçekleşmiştir (Şekil 5.21.).



Şekil 5.21. Tasarlanan ölçüler ile gerçekleşen ölçüler arasındaki fark.

GELMAI201 hidrojelinde bulunan GELMA foto-çapraz bağlanabilir şekilde üretilmiştir. Aljinat ise CaCl_2 ile çapraz bağlanabilir bir polimerdir. Bu nedenle GELMA ve aljinat Bölüm 4.2.2.4.'de anlatıldığı şekliyle ayrı ayrı çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlamanın sırası ile desenlerin korunumu arasındaki ilişki, önce foto-çapraz bağlama, sonra CaCl_2 ve tam tersi olacak şekilde iki farklı şekilde deney yapılarak izlenmiştir.

3B basım yapıldıktan hemen sonra uygulanan mavi LED ışıkla yapılan foto-çapraz bağlama sonrası desenlerin çıktığı ve birbiri ile kaynaştığı gözlenmiştir (Şekil 5.22.). Bu nedenle önce foto-çapraz bağlamanın uygun olmadığı düşünülerek çapraz bağlamada öncelik CaCl_2 'e verilmiştir. 3B basım sonrası hidrojel üzerine 4°C 'ye soğutulmuş 0,25M CaCl_2 püskürtülerek önce aljinat çapraz bağlanmış ve 5 dk. beklemenin ardından foto-çapraz bağlama için mavi LED ışık uygulaması yapılmıştır. Şekil 5.23.'de de görüldüğü üzere Şekil 5.22.'e göre önce CaCl_2 püskürtmesi, sonra ışık uygulaması sonrası desenlerin basıldığı haliyle korunduğu izlenmiştir.



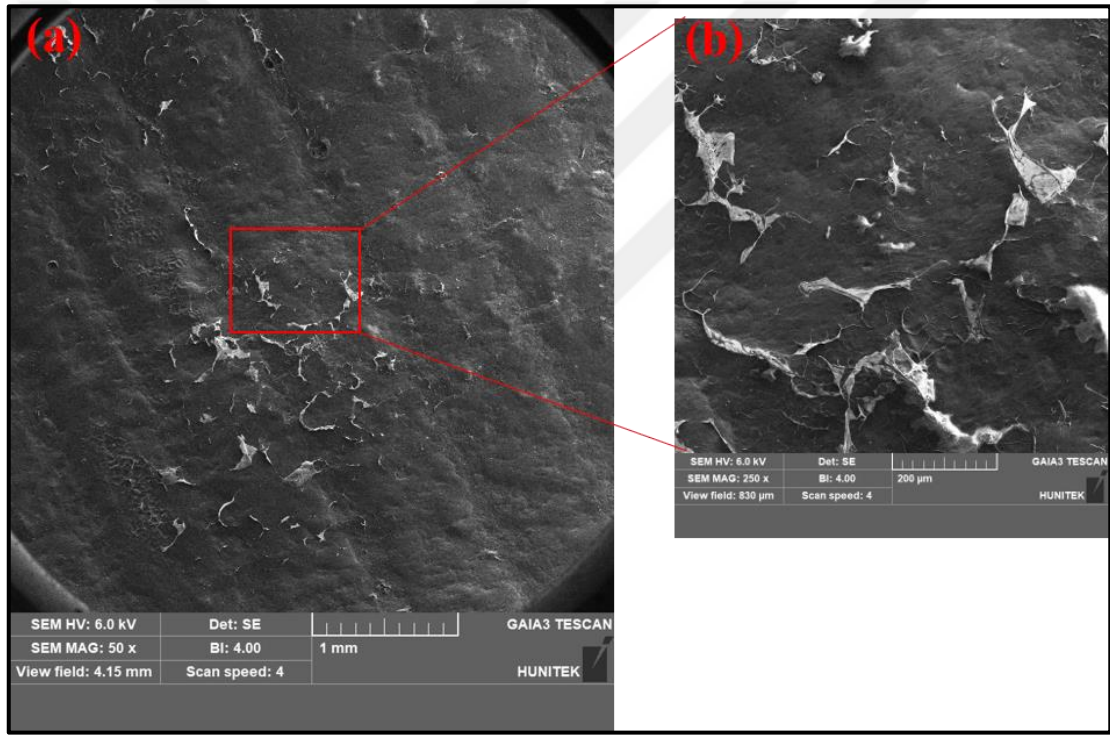
Şekil 5.22. 3B basımdan hemen sonra uygulanan foto-çapraz bağlama sonrası desenlerin durumu.



Şekil 5.23. 3B basımdan hemen sonra CaCl₂ püskürtmesi ile çapraz bağlama ve ardından mavi LED ışık kullanılarak foto-çapraz bağlama sonrası desenlerin durumu.

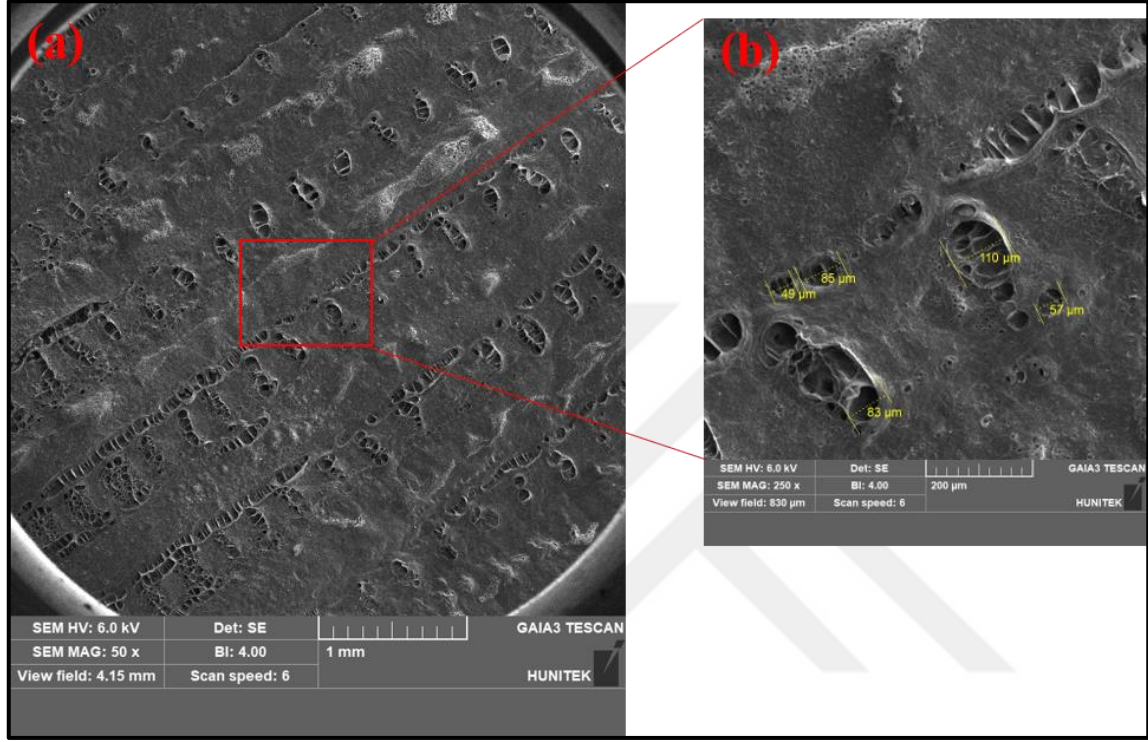
5.2.4. ALJİNAT LİYAZ UYGULAMASI BULGULARI

3B basım çalışmaları optimize edilirken, tekrarlanabilir düzgün basımlar gerçekleştirebilmek için vizkozite ve substratın temas açısı arasında bir ilişki olduğundan bahsedilmiştir. Bu optimizasyonlarda, aşamasında substratın temas açısının mümkün olduğu kadar düşürülmesine rağmen düzgün basım alınamadığı 5.2.3. bölümünde gösterilmiştir. Bu sorunun çözümü için hidrojel vizkozitesi %1 (a/h)'lik aljinat malzemesi katkısı ile artırılmıştır. Şekil 5.24.'de aljinat liyaz enzimi uygulanmayan örneğin SEM görüntüsü verilmiştir. Yapıda herhangi bir gözeneklilik bulunmadığı anlaşılmıştır. 3.günde yapılan phalloidin/DAPI boyaması hücrelerin bu gözeneksiz ortamda hayatta kalamadığını göstermektedir.



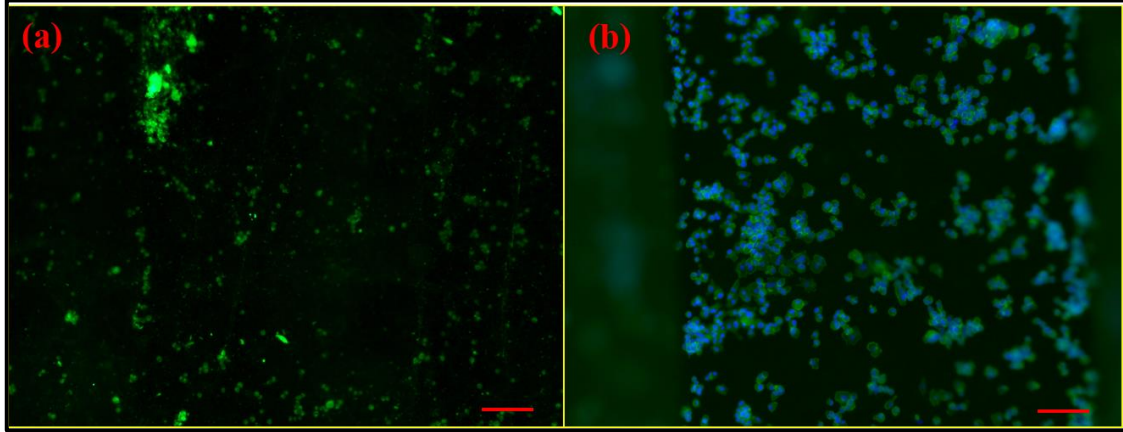
Şekil 5.24. Aljinat liyaz enzimi uygulanmamış örneğin SEM görüntüsü. (a) 50X büyütme, (b) 250X büyütme.

Hücre canlılığını artırmak ve yayılımını teşvik edebilmek için çapraz bağlamanın ardından hidrojeldeki aljinat içeriği 24. saatte aljinat liyaz enzimi yardımıyla yapıdan çıkarılmıştır. Aljinatın yapıdan çıkarılması mekanik dayanımı bir miktar düşürse de hücre yayılımı için yeterli gözeneklilik bu şekilde sağlanmıştır. Uygulanan aljinat liyaz enzimi sonrası, yapıda 50-100 mikron arası çeşitli çaplarda gözenekler oluştuğu Şekil 5.25.'de görülmektedir.



Şekil 5.25. Aljinat liyaz uygulaması yapılmış örneğin SEM görüntüsü. (a) 50X büyütme, (b) 250X büyütme.

Aljinat liyaz uygulaması öncesi C2C12 hücrelerinin yapı içerisindeki durumu incelenmek üzere 3 günlük bir hücre kültürü deneyi yapılmış ve hücrelerin hidrojel içerisinde bir yayılım gösteremedikleri gözlenmiştir. Phalloidin boyasından yer yer sinyal alınmasına rağmen DAPI boyasından hiç sinyal alınamamıştır (Şekil 5.26. (a)). Aljinat liyaz uygulaması yapılan hidrojele uygulanan boyamalarda ise hücrelerin yayılmaya başladıkları hem aktin hem de hücre çekirdeğinden alınan sinyal ile doğrulanmıştır (Şekil 5.26. (b)).



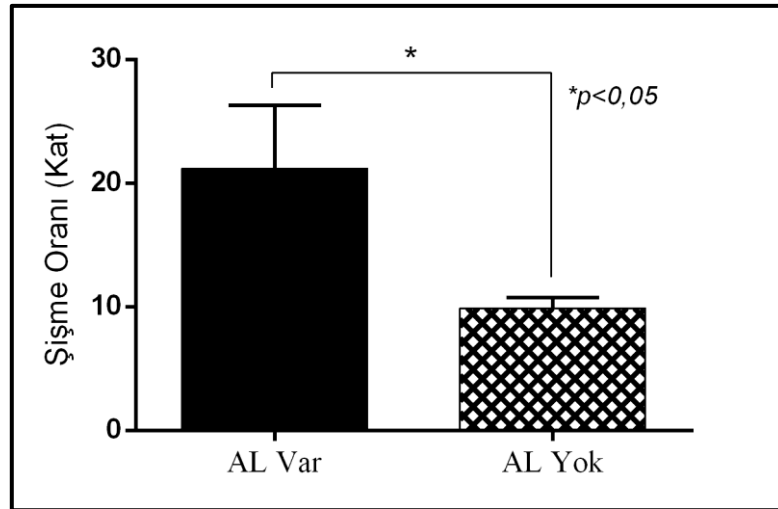
Şekil 5.26. 3. gün Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Aljinat liyaz uygulaması yapılmamış örneğin floresan mikroskopi görüntüsü. (b) Aljinat liyaz uygulaması yapılmış örneğin floresan mikroskopi görüntüsü. Ölçek: 100 μm .

Aljinat liyaz uygulamasının bir başka etkisi ise açılan porlar nedeniyle sıvı emme (swelling) kapasitesindeki değişimdir. Bu değişim 4.2.2.6. bölümünde anlatıldığı şekliyle aljinat liyaz uygulanan (AL var) ve uygulanmayan (AL yok) 3'er örnekle ölçülmüştür. Çizelge 5.2.'de belirtildiği şekliyle hidrojellerin yaş ağırlığı (W_y), kuru ağırlıklarına (W_k) oranlanarak kütlece kaç kat artış olduğu tespit edilmiştir (W_y/W_k).

Çizelge 5.2. Şişme oranı testi için ağırlıkları ölçülen örnekler, şişme oranı, ortalama ve standart sapması.

Örnek	$W_y(\text{mg})$	$W_k(\text{mg})$	Şişme Oranı (Kat)	Ortalama (Kat)	Standart Sapma
ALyok 1	27,2	2,6	27,25	21,18	5,10
ALyok 2	45,2	4,3	21,51		
ALyok 3	29,5	3,4	14,77		
ALvar 1	117,2	4,3	10,46	9,88	0,85
ALvar 2	120,5	5,6	10,51		
ALvar 3	45,8	3,1	8,67		

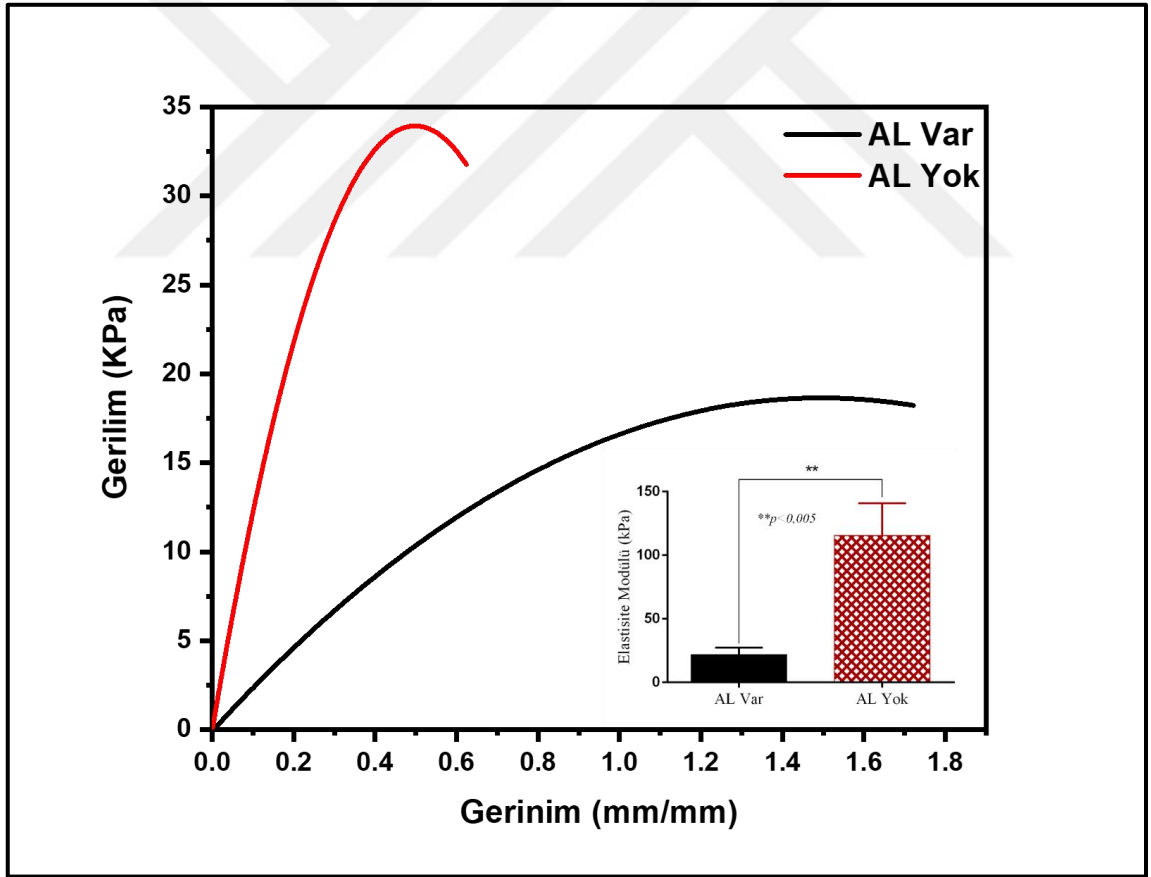
Şekil 5.27.'daki grafikte aljinat liyaz uygulaması yapılan örnekler, açılan porlar nedeniyle kuru haldeki kütlelerinin yaklaşık 20 katı kadar sıvı emme performansı göstermişlerdir. Aljinat liyaz uygulanmayan örnekler ise kuru haldeki ağırlıklarına nazaran yaklaşık 10 kat bir şişme davranışı göstermişlerdir. Yapılan istatistiksel analize göre; AL uygulaması yapılan örnekler istatistiksel olarak anlamlı ($*p < 0,05$) olacak şekilde, AL uygulaması olmayan örneklere göre daha fazla sıvı emmektedirler.



Şekil 5.27. AL uygulaması yapılan ve yapılmayan örneklerin şişme oranı grafiği.

Üretilen taşıyıcı iskelelerin, AL uygulaması öncesi ve sonrasında kas dokusu ile mekanik uyumluluğun incelenmesi için 90° desenle üretilen örneğe çekme testi uygulanmıştır. Aljinat liyaz uygulamasının yapıda gözenekler oluşturmalarının mekanik dayanıma etkisi incelenmiştir. 4.2.2.7. bölümünde anlatıldığı şekliyle çekme testi uygulanmış ve elde edilen verilerden gerilim-gerinim grafiği oluşturulmuştur. Bu grafikten yararlanılarak da örneğin elastisite modülü hesaplanmıştır.

Elde edilen gerilim-gerinim grafiğine göre, AL uygulaması yapılmayan örneğin elastisite modülü yaklaşık 115 kPa olarak hesaplanmıştır. AL uygulaması yapılan örneğin ise elastisite modülü yaklaşık 22 kPa olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.28.). Doğal kas nişinin elastisite modülünün yaklaşık 12 kPa olduğu literatürden bilinmektedir. Aljinat liyaz uygulaması sayesinde üretilen taşıyıcı iskelenin, doğal kas nişine yakın bir elastisite modülüne sahip olması da sağlanmıştır.

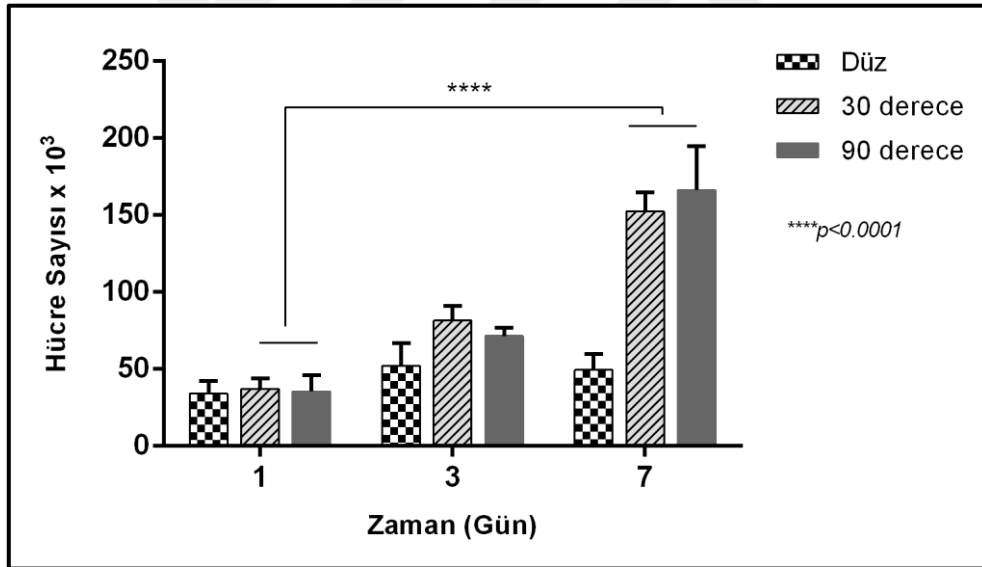


Şekil 5.28. AL uygulaması yapılan ve yapılmayan örneklere uygulanan çekme testi sonucu elde edilen temsili gerilim-gerinim grafiği. Grafikten elde edilen elastisite modülleri.

5.2.5. HÜCRE CANLILIĞI VE YAYILIMI

5.2.5.1. Alamar Blue Testi ile Canlılık Analizi

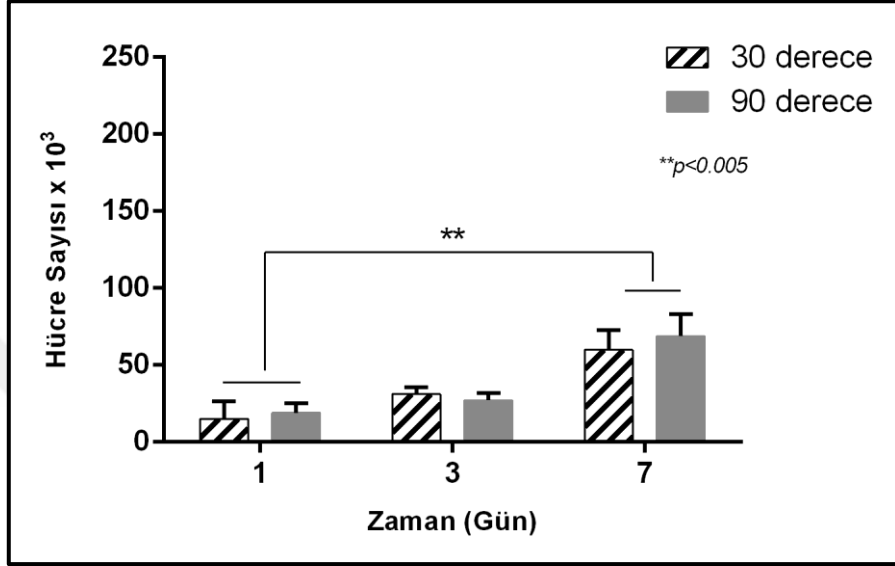
7 gün boyunca kültür edilen hücre yüklü hidrojelde içindeki hücre sayısının kantitatif olarak tespit edilebilmesi için 1. 3. ve 7. günde örnekler Alamar Blue testi uygulanmıştır. Hidrojin hücre konsantrasyonuna göre (2×10^6 hücre / ml) örnek başına yaklaşık 150.000 hücre ekildiği hesaplanmıştır. Şekil 5.29.'de verilen Alamar Blue sonuçlarına göre açık durumda kültür edilen örneklerde 24. saat sonunda ekilen hücrelerin yaklaşık %30'u hayatta kalmış ve sonraki günlerde çoğalmayı başarmışlardır. 3. gün sonunda tüm örneklerin içinde hücre sayısının arttığı gözlenmektedir. 7. gün sonunda ise düz (desensiz basılan) örnekler hariç 30° ve 90° desenlere sahip örneklerde ilk güne göre istatistiksel olarak anlamlı ($****p<0,0001$) olacak şekilde bir hücre artışı meydana gelmiştir. Düz örneklerin 3. günden itibaren mekanik bütünlüklerini kaybetmeye başlaması nedeniyle test sonucunda daha az hücre sayısına sahip olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 5.29. Alamar Blue canlılık analizi grafiği. 1. 3. ve 7. günde açık durumda kültür edilen örnekler içerisinde canlılığını sürdüren hücre sayıları.

Düz örneklerin 3. günden itibaren mekanik bütünlüklerinin bozulduğunun gözlenmesi nedeniyle katlanarak rulo yapılan örneklerde bu deney grubu çıkarılmıştır.

Şekil 5.30.'de verilen Alamar Blue sonuçlarına göre rulo halde kültür edilen örnekler içindeki hücrelerin 1.gün sonunda yaklaşık %15'i hayatta kalmış ve sonraki günlerde çoğalmayı başarmışlardır. 3. gün sonunda örneklerin içerdiği hücre sayısında göreceli de olsa bir miktar artış gözlenmektedir. 7. gün sonunda ise her iki grup örnekte de ilk güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($**p<0,005$) bir derecede artış gözlenmektedir.



Şekil 5.30. Alamar Blue canlılık analizi grafiği. 1. 3. ve 7. günde rulo halde kültür edilen örnekler içerisinde canlılığını sürdüren hücre sayıları.

Açık ve rulo haldeki örnekler hücre sayısı bakımından kıyaslandığında tüm günlerde rulo halde kültür edilen örneklerin daha az hücre yoğunluğuna sahip oldukları gözlenmiştir. Her iki grupta da 3. günden sonra hücrelerin çoğalma hızları artış göstermiş ve 7. gün sonunda farklı derecelerde olsa da istatistiksel olarak anlamlı artışlar gerçekleşmiştir.

5.2.5.2. Hücre Morfolojisi ve Yayılımı

Hidrojel içerisinde hücrelerin yayılımını ve morfolojik durumunu gözlemlemek için deney grupları (Açık-Düz, Açık-30°, Açık-90°, Rulo-30° ve Rulo-90°) f-aktin (Phalloidin) ve hücre çekirdeği (DAPI) boyamasına tabi tutulmuştur.

Açık-Düz grubunda 7 günlük deney sürecinde, aynı Alamar Blue testindeki gibi mekanik bütünlük 3. günden sonra bozulmuştur. Şekil 5.31.'de 1. gün boyaması floresan mikroskopi görüntüleri verilmektedir. Görüntülere göre hücrelerin katmanları oluşturan hidrojel çizgileri kenarlarında tutundukları ve hayatta kaldıkları gözlenmektedir. 3. günden sonra mekanik bütünlük bozulsada Şekil 5.32.'de görüldüğü üzere 7. günde hidrojel içinde kalmış olan hücreler belirli bir düzen göstermeksizin yayılmışlardır.

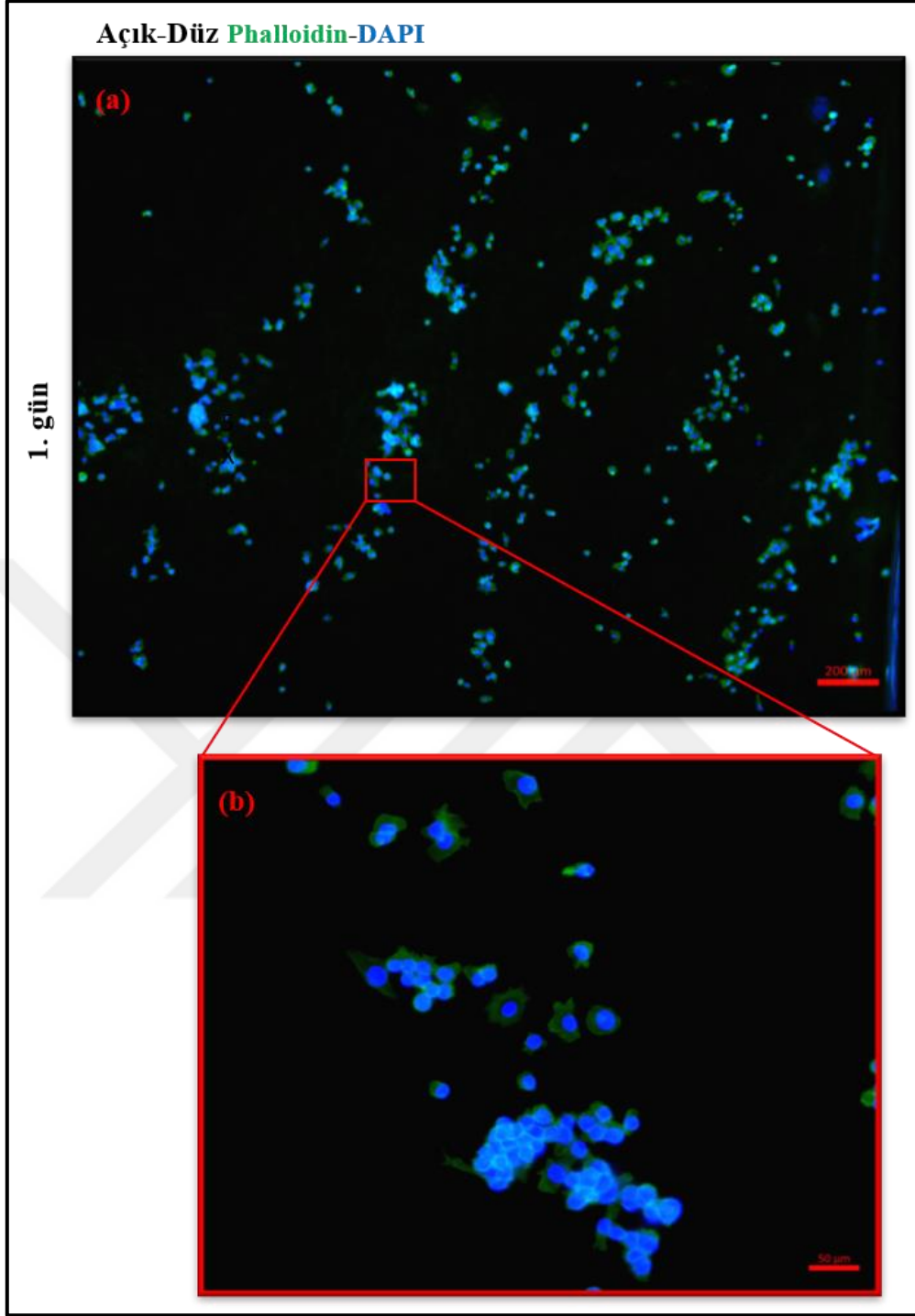
Açık-30° grubunda Şekil 5.33.'de 1. gün boyama görüntüleri verilmektedir. 1. günde hücreler Açık-Düz grubunda olduğu gibi alt katman çizgileri boyunca tutunup hayatta kalmışlardır (a). 1. günde üst desenler üzerinde az sayıda hücre gözlenmiştir. 7. gün boyama görüntülerinin verildiği Şekil 5.34.'de ise alt katmanlardaki hücrelerin alt katmanı oluşturan basım çizgileri ekseninde yönlendirilerek yayıldıkları (b), desen üzerindeki hücrelerin ise desenin 30°'lik eğimini takip ederek yayıldıkları gözlenmektedir (c). Tüm hidrojel dikkate alındığında, hücrelerin yoğunlaştığı ve daha az hücrenin yayıldığı bölgeler olduğu gözlenmektedir. Tüm hidrojel üzerinde hücre yayılmasının heterojen olduğu tespit edilmiştir (a).

Şekil 5.35.'de Açık-90° grubunun 1. gün boyama sonuçları verilmektedir. Diğer gruplara benzer şekilde 1. gün sonunda hücreler alt katman çizgileri etrafında tutunup hayatta kalmışlardır (a). Desenler üzerinde ise diğer gruplara benzer şekilde az miktarda hücre gözlenmektedir. Aynı grubun 7. gün boyama görüntüleri Şekil 5.36.'de verilmektedir. Açık-30° grubuna benzer şekilde Açık-90° grubunda da yer yer hücrelerin yoğun ve daha az yoğun olduğu yerler bulunmaktadır (a). Alt katmanlardaki hücrelerin basım çizgileri ekseninde yönlendirilerek yayıldıkları, ayrıca desenlerdeki hücrelerle de birleştikleri gözlenmektedir (b). Desen üzerindeki hücrelerin ise 90°'lik eksen boyunca popülasyonlarını artırdıkları ve alt katmana göre daha yoğun popülasyona ulaştıkları gözlenmektedir (c).

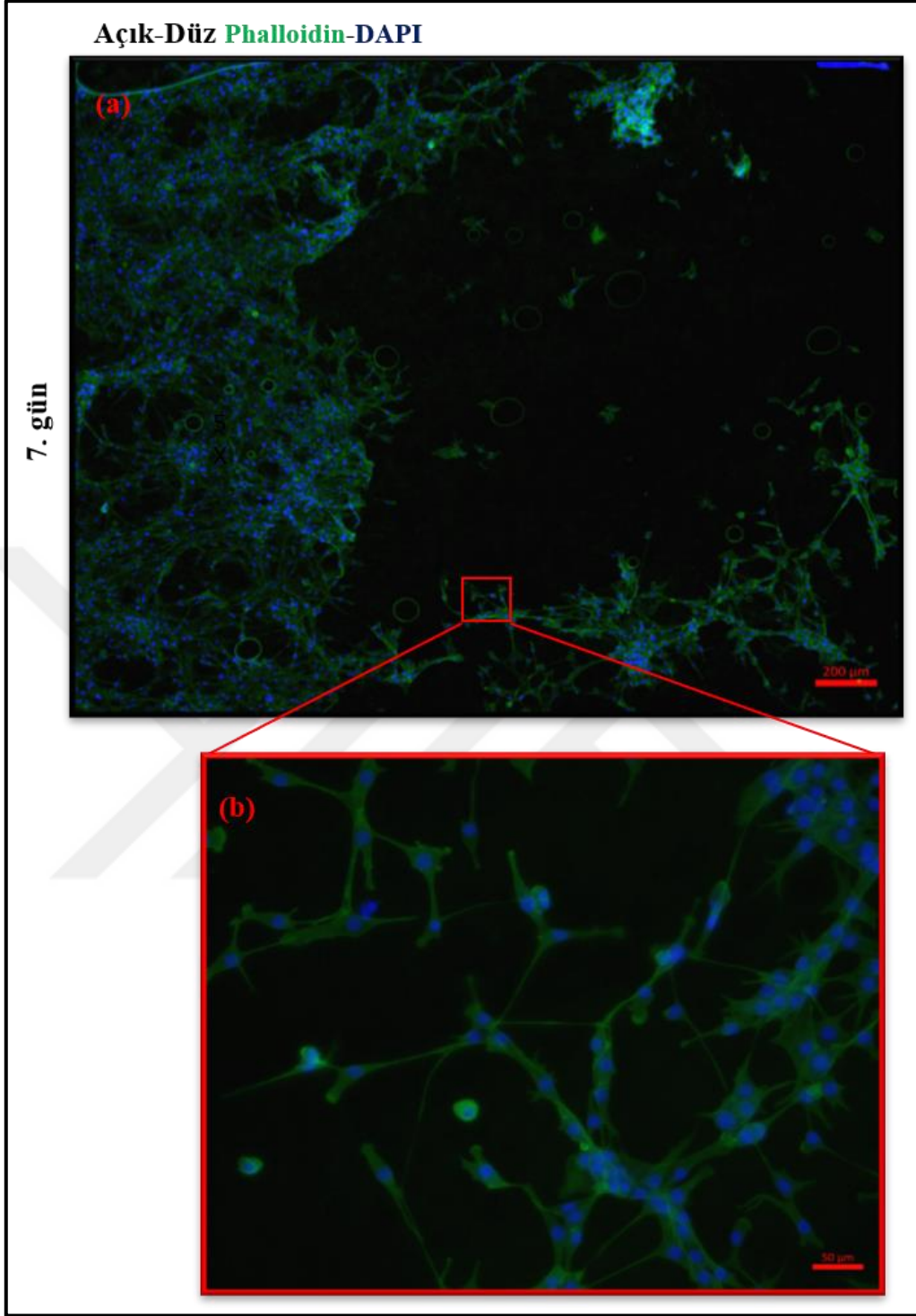
Rulo şeklinde katlanarak kültür edilen örneklerden alınan kesitler sadece 7. günde boyamaya tabi tutulmuştur. Rulo-30° için Şekil 5.37.'de boyama görüntüleri verilmiştir. Rulo halindeki kesit görüntülerinde desenler ayırt edilememiştir. Ana gövde üzerinde yer alan hücrelerin içten dışa doğru bir halka şeklinde yönlendiği gözlenmiştir (a). Hücre morfolojisi enine kesit alındığı için çok net seçilememekle birlikte, hücre çekirdeği ve f-aktin görüntüsü üst üste bindirildiğinde eşleştikleri görülmektedir (b).

Rulo-90° grubu için boyama görüntüleri Şekil 5.38.'de verilmiştir. Rulo-30° grubu ile benzer şekilde bir hücre ve çekirdek morfolojisi izlenmiştir. Hücre yoğunluğu, açık gruplardaki gibi heterojen olarak gözlenmiştir. Kesit görüntülerinde desenler ayırt edilememiştir. Enine kesitte Phalloidin boyamasından halka benzeri sinyaller alınmıştır.

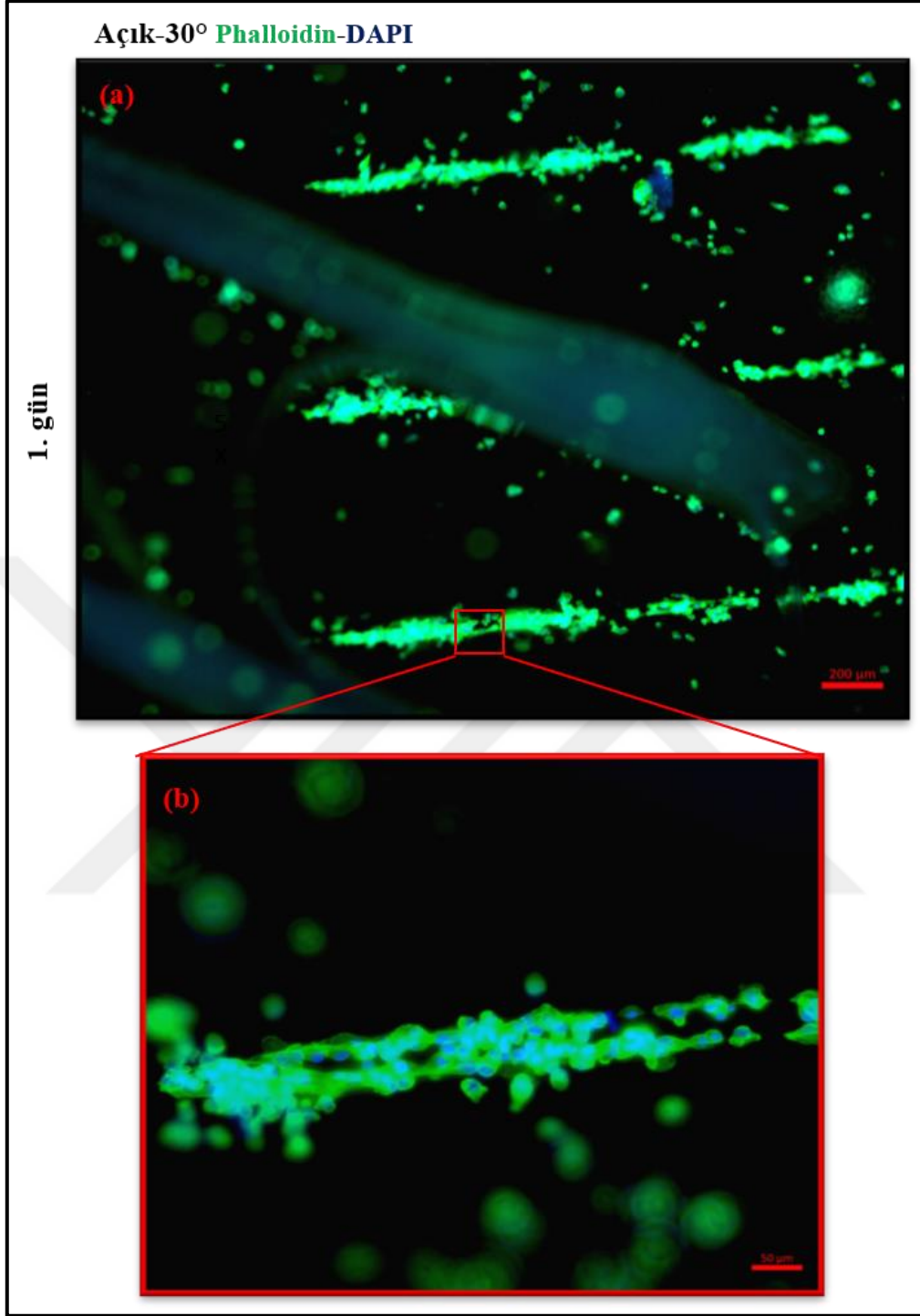




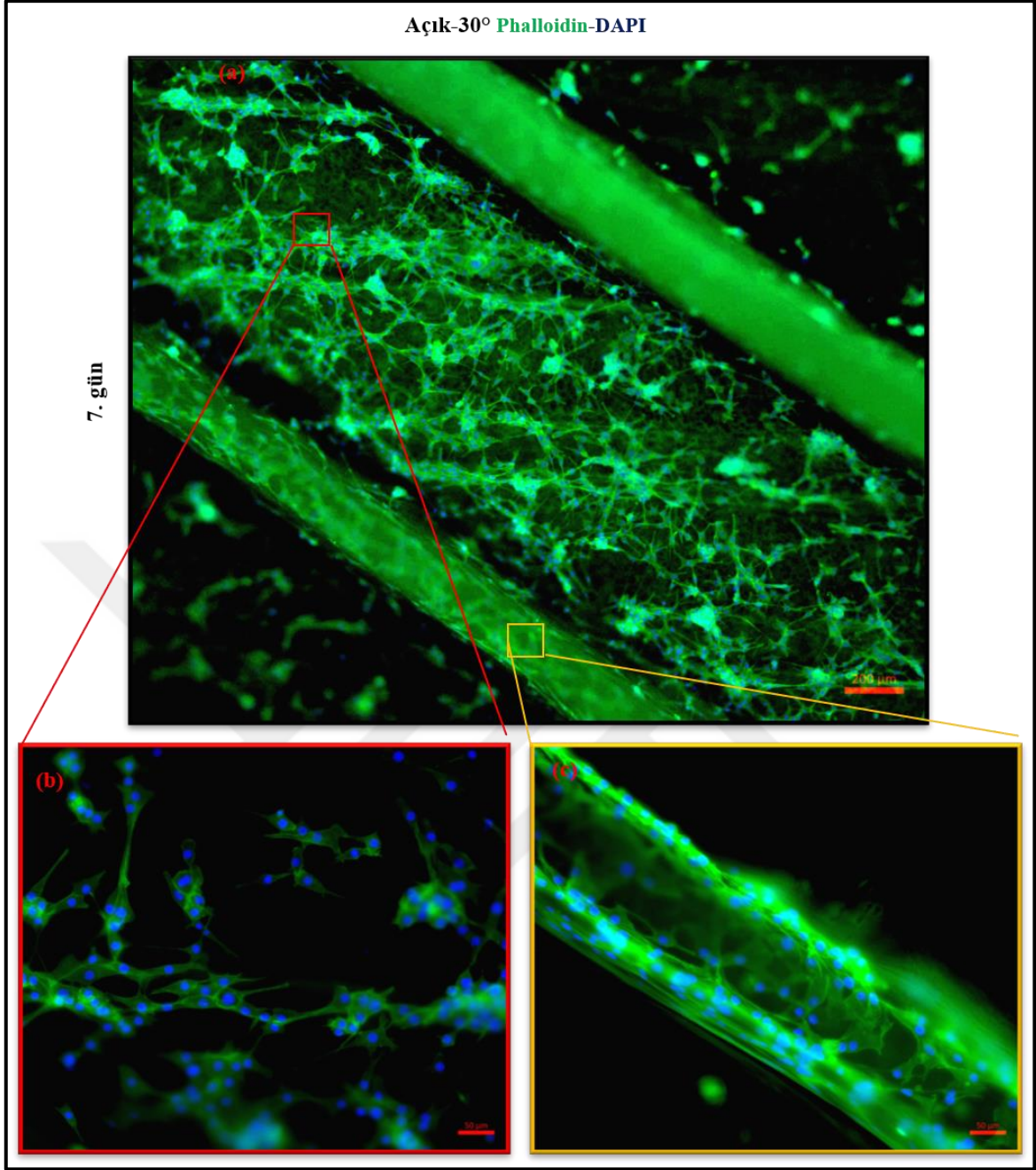
Şekil 5.31. Açık-Düz örneklerle 1. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 μm , (b) Ölçek: 50 μm



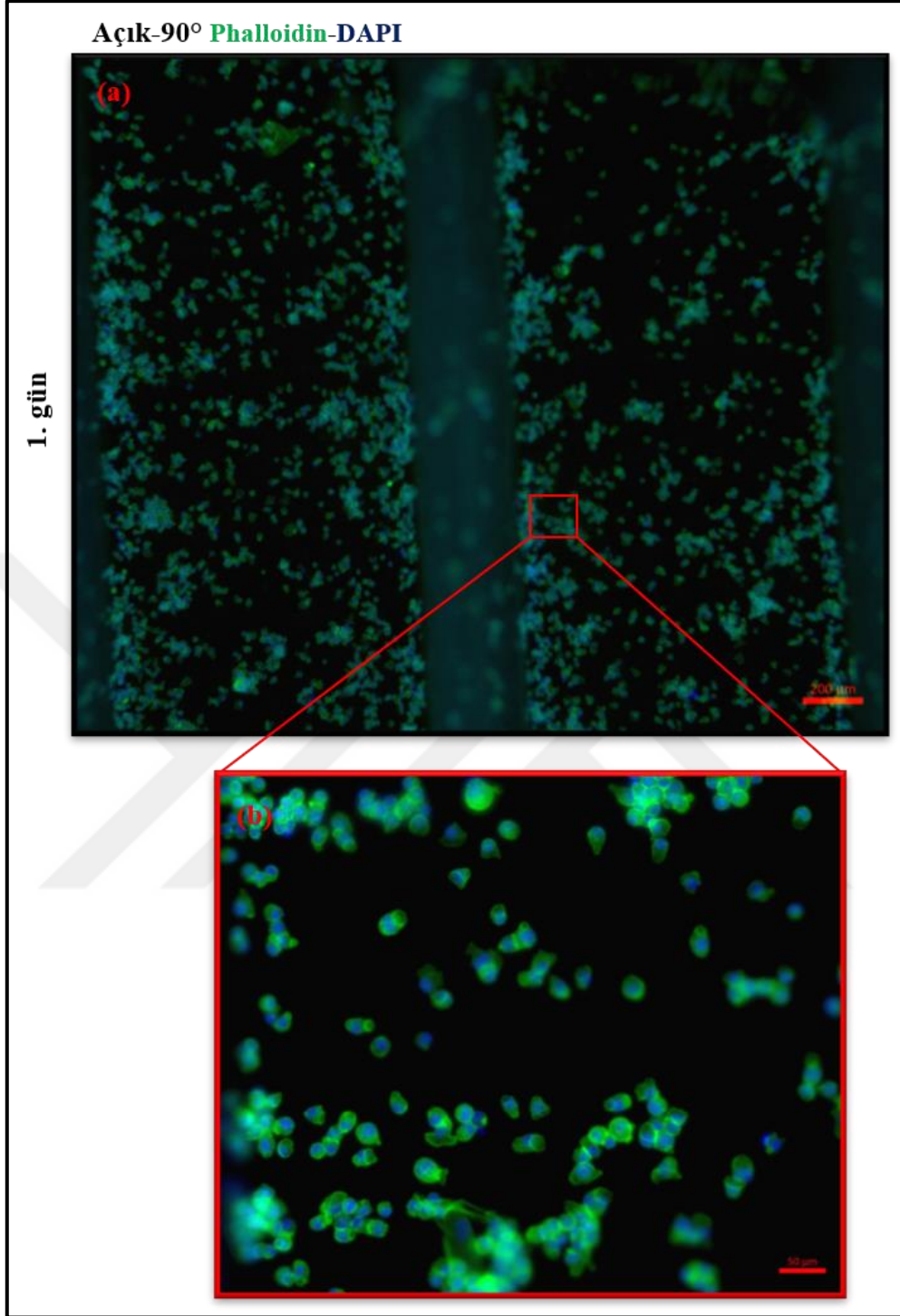
Şekil 5.32. Açık-Düz örneklerle 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 μm , (b) Ölçek: 50 μm



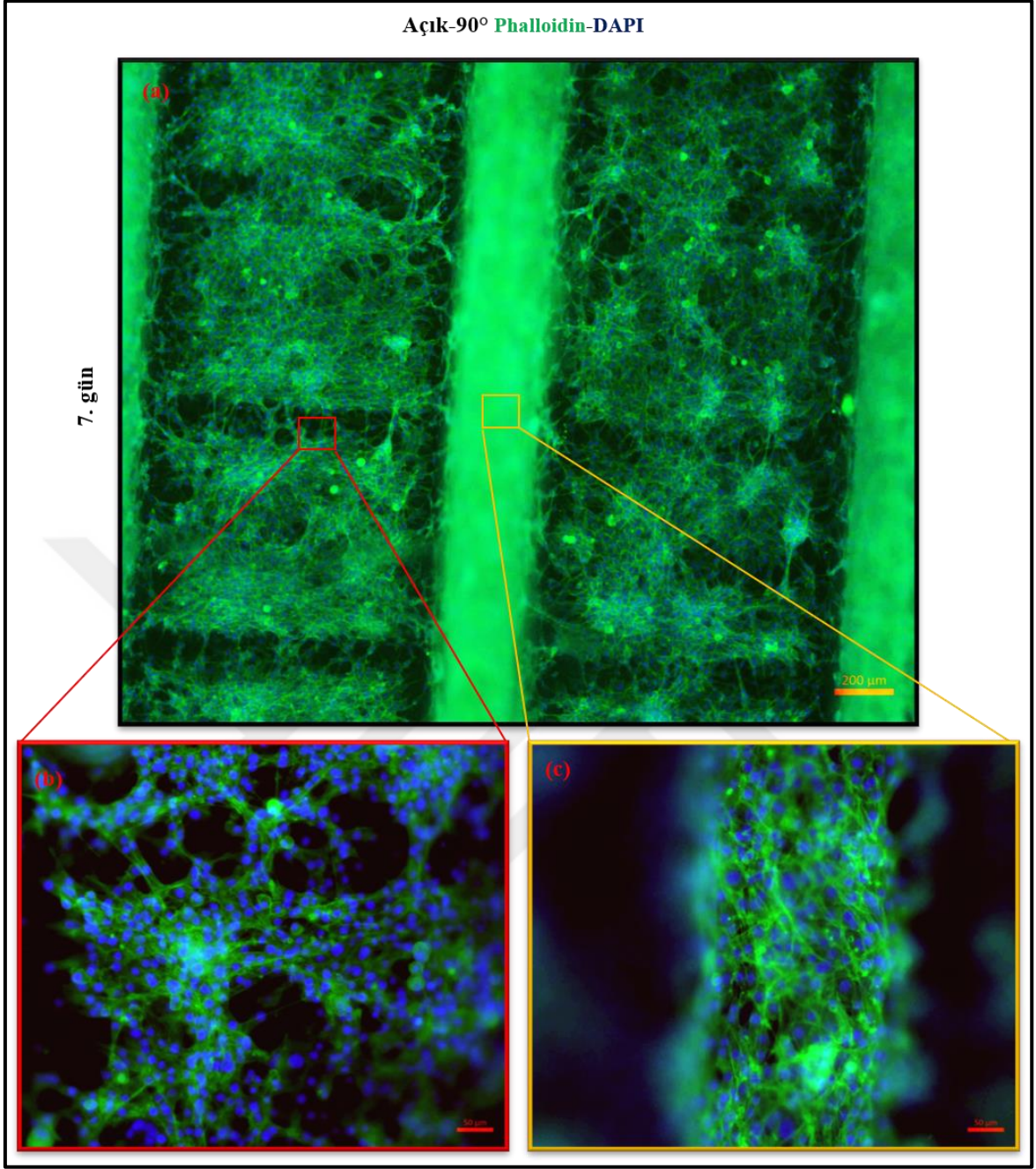
Şekil 5.33. Açık-30 örneklerine 1. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 μm , (b) Ölçek: 50 μm



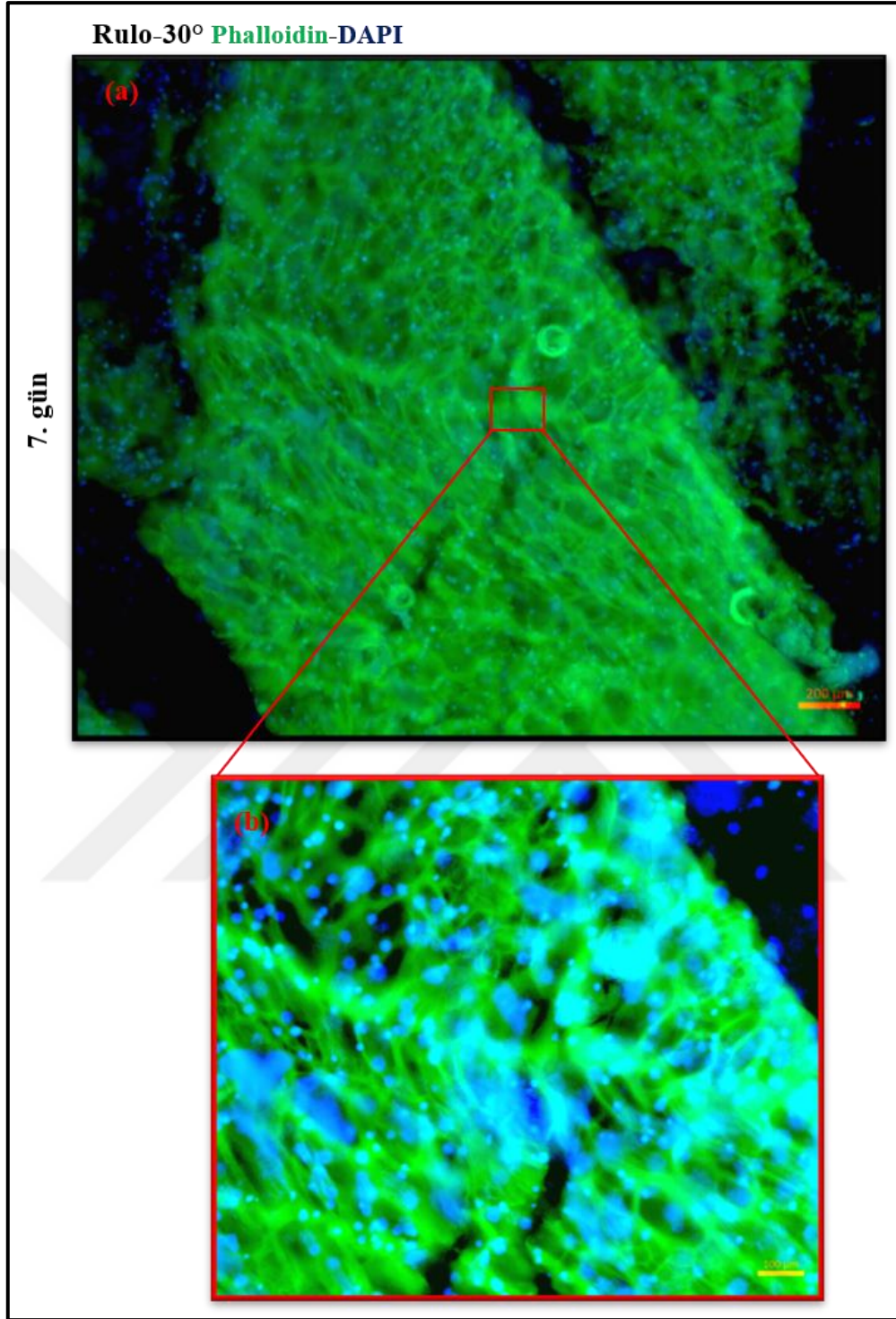
Şekil 5.34. Açık-30 örneklerle 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 μm , (b) Alt katmandan alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 μm (c) Desen üzerinden alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 μm



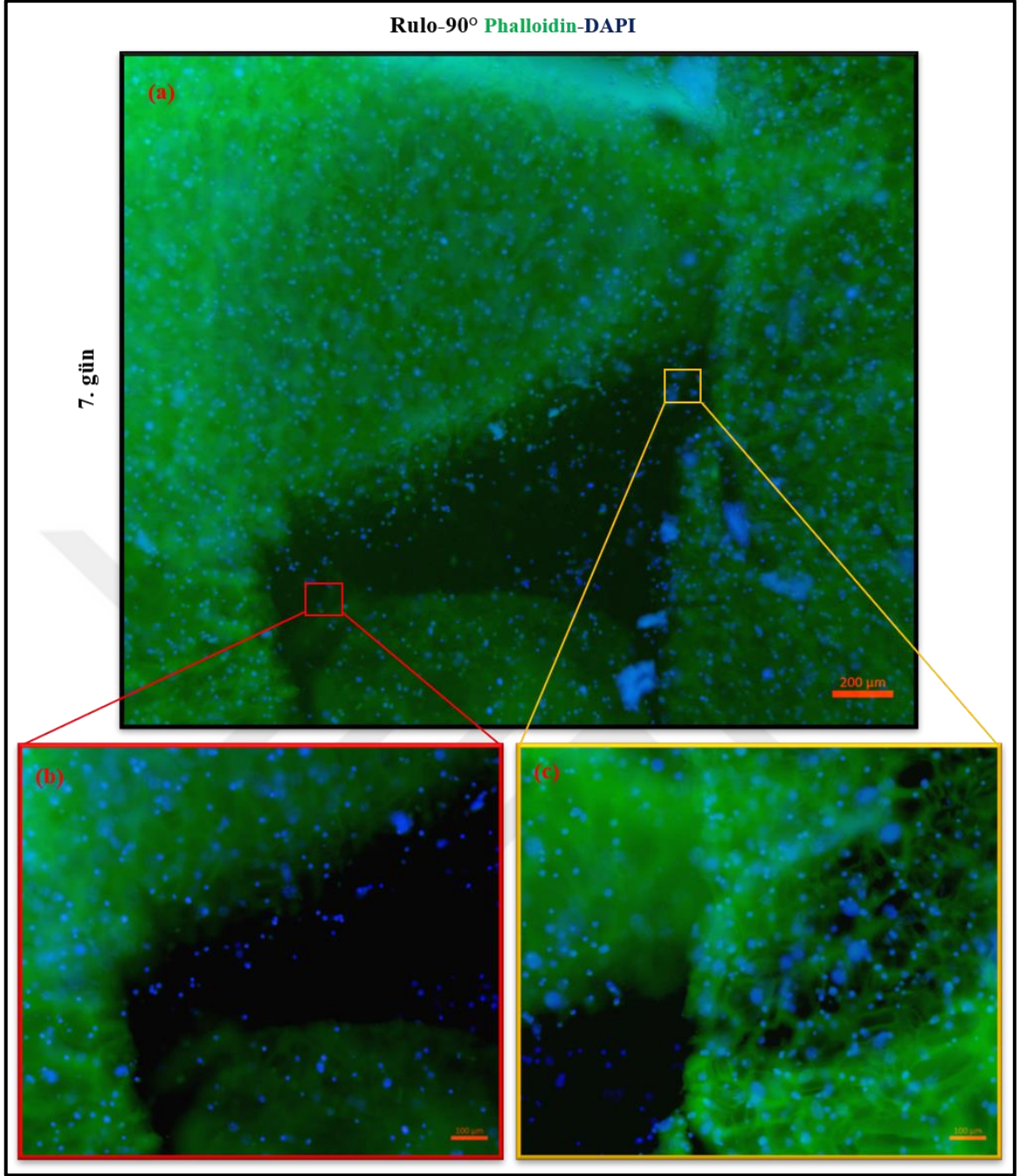
Şekil 5.35. Açık-90 örneklerine 1. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 μ m, (b) Ölçek: 50 μ m



Şekil 5.36. Açık-90 örneklerine 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Alt katmandan alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm (c) Desen üzerinden alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm



Şekil 5.37. Rulo-30 örneklerle 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Ölçek: 50 µm



Şekil 5.38. Rulo-90 örneklerle 7. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, farklı bölgelerden alınmış yakınlaştırmalar; (b) Ölçek: 50 µm (c) Ölçek: 50 µm

5.2.6. İMMÜNFLORESAN BOYAMA BULGULARI

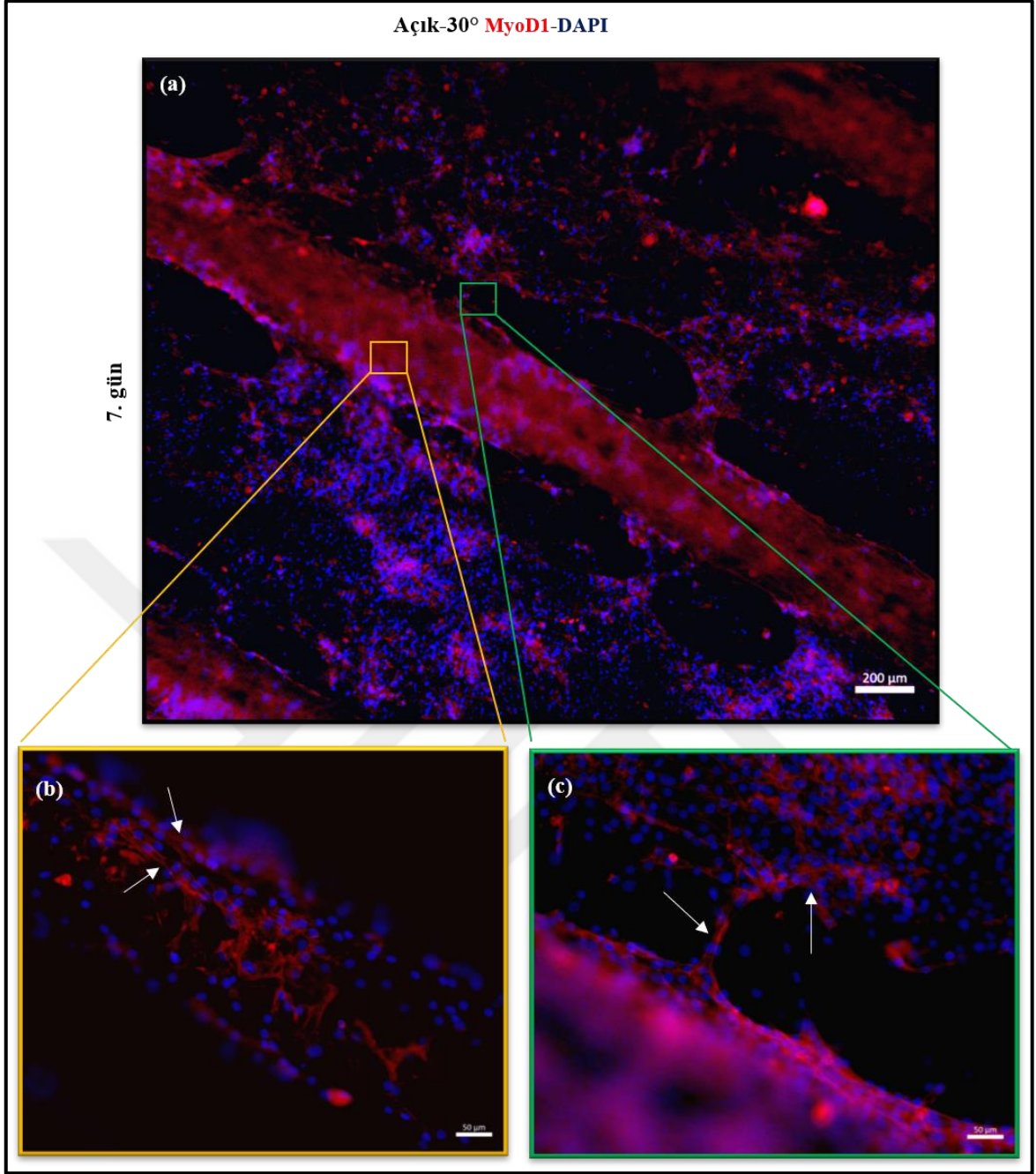
30° ve 90° desenli örnekler hem açık halde hem de rulo halde kültür edildikten sonra 7. günde MyoD1 belirteci ile muamele edilmiştir. Kas spesifik bir belirteç olan MyoD1, kas hücresi farklılaşmasında düzenleyici etkisi olan bir proteindir.

Açık-30° grubundan alınan MyoD1/DAPI boyama floresan mikroskopi görüntüleri Şekil 5.39.'de verilmektedir. Örnek üzerinden hem alt katmandan hem de desen üzerinden ayrı ayrı görüntü alınmıştır. Hücre yoğunluğuna kıyasla MyoD1 belirtecinin desenler üzerinde alt katmana kıyasla çok daha fazla ifade edildiği gözlenmektedir (a). Desenler üzerinde MyoD1 ifadesi, yoğunlukla desen kıyısına yakın kısımlarda artmaktadır. Beyaz okla gösterilen kısımlarda füzyona uğramış çok çekirdekli hizalanmış hücreler görülmektedir (b). Alt katmanlar üzerinde ise desenlere nispeten daha az ifade gözlenmektedir. Hücre çekirdeğinden anlaşıldığına göre hücrelerin alt katman geneline yayıldığı anlaşılmaktadır. Ancak daha çok desenler etrafındaki hücrelerin hem kendi içlerinde hem de desendeki hücre grubuyla füzyona uğrayarak çok çekirdekli hücreleri oluşturdukları gözlenmektedir (c).

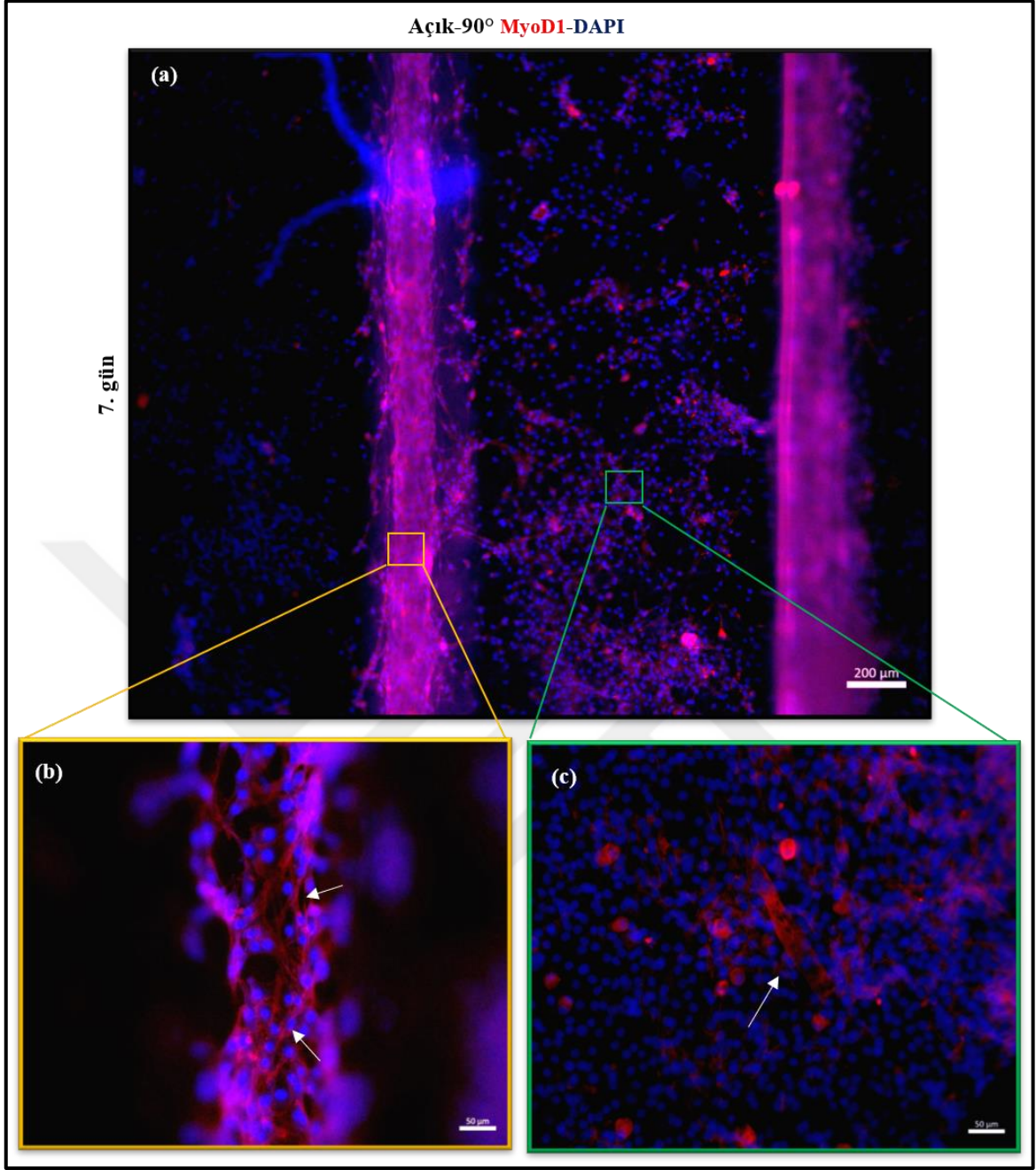
Açık 90° grubundan alınan MyoD1/DAPI boyama floresan mikroskopi görüntüleri Şekil 5.40.'da verilmektedir. Örnek üzerinden hem desenlerden hem de alt katmandan ayrı ayrı yakınlıştırmalar yapılmıştır. Açık-30° grubuna benzer şekilde bu grupta da MyoD1 belirteci hücre yoğunluğuna kıyasla desenler üzerinde bariz şekilde daha fazla ifade edilmiştir (a). Açık-30° grubundan farklı olarak Açık-90° grubunda desenler üzerinde MyoD1 ifadesi tüm deseni boydan boya kaplamıştır. Füzyona uğramış çok çekirdekli hücreler desenler üzerinde yoğun şekilde gözlenmektedir (b). Alt katmanlar üzerinde ise desenlere nispeten daha az ifade gözlenmektedir. Hücre çekirdeği dağılımından alt katmanın hücrelerle kaplı olduğu sonucu çıkarılmıştır. Ancak MyoD1 ifadesinin desenlerle etkileşim kuran hücreler etrafında yoğunlaştığı dikkat çekmektedir (c).

Rulo-30° grubundan alınan kesitlerin MyoD1/DAPI boyama floresan mikroskopi görüntüleri Şekil 5.41.'da verilmektedir. Bu grupta örneklerin iç yapısında kalan desenler ayırt edilememiştir. Bu örneklerde MyoD1 ifadesinin iç kısımlarda yoğun olduğu gözlenmektedir. İç kısımlardan orta kısımlara doğru MyoD1 ifadesinin azaldığı gözlenmektedir.

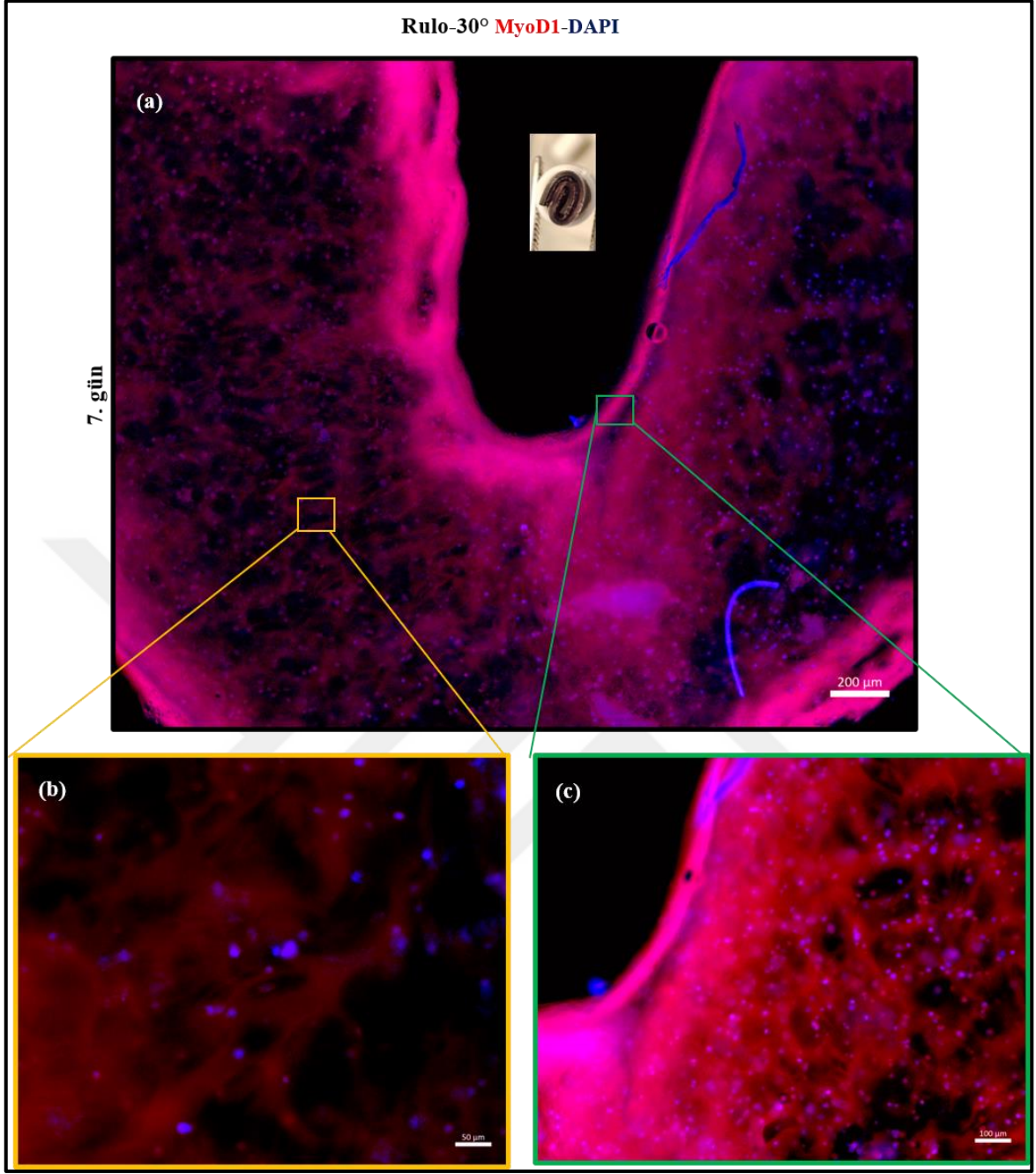
Rulo-90° grubundan alınan kesitlerin MyoD1/DAPI boyama floresan mikroskopi görüntüleri Şekil 5.42.'de verilmektedir. Bu grupta desenlerden birinin izlenmesi başarılmıştır. Desen ve alt katman anlaşılması açısından beyaz kesikli çizgiler ile görüntü üzerinde gösterilmektedir. Açık gruplardakine benzer şekilde desen bölgesinin orta bölgelere göre MyoD1 ifadesi seviyesinin daha fazla olduğu gözlenmektedir. Hem hücre çekirdeği popülasyonu hem de MyoD1 ifadesi açısından, Açık gruba kıyasla bu örnekler daha homojen bir yapı sergilemektedirler. Ayrıca, bu örnekte iç kısımlarda füzyona uğramış çok çekirdekli hizalanmış hücreler olduğu, hücre çekirdeği sinyali ve MyoD1 sinyalinin çakıştığı noktalarda gözlenmektedir (c). Hesaplanan MyoD1 hücre çekirdeği başına ortalama boyama yoğunluğu grafiği Şekil 5.43'de verilmiştir. Grafiğe göre her iki grupta da 30° ve 90° desenli modeller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir boyama yoğunluğu farkı gözlenmemiştir. Diğer yandan Rulo edilmiş grubun hücre çekirdeği başına MyoD1 boyama yoğunluğu, Açık gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek bulunmuştur.



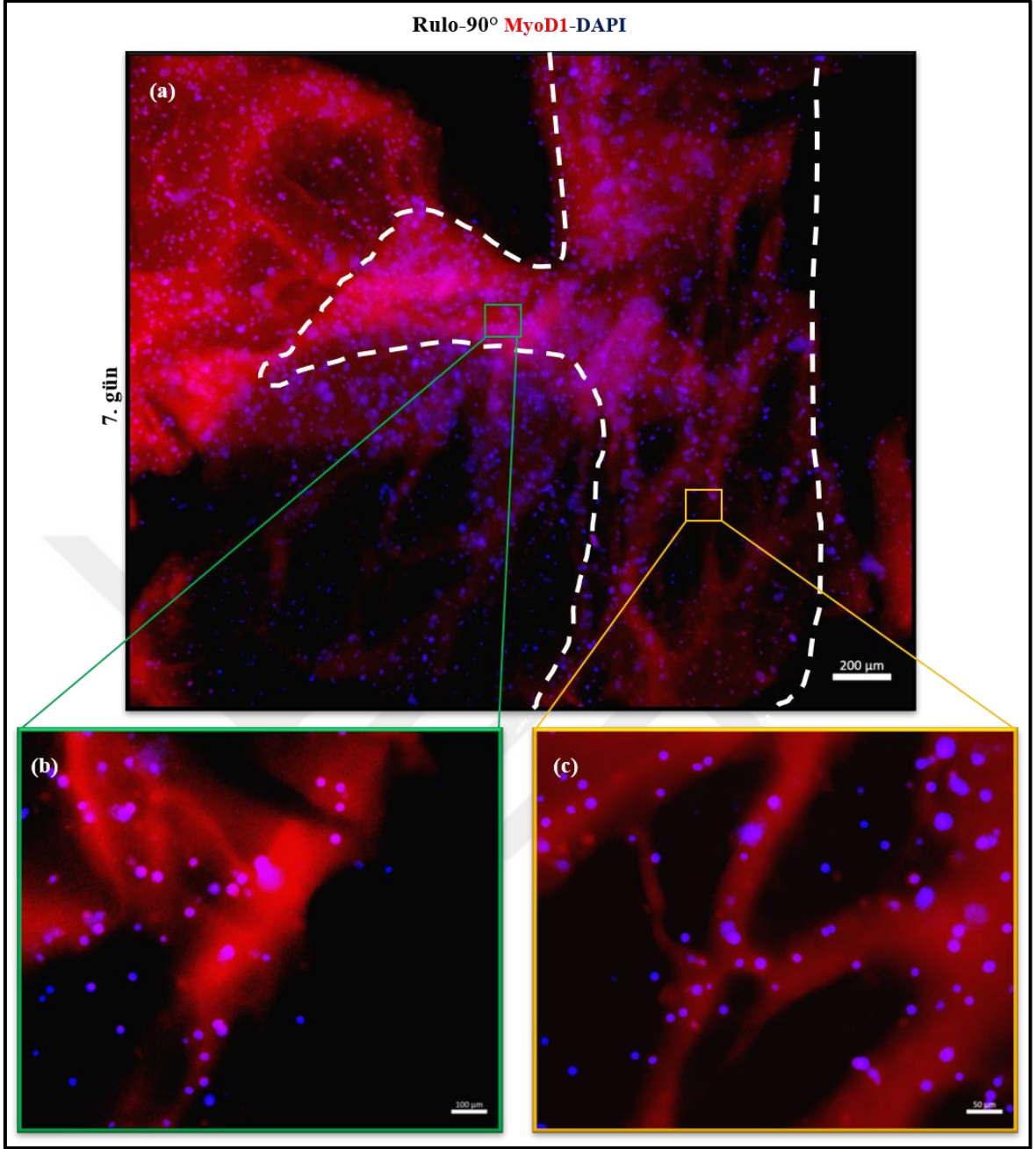
Şekil 5.39. Açık-30 örneklerle 7. günde yapılan MyoD1/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, (b) Desen üzerinden alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm (c) Alt katmandan alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 µm



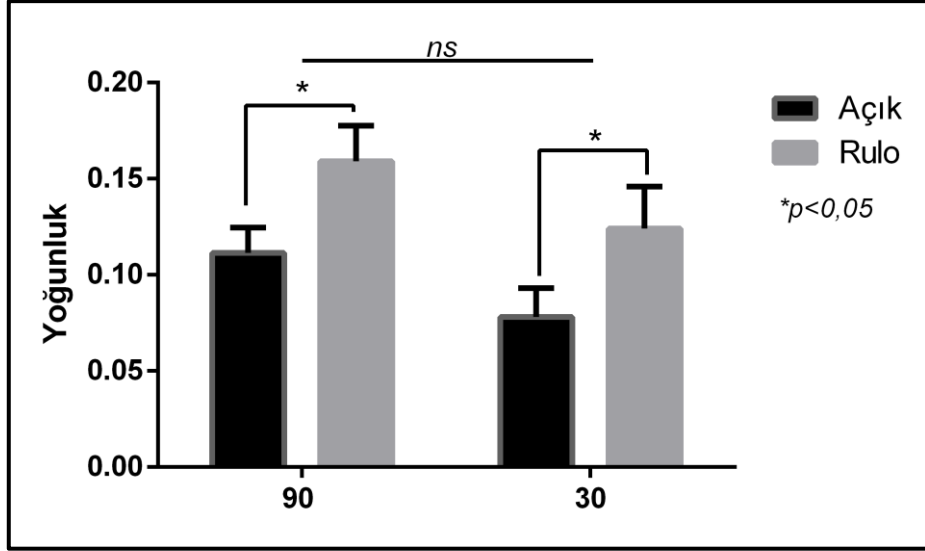
Şekil 5.40. Açıık-90 örneklerle 7. günde yapılan MyoD1/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 μm , (b) Desen üzerinden alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 μm (c) Alt katmandan alınmış yakınlaştırma. Ölçek: 50 μm



Şekil 5.41. Rulo-30 örneklerden alınan kesitlere 7. günde yapılan MyoD1/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm. Farklı bölgelerden yakınlaştırmalar; (b) Ölçek: 50 µm (c) Ölçek: 100 µm



Şekil 5.42. Rulo-90 örneklerden alınan kesitlere 7. günde yapılan MyoD1/DAPI boyaması. (a) Ölçek: 200 µm, Farklı bölgelerden yakınlaştırmalar; (b) Ölçek: 100 µm (c) Ölçek: 50 µm



Şekil 5.43 MyoD1 hücre çekirdeği başına ortalama boyama yoğunluğu. ImageJ programı kullanılarak Açık ve Rulo örnekleri arasındaki MyoD1 boyama yoğunluğunun farkı.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

6.1.1. SICAKLIK DUYARLI HİDROJEL PLATFORMU ÇALIŞMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bir akrilamid türevi olan P(NIPAm), en yaygın kullanılan sıcaklığa duyarlı polimerlerden biridir. Bu polimerin en önemli özelliklerinden biri, doğrudan ısıtma ve soğutma döngüsü uygulandığında, sahip olduğu hidrofilik ve hidrofobik gruplar arası sıcaklığa bağlı bir faz geçişi göstermesidir (82). Düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) adı verilen sıcaklıkta gerçekleşen bu faz değişimi sayesinde su emme (ing. swelling) ve büzüşerek suyu bırakma (ing. shrinking) kapasitesinde dikkate değer değişiklikler meydana gelmektedir. Fizyolojik sıcaklıkların (37°C) altında bir LCST sıcaklığına (32°C) sahip olması, NIPAm'ı biyolojik uygulamalar için uygun bir aday yapmaktadır. Ancak, doğrudan ısıtma ve soğutma yöntemi, özellikle P(NIPAm) tabanlı platformların katlanma kontrolünde sorunlara neden olabilir. Liu ve arkadaşları, değişen dalga boylarına sahip bir ışık kaynağı kullanarak kontrollü bir şekilde renkli menteşelerle önceden gerilmiş polistiren (PS) levhaları katlamak için bir teknik göstermiştir (83). Bu renklendirilmiş malzemeler ışığı belirli bir dalga boyunda emdikçe, ışık tarafından üretilen ısı nedeniyle renkli alanların sıcaklığı artar ve PS tabakalarının katlanmasına neden olur. Işık kaynağının dalga boyu ve boya tarafından yapılan absorpsiyon miktarı, bu kendi kendine katlanma stratejisinde anahtar parametrelerdir.

6.1.1.1. Katman Tasarımının Etkisi

Hidrojel platformları, iki katman sıcaklığa duyarlı malzeme ve bir katman pasif, yanıt vermeyen malzemeye sahip olacak şekilde üç katmanlı olarak üretildi. Burada pasif katman aktif katmana bir yük olarak tasarlanmaktadır. Pasif katmanın temelde amacı farklı uygulamalar için hidrojel platformunun modifiye edilebilme kabiliyetini ölçmektir. Örneğin bu katman hücre yüklü olabilir ya da ilaç taşıyabilir. Bu tasarım sayesinde aktif katmanın uyarı altında değiştireceği şekille birlikte pasif katmanı da kendisiyle birlikte hareket ettirip ettiremeyeceği analiz edilmiştir.

4.2.1.1. bölümünde anlatıldığı şekilde üretilmiş olan ilk örnekler desen renklendirmesi içermemekteydi ve sadece aktif desen katmanı ve pasif katman olmak üzere iki katmandan

meydana gelmekteydi. Sadece iki katmandan meydana gelen örneklerde LCST sıcaklığının üzerinde aktif katmanda faz geçişi göstergesi olan şeffaflıktan beyaz renge dönüşüm gözlenmiş olsa da herhangi bir hareket meydana gelmemiştir.

Uygulanan tasarım, platformun hareketini kontrol etmek için şu şekilde çalışır; aktif hidrojel katmanı, oda sıcaklığında tepki vermeyen kısım ile birlikte sulu bir ortamda şişer. Ortamın sıcaklığı arttıkça aktif katmanın hacmi hızla küçülmeye başlarken, tepki vermeyen katmanın hacmi hemen hemen sabit kalır. Büzülmedeki bu fark, katmanlar arasında bir gerilim yaratır ve platformun kendi kendine katlanmasına neden olur. Ancak, iki katmandan meydana gelen örneklerde bir hareket gözlenmemesi, desenlerin pasif katmanı kendileri ile birlikte kaldıracak yeterli gerilimi üretilmediği şeklinde değerlendirilmiştir. Bu sorunu aşmak için pasif katmanın yüzeyini kaplayacak şekilde yapıya ikinci bir aktif katman (orta katman) eklenmiştir. Bu tasarımdaki orta katmanın işlevi, katmanlar arasındaki gerilimi artırarak desenlerin dikte ettiği hareket yönünü pasif katmana iletmektir.

6.1.1.2. Direkt Isıtmanın Hidrojel Platformlar Üzerine Etkisi

İlk deneylerde aktif katmanlar, ışıkla aktive edilmek yerine, doğrudan LCST'nin üzerinde bir sıcaklığa ($\sim 40^{\circ}\text{C}$) ısıtılan su ortamı içinde aktive edilmiştir. Direkt olarak ortamın ısıtılması, örneklerin istenildiği şekliyle homojen olarak katlanmasını sağlayamamış bunun yerine rastgele büzölmeler gözlenmiştir (Şekil 5.2.). Sıcaklığın sabit olduğu 75 dk'lık bu deneyde faz değişim göstergesi olan şeffaflıktan beyaz renge dönüşüm 15. dk'dan itibaren görölmeye başlamıştır. Bazı desenler diğerlerinden daha önce beyazlamaya başladığı için ortamdaki ısıya sıcaklık geçişinin homojen olarak sağlanamadığı düşünülmektedir. Ancak bu özelliğin, yani desenlerin altındaki aktif katmandan önce ısınmasının, desenlerin hacminde öncelikli bir azalmaya yol açtığını bunun da hareket yönünü belirlediği anlaşılmıştır. 45. dk'dan sonra tüm desenin aktive olduğu Şekil 5.2.'den görölmektedir. 75 dk sonunda örneğin homojen olmayan bir şekilde rastgele büzüldüğü değerlendirilerek deney sonlandırılmıştır.

6.1.1.3. Katlanma Kontrolünün Işık Aydınlatması ile Sağlanması

Direkt ısıtma yönteminde istenilen kontrollü katlanmanın sağlanamaması nedeniyle, örnekler üzerindeki sıcaklık artışının homojen şekilde artırılması ve ayrıca ölçülen tepki

süresinin (30-45 dk) de kısaltılmasının gerekli olduğu görülmüştür. Bu noktadan hareketle, tüm ortamın ısıtılmasından ziyade sadece aktif katmanların homojen şekilde ısıtılması fikri doğmuştur. Aktif katmanlar üzerinde yoğunlaşacak bir aydınlatmanın ısıyı o bölgede artıracığı ve katlanma kontrolünün izleneceği deney düzeyi Şekil 4.3. (d)'de gösterildiği şekliyle kurulmuştur. Mavi bir LED ışık (470 nm, 50 W) ile muamele edilen örneklerde istenildiği şekliyle bir hareket gözlenememiştir. Işığın ortam sıcaklığını da artıramadığı 40 dk.'lık deneyde LCST sıcaklığına ulaşamadığı izlenmiştir (Şekil 5.3.).

LCST sıcaklığını hızlı bir şekilde belirlenen bölgede (lokal olarak) aşmak için, gönderilen mavi ışığı absorbe etmesi planlanan desenler daha fazla ışığı emmek için renklendirilmiştir. Üç farklı derişimde yapılan renklendirme sonrası hacimce %3'lük renklendirmenin en uygun miktar olduğu anlaşılmıştır (Şekil 5.4.). %1'lik renklendirmenin ışık absorpsiyonu için yetersiz kaldığı, %5 renklendirmenin ise polimer solüsyonunu seyrelterek tepki süresi ve katlanma açısını olumsuz etkiledikleri düşünülmektedir.

Aktif renkli desenlerin iki işlevi vardır: Birincisi, desenler hareketin yönünü belirler ve ikincisi, renklendirme, hareketin kontrolünü sağlayacak bir öncül ısınma sağlar. Boyalar tarafından ışığın emilmesi nedeniyle renkli desenler, renksiz orta aktif katmandan önce düşük kritik çözelti sıcaklığına (LCST) ulaşarak hareketi başlatır. Isınma ışıkla devam ettikçe ısı renksiz orta aktif katmana da yayılır ve bu katmanda LCST'yi geçer. Akabinde kendisine bağlı pasif katmanı desenlerin belirlediği yönde kaldırarak katlamayı tamamlar. Doğrudan ısıtmaya göre, örnekler üzerinde ışık aydınlatması ile ısı üretimi, yalnızca sıcaklığa bağlı olarak ayarlanabilir bir faz geçişine izin vermekle kalmamış, aynı zamanda platformlar için çok daha hızlı bir katlama oranı sağlamıştır (Şekil 5.5. (b)).

Platformlar üzerindeki hareketin temeli katmanlar arası yüzey gerilimidir. Bir ışık kaynağından aktarılan enerji ile hidrojel üzerindeki belirli bir alanın lokal olarak ısıtılmasına dayanmaktadır. Hidrojel platformunda akrilik boylarla renklendirilen spesifik alan öncelikle ışığı emer ve ısı artışına neden olur. Bu lokal ısı artışı, lokal bir büzülmeye neden olur. Boyanın ışık emme oranı ne kadar yüksek olursa katlanmanın o kadar hızlı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.5. (b) ve (c)). Liu'nun çalışması, boyanın ışık emme kapasitesinin, ışığın dalga boyu ve boyanın rengi tarafından belirlendiğini ve sarı rengin, mavi ışığı diğer renklere göre daha fazla emdiğini rapor etmektedir (83). Araştırma bulgularımızda da

gördüğümüz üzere, sarı renkli desenler üzerindeki ısı diğer renkli desenlere göre daha erken ve daha fazla gerçekleşmiştir. Bu durum da hem tepki süresini daha aşağıya çekmiş hem de uygun desenle bir araya getirildiğinde istenilen son şeklin hem tübüler hem de dört kol kapanması, elde edilmesini sağlamıştır.

6.1.2. 4B BASIM İLE ÜRETİLEN TAŞIYICI İSKELE SİSTEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızın bu bölümünde, hücre canlılığı ve yayılması için uygun bir yapı olan jelatin malzemesinin 4B basım stratejisi üzerinde durulmuştur. Jelatin %85-90 oranında protein, mineral tuzlar ve sudan oluşan biyo-uyumlu olduğu iyi bilinen bir polimerdir (84,85). Tip I kolajenin bir türevi olan jelatin çok çeşitli gıda, kozmetik ve farmasötik uygulamalarda kullanılmaktadır (86). Genellikle kolajenin üçlü sarmal yapısının ısı ve enzimatik denatürasyon gibi işlemlerle geri dönüşümsüz şekilde hidrolizlenmesiyle elde edilir. Bu nedenle, jelatin kolajene çok benzer bir moleküler bileşime sahiptir (87). Kolajenin hücre ECM'nin ana bileşenlerinden biri olduğu düşünüldüğünde, jelatin, *in-vitro* hücre gelişim için kolajen gibi benzer biyo-uyumlu malzeme işlevlerini yerine getirme kapasitesine sahiptir. Jelatin sığır kemikleri, balık, domuz derisi gibi çeşitli kaynaklardan kolaylıkla elde edilebilir olması açısından da ekonomiktir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen jelatinin biyo-uyumluluğu üzerine yapılan çalışmalar, memeli hücrelerinde toksisite, antijenite ve diğer olumsuz etkilere neden olmadıklarını göstermiştir. Ancak toksisite, jelatini çapraz bağlamak üzere kullanılan çeşitli reaktiflere bağlı olarak ortaya çıkabilir (88).

Jelatin kullanımı aşağıdaki nedenlerle kolajen gibi ECM proteinlerine göre popülerlik kazanmıştır: (i) ECM proteinlerine göre ucuz ve kolay temin edilebilir. (ii) ECM proteinlerine göre kolay çözünebilir. (iii) Kolajenin hücre tutunması ve yayılımı için içerdiği önemli yapıları içerir. (iv) Farklı türlerden elde edilen jelatin diğer türler için çoğunlukla uyumludur, biyolojik olarak parçalanabilir ve hücrelerde antijenite ve toksisiteye neden olmaz (85). Bununla birlikte, doku mühendisliği için bazı dezavantajlara da sahiptir. Jelatin bazlı malzemeler zayıf mekanik özelliklere sahiptir ve nispeten daha kısa sürede biyo-bozunmaya uğrarlar (89).

Jelatin, çapraz bağlamasının kolaylaştırılması ve toksik reaktiflere gerek duyulmaması için metakrilat reaksiyonu ile foto-çapraz bağlanabilir hale getirilebilir. Literatürde jelatin

metakrilat (GELMA) adıyla bilinen bu polimer son yıllarda 3B hücre kültürü çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. UV ışık bu polimerin çapraz bağlaması için sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak UV ışığın hücre canlılığına verdiği zarar göz önüne alındığında daha düşük enerjili ışıklarla çapraz bağlamanın doku mühendisliği uygulamaları için daha uygun olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda görünür ışık dalga boyunda olan (470nm) mavi ışık kullanılmıştır. Mavi ışığın daha düşük enerjili olduğu göz önüne alındığında UV ışığın hücre canlılığına verdiği zarar elimine edilebilir.

GELMA gibi düşük viskoziteli malzemelerle 3B basım yöntemi kullanılarak çok katmanlı tasarımlar üretmek, katmanların yıkılması ya da birleşmesi nedeniyle çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Bu sorunları aşmak için vizkozite veren ek hidrojeller kullanmak, destek banyosuna basım yapmak, tasarım dışından destekler basmak, her katman basımı sonrası çapraz bağlama yapmak gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Ancak bu tekniklerin de dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin; destek banyosu ya da dış destek kullanımı iğne ucunun tıkanması ve destek temizleme gibi ek adımlar gerektirmesi nedeniyle istenilen şeklin basılmasını güçleştirmektedir ya da basımı kolaylaştıran vizkozite artışının hücre canlılığına ve yayılımına negatif etkisi bulunmaktadır. Bu tekniklere alternatif olarak, 4B basım tekniği de son yıllarda ilgi çekmektedir. Kısaca 4B basım, 3B basım ile ilk şekli verilmiş basit ve nispeten daha az katmanlı bir tasarımın, haricen verilen bir etki ile belirli bir zaman aralığında daha kompleks olan son şekline evrilmesi olarak tarif edilebilir. Bu tezde, düşük vizkozite ile kas dokusu hiyerarşisine benzer nitelikte iç içe geçirilmiş rulo bir yapının üretimi, 4B basım stratejisi ile ele alınmıştır.

6.1.2.1. GELMA Üretiminin Değerlendirilmesi

Manuel pH ayarı gerektirmediği ve laboratuvarında hali hazırda sıklıkla kullanılan bir tampon olması nedeniyle ilk olarak PBS tamponu yöntemi kullanılarak sentez gerçekleştirilmiştir. Ancak bu sentezlenen GELMA'lar 1 dk'dan kısa süreli ışık maruziyeti ile çapraz bağlanamamıştır (Şekil 5.8.). Bu nedenle literatürde sıklıkla kullanılan diğer bir yöntem olan CB tampon sentezi yapılmıştır. Diğer yandan, iki farklı reçete ile üretilen GELMA'lar liyofilizasyon sonunda kuru ağırlıkları açısından değerlendirildiğinde PBS tamponu ile üretilen grupta reaksiyon sonunda, başlangıç jelatin kuru ağırlığının ortalama %30'u elde edilmiştir. CB tamponu kullanılarak üretilen gruptan ise yaklaşık %75 verim alınmıştır (Şekil 5.9.). GELMA ilk olarak Van Den Bulcke vd. tarafından PBS tampon kullanılarak

üretilmiştir (90). Kısacası; GELMA jelatinin 50°C PBS tamponu içinde çözülmesiyle, yapısında bulundurduğu lizin ve hidroksilizin gruplarının, MAA monomerleri ile reaksiyona sokulmasıyla elde edilmiştir. Teoride bir MAA molekülünün bir lizin grubuyla reaksiyona girmesi beklenirken, yüksek ikameli (DS, degree of substitution) bir GELMA sentezleyebilmek için gerçekte çok daha fazla kat MAA gerekmektedir. Çünkü serbest amino gruplarının MAA ile reaksiyona girebilmesi için nötr tutulması gerekmektedir (91). Orijinal metodun verimliliğin artırılması için literatürde yapılan çalışmalar, reaksiyonun bir yan ürünü olarak açığa çıkan metakrilik asitin ortam pH'ını çok aşağı çektiğini ve PBS (pH 7,4) tamponun pH koruması için yeterli olmadığını açığa çıkarmıştır (92). CB (pH 9) tampon ile reaksiyon sürecinde pH'ın sürekli kontrol edilerek üretildiği GELMA'ların hem daha yüksek verimle hem de daha yüksek ikame derecesi ile üretildiği rapor edilmiştir (79).

Çalışmamızda %verim açısından ölçtüğümüz GELMA'lar literatür bulguları ile uyumludur. Ayrıca CB tampon ile üretilen GELMA grubu mavi ışık altında 45sn-1dk. aralığında rahatlıkla çapraz bağlanırken, diğer grup 4 -5 dk. aralığında çapraz bağlanmıştır. Bu farkın da DS oranı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

6.1.2.2. Manyetik Substrat Üretiminin Değerlendirilmesi

3B basım ile üretilen hücre yüklü hidrojellerin basım sonrası dışsal bir etkiyle şekillerinin değiştirilmesi ve bu şeklin muhafaza edilmesi temelinde kurduğumuz 4B biyobasım stratejimiz için manyetik substratlar üretilmiştir. EcoFlex malzemesi çeşitli katkılarla manyetik hale getirilerek sürünme, yuvarlanma, sıvı taşıma için dalgalanma gibi çeşitli hareketler için kullanılmıştır (93). Bu tezde, EcoFlex substratlar manyetik özellikleri sayesinde bir yandan hücre yüklü hidrojelin rulo edilerek 4B özelliği göstermesini sağlarken diğer yandan kültür ortamında hücre iskelesi vazifesi gören hidrojele mekanik bir koruma da sağlamaktadır. 3B basılan her hidrojelin aynı şekilde ve eksende rulo haline getirilebilmesi yeniden üretilebilirlik anlamında önem taşımaktadır. Manyetik alan etkisiyle katlanan bu substratların katlanma aşamaları Şekil 5.10.'da verilmiştir. Görüntülerde katlama boynunun etkisi incelenmiştir. Başlangıçta mıknatıs ile manyetik substratın baş bölgesi üzerinde bir manyetik alan oluşturulmaktadır. Mıknatıs hareket ettirildikçe baş bölgesi değişen manyetik alanı içindeki demir tozlarının çekişi sayesinde takip eder. Eğer örnekte bir katlama boynu varsa bu manyetik alanı takip eden baş bölgesi için bir kırılma noktası görevi görmektedir. Baş bölgesi boyundan kırılarak gövde üzerine düştükten sonra

artık ağırlık merkezi bu katlanmış tarafa doğru kaymaktadır. Mıknatıs hareket ettikçe katlanan kısım bu değişen manyetik alanı takip eder ancak ağırlık merkezi nedeniyle çok geçmeden tekrar gövde üzerine katlanır ve rulo hareket bu şekilde sona kadar ilerler (Şekil 5.10. (a)). Tasarımda eğer kırılma noktası görevi görececek bir boyun bölgesi olmazsa baş bölgesi manyetik alanın tüm örneğin ağırlık merkezini geçeceği noktaya kadar havaya kalkar ve nihayet mıknatıs ağırlık merkezinin diğer tarafına geçtiğinde (yani örneğin yarısından fazlası havaya kalktığında) baş bölgesi örneğin uç bölgesi üzerine düzensiz bir katlanma gösterir (Şekil 5.10. (b)). Ayrıca farklı boyun-baş mesafesinin katlanma üzerine etkisi Şekil 5.11.'de verilmektedir. 4 mm altı uzaklıklar her ne kadar katlanabilse de hızlıca tekrar açılmaları ve tekrar edilebilirliklerinin düşük olmasından dolayı çalışmamızda tercih edilmemişlerdir.

3B basım çalışmalarında baskı malzemesinin vizkozitesi kadar basım yapılacak yüzeyin hidrofilitesi de önem taşımaktadır. Hidrofobik yüzeylere basım, eğer vizkozite düşükse yüzeye deposit edilen malzeme tasarımda verilen şekli koruyamadığı için mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, üretilen substratlar üzerine düzgün basım yapılabilen lam ve düzgün basım yapılamayan teflon malzemeler ile temas açıları ölçülerek karşılaştırılmıştır. Şekil 5.12.'de verilen temas açısı ölçüm sonuçlarına göre herhangi bir yüzey işlemi uygulanmamış EcoFlex substrat yüksek derecede hidrofobik çıkmıştır. Literatürde hidrofobik yüzeylerin temas açısını düşürerek hidrofilik özellik kazandırılan örnekler mevcuttur. Örneğin, Kuang vd. hidrofobik yüzeye sahip poliüretan yüzeyi UV-Ozon temizleyicisi ile hidrofilik hale getirmişlerdir (94). Literatürdeki bu verilerden yararlanılarak örnek yüzeylerimize UV-Ozon uygulaması yapılmıştır. Ancak 30 dk.'lık uygulamaya rağmen yüzey temas açısı 97°'den sadece 85°'e düşmüştür. Süre artırılmasının ilave bir etkisi olmadığı anlaşılmış ve yüzey temas açısının daha iyi performansla düşürülmesi için literatürde sıklıkla kullanılan APTES kaplama gerçekleştirilmiştir. Zeng vd. yaptığı çalışmada silikon substratların yüzeylerine yapılan APTES kaplaması sayesinde temas açıları düşürülmüş ve hidrofobik yüzeylere hidrofilik özellik kazandırılmıştır (95). Çalışmamızda UV-Ozon uygulaması ile 85°'ye düşürülmüş örneklerle yapılan APTES kaplamasının yüzeyin temas açısını 45°'ye düşürerek, hidrofilitesini dikkate değer şekilde arttırdığı anlaşılmıştır.

Hücre kültürü sürecinde kullanacağımız bu substratların toksik etki göstermemesi kritik bir noktadır. Bu nedenle EcoFlex, karbonil demir tozları ve yüzey işlemi için kullanılan APTES'in herhangi bir sitotoksik etkiye neden olmadıkları sitotoksikite analizi ile değerlendirilmiştir. Hücre morfolojisinin değerlendirildiği ışık mikroskopi görüntüleri Şekil 5.13.'de verilmiştir. Bu görüntülere göre, hücrelerin morfolojisinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bir miktar ölü (yüzen) hücre gözlenirse de pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında normal olduğu düşünülmektedir. 72. saat sonunda hücre sayısının belirlenmesi için yapılan Alamar Blue testi sonuçlarına göre ise pozitif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir hücre inhibisyonu gözlenmemektedir.

Tüm bu sonuçlara göre; substratların sitotoksik cevap notlandırması Çizelge 6.1.'de sunulmaktadır. Notlandırma sonucuna göre manyetik substrat olarak kullanılan malzemeler toplamda 1'er puan toplamışlardır ve Çizelge 4.5.'de verilen skalaya göre biyouyumlu oldukları ve hücre inhibisyonuna neden olmadıkları anlaşılmıştır.

Çizelge 6.1. Değerlendirme kriterleri sonuçları

İnceleme	Örnek	Not
Hücre yayılımı	EcoFlex	0
	EcoFlex-APTES	0
Ölü hücre (yüzen hücre)	EcoFlex	1
	EcoFlex-APTES	1
Hücre morfolojisinde değişim	EcoFlex	0
	EcoFlex-APTES	0
Hücre büyümesi inhibisyonu	EcoFlex	0
	EcoFlex-APTES	0

6.1.2.3. 4B Basım Optimizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Önceki bölümlerde vizkozite ve basım yüzeyinin hidrofilisite derecesinin düzgün basım yapabilmek için kontrol edilmesi gerektiğinden bahsedilmişti. Basım yüzeyi APTES kaplaması yapılarak mümkün olduğu kadar hidrofilik hale getirilmişse de cam yüzeyin temas açısı olan 30°'ye ulaşamamıştır. Bu noktada vizkozitenin uygun basım için ayarlanması gerektiği düşünülmüş ve iki farklı strateji kullanılmıştır. Bunlardan ilki sadece GELMA içeren bir hidrojeli basabilmek üzerinedir. GELMA solüsyonları 21°C sıcaklık altında katı, üzerinde ise sıvı halde bulunurlar. Bu özellikten faydalanmak üzere 3B yazıcının baskı

tablası 17°C'ye soğutulmuş ve malzemenin iğne ucundan soğuk substrata iner inmez katılaşacağı düşünülmüştür. Kontrol grubu olarak aynı basımlar baskı tablasının 23°C olduğu durumda da denenmiştir. GELMA10 olarak kodlanmış kompozisyonun en iyi temas açısına sahip yüzey olan EcoFlex-APTES üzerine denenen basımları Şekil 5.15.'de verilmektedir. 23°C'ye göre, hidrojel 17°C'ye soğutulmuş yüzeye temas eder etmez vizkozitesi bir miktar artmış olsa da istenilen basımın gerçekleşmesi için yeterli olmadığı değerlendirilmiştir. GELMA konsantrasyonunun artırıldığı ancak yine sadece GELMA içeren diğer grup GELMA20'nin basımı da benzer bir şekilde gerçekleşmiştir. EcoFlex-APTES üzerine olan basım beklenildiği gibi diğer kontrol grubu yüzeylere nazaran daha iyi olmakla beraber istenilen sonucu vermemiştir (Şekil 5.17., Şekil 5.18., Şekil 5.19.). 3B basım esnasında basılan malzemenin yüzeyde bir hat şeklinde sürünmesi tercih edilmektedir. Baskı malzemesinin vizkozitesinin çok düşük olması malzemenin sürünerek yüzeye yerleşmesine engel olmaktadır. Şekil 5.19. (b)'de kenar hattının düzgün basılabilmesine rağmen orta kısımlarda sıvı bir yığılma olmasının nedeni, malzeme depozit edildikçe yüzey sıcaklığının katılaştırabileceği malzeme miktarının bir limiti olmasındandır. Dolayısıyla, yeni gelen malzemenin anında bir vizkozite artışı yaşayamadığı için sıvı şekilde substrat üzerinde biriktiği değerlendirilmiştir.

Vizkozite artışı için ikinci strateji ise GELMA'ya ek bir polimerin daha kullanılmasıdır. Bu noktada doğal bir polimer olması, suda çözünebilmesi, biyo-uyumlu olması ve en önemlisi kolay çapraz bağlanabilir bir polimer olması nedeniyle aljinat malzemesi seçilmiştir. Ancak bilinmektedir ki aljinat malzemesi hücre tutunması ve yayılımı açısından zayıf bir malzemedir (45). Bu nedenle, GELMA çözeltisine sınırlı miktarda bir aljinat (%1 a/h) eklemesi yapılabilmektedir. GELMA101 kodu verilen kompozisyonun 23°C ve 17°C'de gerçekleştirilen basım görüntüleri Şekil 5.16.'de verilmektedir. Sınırlı miktarda aljinat eklenmesi, 23°C'de yapılan basımlarda çok bir fark yaratmamıştır (Şekil 5.16. (a)). Ancak 17°C'de GELMA'nın katılaşmasıyla birlikte kullanıldığında düzgün basım yapılacağına dair bir potansiyel sunmuştur (Şekil 5.16. (b)). Kenarları belli olan ve nispeten daha az sıvı GELMA'nın üzerinde toplandığı bu basım denemesinden sonra yüksek konsantrasyon GELMA'nın daha iyi sonuç verebileceği düşünülmüş ve GELMA102 kodu verilen kompozisyon üretilmiştir. Bu kompozisyonda hem GELMA miktarının artışı hem aljinat katkısı 17°C'de basım yapıldığında yüzey işlemi görmemiş EcoFlex substratta dahi belirgin bir fark yaratmıştır (Şekil 5.20. (a)). EcoFlex-UVOzon substratı üzerine yapılan basımın ise

yine kenarlarda düzgün ancak üst katmanlarda birleştiği gözlenmiştir. Katmanların üst üste inşasının sağlıklı olması gerekmektedir aksi takdirde tüm desenler bu örnekte olduğu gibi birleşmektedir (Şekil 5.20. (b)). Özellikle 17°C’de başarılı bir basımın yapılabilirliğini GELMA’nın yüzeye iner inmez katılaşması gerektiğiyle açıklamak yerinde olacaktır. Çünkü ilk katmanların düzgün basılabildiği bir çalışmada üst katmanlar bu katı yüzey üzerine kolaylıkla oturtulmakta ve hızlıca basım tamamlanmaktadır. Bunun bir sonucu olarak EcoFlex-APTES yüzeyine basılan GELMA_{lg201} kompozisyonu başarılı olmuş ve tüm katmanlar birbirlerinden ayrı ve düzgün şekilde basılabilmektedir (Şekil 5.20. (c)). Tasarlanan ölçüler ile gerçekleşen ölçüler arasında %20-%25 arasında bir fark olduğu Şekil 5.21.’de gözlenmektedir. Hata payları dikkate alındığında daha küçük desenlerin daha yakın ölçülerde basıldığı anlaşılmaktadır. Bunun sebebinin robotik kafanın büyük deseni doldurmak için daha fazla tur yapması gerekliliğidir. Tasarlanan desen ölçülerine daha yakın bir gerçekleşme oranı için kullanılan asıl örneklerde bu desen ölçüleri küçültülmüştür.

3B olarak basılmış şeklin çapraz bağlama sağlanana kadar korunumu da önemlidir. Kullanmış olduğumuz iki farklı polimerin çapraz bağlamaları için kullanılan mavi ışık ve CaCl₂ püskürtmesinin sıralaması önemli bir faktör olarak ortaya çıkmıştır. Şekil 5.22.’de önce foto-çapraz bağlamanın yapıldığı örnek incelenmektedir. Görüntüden anlaşıldığı üzere desenler basım öncesi duruma göre sönmüş ve kaynaşmaya başlamışlardır. Hatırlanacağı üzere, GELMA’yı bastığımız tabla sıcaklığı 17°C’ydi ve GELMA yüzeyde donmuş haliyle son şekli sağlayabilmişti. Bu durumda iken 50W gücünde mavi ışığın verilmesi üst katmanlardaki GELMA’nın tekrar ısınarak sıvı hale geçmesine sebep olmuş ve desenler yıkılmaya başlamıştır. Bu sorunun çözümü için aljinatın önce çapraz bağlanması denenmiştir. Bu sayede, verilen ışıkla sıcaklık artsa dahi çapraz bağlanmış aljinat matrisi içine hapsolmuş GELMA, sıvı duruma geçerek şeklin bozulmasına neden olmamıştır (Şekil 5.23.). Işıklı sıcaklık artışına artı bir önlem olarak püskürtülen CaCl₂ de 4°C’ye soğutulmuştur.

6.1.2.4. Aljinat Liyaz Uygulamasının Değerlendirilmesi

Aljinat malzemesi çapraz bağlandıktan sonra polimer matrisinin sertliği (stiffness) yüzünden hücre yayılımı için uygun bir ortam oluşturmamaktadır. Basım optimizasyon aşamasında kullanılan aljinatın yapıdan çıkarılması işlemi, aljinatı daha küçük moleküllere parçalayan aljinat liyaz enzimi ile gerçekleştirilmiştir. Kısaca aljinat liyaz, aljinat monomerleri (D-

mannuronik asit ve L-guluronik asit) arasında bulunan glikozidik bağları kırarak aljinatın bozunmasını kataliz eder (96). 3B hücre kültüründe hücrenin içinde bulunduğu ortamın gözenekli bir yapıda olması hücre yayılımı açısından tercih edilmektedir. Aljinat liyaz (AL) uygulanmadan önce, 3B basılmış olan taşıyıcı iskele oldukça yoğun bir mikroyapıya sahiptir. Şekil 5.24.'de verilen liyaz uygulanmayan örneğin SEM görüntüsünde yapıda hücre yayılması için gerekli olan gözeneklerden yoksun olduğu görülmektedir. Şekil 5.26. (a)'da 3. günde yapılan Phalloidin/DAPI boyaması verilmektedir. Yer yer Phalloidin boyamasından sinyal alınsa da hücre çekirdeği boyaması olan DAPI'den hiç sinyal alınamamıştır. Bu durum hücrelerin yapı içerisinde yaşayamadıkları ve Phalloidin sinyalinin hücre kalıntılarından geldiği değerlendirilmiştir. Hücrelerin bu gözeneksiz ortamda hayatta kalamadığının gösterilmesinin ardından örneklerle aljinat liyaz uygulaması yapılmış ve mikroyapı SEM görüntülemesi ile incelenmiştir. Şekil 5.25.'de verilen görüntülerde liyaz uygulaması ardından yapıda 50-100 µm arasında değişik büyüklüklerde gözenekler oluştuğu anlaşılmaktadır. Bu işlemin hücre davranışına etkisinin ölçüldüğü Phalloidin/DAPI boyaması Şekil 5.26. (b)'de verilmektedir. Hem aktin filamentten hem de hücre çekirdeğinden alınan sinyallere göre hücrelerin sağlıklı bir morfolojiye sahip oldukları ve yayılmaya başladıkları anlaşılmaktadır.

AL uygulaması ardından açılan gözenekler taşıyıcı iskelenin sıvı emme kapasitesinde de değişiklik yaratmıştır. Yaş ağırlığının kuru ağırlığa oranlanmasıyla şişme oranı hesaplanmıştır ve AL uygulanan örneklerin uygulanmayanlara göre yaklaşık 2 kat daha fazla şiştikleri gözlenmiştir. Lai vd. aljinat ve metil-selüloz kullanarak yaptıkları çalışmada yoğun ve daha az yoğun olarak ürettikleri gözenekli bölgeler arasında şişme oranının kayda değer şekilde değiştiğini rapor etmişlerdir (97). Şekil 5.27.'de verilen grafikte aljinat liyaz uygulanan ve uygulanmayan örnekler arasında sıvı emme performansı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluştuğu değerlendirilmiştir. Sıvı emme kapasitesi hücre kültürü esnasında besiyerinin malzemenin her yerine ulaşması açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle daha fazla sıvı emme kapasitesinin hücre kültürünü de olumlu olarak etkilediği değerlendirilmektedir.

Üretilen taşıyıcı iskelelerin, AL uygulaması öncesi ve sonrasında kas dokusu ile mekanik uyumluluğun incelenmesi için 90° desenle üretilen örneğe çekme testi uygulanmıştır. Elde edilen verilerden oluşturulan gerilme-gerinim grafiği Şekil 5.28.'de verilmektedir.

Literatürde doğal kas nişinin elastisite modülünün 11.5 ± 1.3 kPa olarak hesaplandığı rapor edilmiştir (98) . Boontheekul vd. miyoblast hücrelerinin tutunma, çoğalma ve farklılaşması için uygun jel sertliklerini (stiffness) araştırdıkları çalışmalarında uygun sertlik aralığının 13-45 kPa olduğunu rapor etmişlerdir (99). Çalışmamızda AL uygulamasının yapılmadığı örneğin elastisite modülü yaklaşık 115 kPa ölçülmüştür. AL uygulamasının yapıldığı örneğin ise yaklaşık 22 kPa'lık bir elastisite modülüne sahip olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre aljnatin AL uygulaması ile sistemden çıkarılmasının, taşıyıcı iskelenin sertlik değerinin C2C12 hücreleri için uygun aralığa çekildiğini göstermektedir.

6.1.2.5. Hücre Canlılığı ve Yayılımının Değerlendirilmesi

3B basım sürecinde hücreler, inkübasyon ortamına alınana dek pek çok stresle başa çıkmak ve hayatta kalmak zorundadır. Hidrojel çözeltisi içerisine karıştırıldıkları andan itibaren karıştırma hareketinin kesme kuvveti, besiyeri azlığı, basım esnasında süspansiyon içinde bekleme, soğuk ve en önemlisi iğne ucundan çıkarken maruz kaldıkları kesme kuvveti gibi hücre canlılığını etkileyen pek çok strese maruz kalmaktadırlar. Selwa vd. tarafından gerçekleştirilen ve iğne ucu kesme kuvvetinin hücre canlılığına etkisinin incelendiği çalışmada basım sürecinin hücre canlılığını dikkate değer bir oranda düşürdüğü rapor edilmiştir (100). Bu nedenle, başlangıç hücre konsantrasyonun ne kadarının inkübasyon sürecine alındıktan sonra hayatta kaldığını ölçmek gerekmektedir. Çalışmamızda, 3B basım sürecinde her bir örneğe yaklaşık 150.000 hücre ekimi yapılmıştır. Örnekler inkübasyona alındıktan 24 saat sonra yapılan ilk Alamar Blue testine göre açık durumda kültür edilen gruplarda basım sürecinde yaşanan kayıplardan sonra, ilk ekilen hücrelerin yaklaşık %30'unun hayatta kalabildiği gözlenmiştir (Şekil 5.29.). Rulo halde kültür edilen örneklerde ise ilk gün sonunda hayatta kalma oranı %15'ler seviyesinde gerçekleşmiştir. Bu örneklerin basım sonrası katlama adımına alındığı ve daha fazla mekanik kuvvetler ve soğuğa maruz kaldığı düşünüldüğünde bu oranın doğal olduğu değerlendirilmiştir (Şekil 5.30.). 3. gün sonunda ise tüm gruplarda, ilk günden hayatta kalmayı başaran hücrelerin çoğaldığı ve hücre sayısının göreceli de olsa bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Açık kültür edilen grupta desensiz (düz) olarak basılmış olan örneklerin 3. günden sonra mekanik bütünlüklerini kaybetmeye başladıkları gözlenmiştir. 7. gün sonunda bu desensiz grup hariç 30° ve 90° desenlerle basılmış örneklerde ilk güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($****p<0,0001$) şekilde bir hücre artışı meydana gelmiştir. Desensiz grupta ise örnek parçalarından alınan

test doğal olarak hücre sayısını daha az göstermektedir (Şekil 5.29.). Bu nedenle, bu grup rulo edilmiş grupta kullanılmamıştır.

Rulo edilen grupta ise 7. günde her iki grupta da ilk güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmektedir (Şekil 5.30.). Basım ve katlama sürecinin hücreler üzerinde yapmış olduğu negatif etki nedeniyle kültüre düşük hücre sayısı ile başlamak durumunda kalan Rulo örnek grubu 3. günden sonraki günlerde hücre sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir artış yakalamış olsa da 7 günlük deney sonucunda açık örnek grubundaki hücre sayısını yakalayamamıştır.

Hidrojel içinde hayatta kalan hücrelerin yayılması ve morfolojisi f-aktin ve hücre çekirdeği boyaması ile floresan mikroskopta görüntülenmiştir. Açık-Düz grubunda ilk gün sonunda hücre ve çekirdek morfolojisinin normal olduğu değerlendirilmiştir. Hücrelerin ağırlıklı ana gövdeyi oluşturan hidrojel çizgilerinin kenarlarında tutunduğu gözlenmiştir. Bu çizgiler temelde iğne ucu kalınlığında hidrojel fiberleridir. Basım süreci ve çapraz bağlama sürecindeki beklentiler neticesinde bu fiberlerin dip kısımlarına hücrelerin çöktüğü ve çapraz bağlama sonrasında oradan çoğalıp yayıldıkları değerlendirilmiştir. 7. gün sonunda mekanik bütünlüğü bozulmuş olan örnek parçalarından alınan görüntülerde hidrojel içinde hücrelerin çoğalıp düzensiz şekilde yayıldıkları anlaşılmıştır (Şekil 5.33.).

Açık-30° ve Açık-90° grubunda hücreler ilk gün sonunda benzer sebeplerle aynı Açık-Düz grubunda olduğu gibi hidrojel çizgileri boyunca tutundukları gözlenmiştir. Her iki grupta da hücre ve çekirdek morfolojisi normaldir. 1. gün sonunda üst desenler üzerinde her iki grupta da az sayıda hücre gözlenmektedir. Bu duruma ise çapraz bağlama aşamalarında bu desen kısmının hem ışığa hem de soğuk CaCl_2 püskürtmesine daha fazla maruz kalmasının neden olduğu düşünülmektedir. 7. günde alt katmanlardaki hücreler hidrojel çizgileri eksenini boyunca, desen üzerindeki hücreler ise desen eksenini boyunca yönlendirilmişlerdir. Bu haliyle farklı desen tasarımlarıyla hücrelerin istenilen yönde yönlendirebileceği gösterilmiştir. Hem Açık-90 grubunda hem de Açık-30 grubunda alt katmanlardaki hücrelerin desenlerdeki hücrelerle birleştikleri gözlenmiştir. Desenler üzerindeki hücreler daha az popülasyonla başlamalarına rağmen deney sonunda daha yoğun bir popülasyona ulaştıkları gözlenmiştir. Bu duruma daha dar bir alanda olmaları nedeniyle hücre-hücre temasının daha fazla olmasının sebep olduğu düşünülmektedir (Şekil 5.34., Şekil 5.35.).

Rulo şeklinde kültür edilen örneklerden rulo haldeyken görüntü alınmasında zorluklar yaşanmıştır. Bu örneklerden enine kesitler alınmış ve o kesitler mümkün olduğu kadar rulo şekli muhafaza edilerek boyanmıştır ancak boyama steplerinde açılmalar ve hidrojin yer yer parçalanması meydana gelmiştir. Alınan görüntülerde her iki grupta da desenler ayırt edilememiştir. Rulo-30° grubunda ana gövde üzerinde yer alan hücrelerin spiral bir yerleşimde oldukları dikkat çekmektedir. Rulo-90° örneğinde ise belirgin bir yönlenme gözlenmemiştir. Alamar Blue testlerinde canlı hücrelerin varlığı gösterilmiştir. DAPI boyaması ile hücre çekirdeğinin de morfolojisinin düzgün olduğu gözlenmektedir. Buradan yola çıkarak hücre çekirdeği ve f-aktin görüntüsünün üst üste bindirildiği görüntülerde her iki grupta da enine kesitte Phalloidin boyamasından alınan halka benzeri sinyallerin kesitin z-ekseni boyunca yayılmış olan hücrelerden geldiği düşünülmektedir (Şekil 5.37., Şekil 5.38.).

6.1.2.6. İmmü floresan Boyama Bulgularının Değerlendirilmesi

Hidrojel içerisinde tutunup, çoğalan C2C12 hücrelerinin miyoblast füzyonu ile çok çekirdekli miyotüpleri oluşturma derecelerini analiz edebilmek için kas spesifik bir protein olan MyoD1 ifadesine immü floresan işaretleme ile bakılmıştır. Açık-30° ve Açık-90° gruplarının hem desen üzerinde hem de alt katmanda çeşitli bölgelerde MyoD1 belirteci gözlenmiştir (Şekil 5.39., Şekil 5.40.). Her iki grupta da desenler üzerinde MyoD1 ifadesi alt katmanlara nazaran daha fazladır. Desenler üzerinde dar bir alanda bulunan hücrelerin, daha fazla hücre-hücre etkileşimine sahip olmaları nedeniyle daha yoğun şekilde miyotüp oluşturdıkları düşünülmektedir. Alt katmanlarda ise genel olarak desenlere yakın olan hücrelerin hem kendi içlerinde hem de desendeki hücrelerle füzyona uğradığı görülmektedir (Şekil 5.39. (c)). Orta bölgelerde kalan hücrelerde MyoD1 ifadesi nispeten daha az gözlenmekte ya da hiç gözlenmemektedir (Şekil 5.40. (c)). Desenler üzerinde lokalize olan hücrelerin Açık-30° grubunda daha çok desen kıyısında hizalandıkları gözlenirken Açık-90° grubunda tüm desen boyunca kompleks şekilde hizalandıkları görülmektedir. Bu durumun 7. gün sonunda Alamar Blue ve Phalloidin sonuçlarında Açık-90° grubunda göreceli olarak daha fazla hücre bulunmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Rulo-30° örneğinden alınan kesitlerde örneğin iç yapısında kalan desenler ayırt edilememiştir. Bu örneklerde MyoD1 ifadesinin rulonun iç kısımlarında arttığı orta kısımlarda ise azaldığı gözlenmektedir. Bu iç kısımların besiyerine daha yakın oldukları için

avantajlı olabilecekleri sonucuna varılmıştır (Şekil 5.41.). Rulo-90° örneğinde ise iç kısımda bulunan desenlerden birisi gözlenebilmiştir. Desen bölgesinin orta bölgelere göre hem çekirdek sayısı daha fazladır hem de MyoD1 ifadesi seviyesinde bir yoğunluk gözlenmektedir (Şekil 5.42.). Ancak diğer örneklerle kıyasla çekirdek popülasyonu da göz önüne alındığında bu örnekte hidrojin desen harici alt katmanlarına da yayılan bir hücre popülasyonu olduğu ve katman boyunca MyoD1 ifadesinin olduğu gözlenmektedir (Şekil 5.42. (c)). Rulo ve Açık grup çekirdek başına MyoD1 boyama yoğunluğu açısından kıyaslandığında Rulo edilmiş grubun daha yoğun MyoD1 ifadesine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 5.43). Bu örneklerde bulunan hücrelerin daha dar bir alanda daha fazla hücre-hücre etkileşiminde bulunduğu ve bu nedenle daha fazla miyotüp oluşturma eğiliminde olduğu sonucu çıkarılmıştır. Açık grupta alınan görüntüler yüzeye yakın hücre grubundan gelen sinyallerden oluşmaktadır. Rulo grupta alınan görüntüler ise rulo edilmiş hidrojin enine kesitinde bulunan hücre grubundan gelen sinyallerden oluşmaktadır. Böylelikle, bu görüntüler hücrelerin sadece yüzeyde değil tüm hidrojel boyunca 3B olarak yayıldıklarını teyit etmektedir.

6.2. SONUÇ

Organ ihtiyacının gittikçe yükseldiği çağımızda organ nakline bir alternatif geliştirilebilmesi için doku mühendisliği alanında son yıllarda pek çok çalışma yapılmaktadır. Laboratuvar ortamında bir doku geliştirebilmek için şimdiye kadar belirlenmiş ya da potansiyel pek çok zorluk bulunmaktadır. Pek çok alandan bilim insanları dokuları gelişim sırasında şekillendiren kimyasal, fiziksel ve biyolojik mekanizmaları anlamak için araştırmalar yapmaktadır. Bu tez çalışmasında hücre taşıma iskeleleri sentez aşaması, malzeme-fabrikasyon uyumu ve malzeme-hücre uyumu konularında araştırılmıştır. Çalışma kapsamında üretim aşamasında karşılaşılan belli başlı zorlukların belirlenen amaç doğrultusunda adım adım ve ayrıntılı çözümleri belgelendirilmiştir. Üretimi yapılan iskelelerin ikincil bir uyarım (ısı ve manyetik alan etkileşimi) ile 4. boyut olarak tarif edilen zamana karşı şekil değişimi incelenmiştir. İskelet kası öncü hücreleri olan C2C12 hücrelerinin bu duyarlı taşıyıcı iskele sistemleri içerisindeki davranışları biyoteknoloji teknikleri kullanılarak analiz edilmiştir.

Çalışmamızın ilk bölümünde kendiliğinden katlanabilir bir hidrojel platformu ayarlanabilir katlama kabiliyeti ile birlikte P(NIPAm) ve P(AAm) hidrojelleri kullanılarak tasarlanmış ve

üretilemiştir. Işığa değil sıcaklığa duyarlı olan P(NIPAm)'ın literatürde doğrudan ısıtılarak kullanıldığı pek çok çalışmanın aksine bu çalışmada ışık enerjisi ile istenilen spesifik bölgelerde sıcaklık artışı sağlanmıştır. Platformların katlanması, farklı akrilik boya renkleri, desen tasarımı ve ışık aydınlatmasının optimum şekilde biraraya getirilmesi ile kontrollü şekilde manipüle edilmiştir. Doğrudan ısıtma ile karşılaştırıldığında, ışık aydınlatması ile ısı üretimi sadece ayarlanabilir sıcaklığa bağlı faz geçişine izin vermekle kalmamış, aynı zamanda platformlar için çok daha hızlı katlama oranı sağlamıştır. Bu çalışmada kullanılan sentetik polimerlerin hücre etkileşimi ne yazık ki düşük kalmıştır. Ancak, bir kavram kanıtı olarak gerçekleştirilen platform hareketi ve hedef noktadan örnek yakalama uygulaması statik bir hücre taşıyıcı iskele sisteminin yanı sıra dinamik bir sistemin de duyarlı hidrojeller vasıtasıyla üretilebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde hücre etkileşimi açısından daha uygun olduğu bilinen doğal polimerler kullanılmıştır. Hayvan kökenli bir polimer olan jelatinin hücreleri tutunma, çoğalma ve farklılaşma gibi süreçlerde desteklediği iyi bilinmektedir. Fakat son yıllarda jelatinin çapraz bağlanmasının zorluğu ve çapraz bağlama reaktiflerinin çoğunlukla toksik olması nedeniyle jelatin metakrilat (GELMA) adıyla foto-çapraz bağlanabilir bir malzeme türetilmiştir. Çalışmamızda öncelikle jelatin polimeri metakrilat reaksiyonu ile foto-çapraz bağlanabilir hale getirilmiş ve aljinat malzemesi ile vizkozitesi artırılarak 3B yazıcıda kullanılabilecek bir biyomürekkep elde edilmiştir. Bu biyomürekkep, düzgün bir basım için gerekli koşullar ile hücrelerin talep ettiği ortam koşulları kombine edilerek bir hücre taşıyıcı iskelesi imal edilmesinde kullanılmıştır. Kendi başına duyarlı bir malzeme olmayan GELMA bir destek substratı vasıtasıyla manyetik alan değişimi ile ikincil bir uyarıya tabi tutulmuş ve bu sayede kas dokusu hiyerarşisinin iç içe geçmiş hücre tabakalarına benzetilmiş bir rulo elde edilmiştir. İskele üretim ve katlama sürecinde hücre canlılığını negatif etkileyen pek çok faktöre rağmen GELMA ve aljinat polimerlerinin bir karışımından oluşan bu yapı içerisinde hücreler 7 gün boyunca hayatta kalmış ve çoğalmışlardır. Tasarlanan desenlerin geometrik şekli ile hücre yayılma yönlerinin paralel olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu tasarımların boyut ve şekilleri değiştirilerek hücrelerin istenilen eksenlerde hizalanması sağlanabilir. Yapılan immünfloresan uygulaması sonucunda C2C12 hücrelerinin 7gün itibarıyla miyotüpler oluşturmaya başladığı gözlenmiştir. Başlangıç hücre popülasyonunun nispeten daha az olduğu desenler üzerinde daha çok miyotüp benzeri yapı görülmesi, farklılaşmanın sadece çok yoğun bir hücre popülasyonu ile ilgili olmadığını aynı zamanda

bunun dar bir alanda olması gerektiği sonucunu vermiştir. Rulo edilmiş örneklerde Açık gruba göre MyoD1 ifadesi ile çakışmayan daha az hücre çekirdeği gözlenmesi bu örneklerde bulunan hücrelerin daha dar bir alanda daha fazla hücre-hücre etkileşiminde bulunduğunu ve bu nedenle daha fazla miyotüp oluşturma eğiliminde olduğu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler, gerekli optimizasyon çalışmaları yapıldığında hücre-malzeme etkileşiminin pozitif yönde artırılabilirliğini göstermektedir. Kendinden katlanabilir sistemler ve 4B basımla üretilen malzemeler pek çok uygulama fikrine uyarlanabilir. Duyarlı sentetik ve doğal polimerlerin birlikte kullanılarak hem pozitif hücre etkileşimi olan hem de dinamik yapısı sayesinde tutunma, çoğalma ve farklılaşma gibi süreçleri teşvik edebilecek sistemler üretilir. Gelecekte bu sistemler sayesinde, doğal dokuların kendi mikro çevrelerindeki şekil değişimleri ve maruz kaldıkları kuvvetler taklit edilebilir ve böylelikle ek cihazlara gerek duyulmadan inkübasyon ortamında kendiliğinden indüklenen dokular inşa edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Davis AE, Mehrotra S, Mcelroy LM, Friedewald JJ, Skaro AI, Lapin B, vd. The Extent and Predictors of Waiting Time Geographic Disparity in Kidney Transplantation in the United States. *Clinical and Translational Research*. 2014;97(10):1049-57.
2. Şantaş G, Şantaş F. Türkiye’de organ bağışının mevcut durumu ve organ bağışında stratejik iletişimin önemi. *SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2018;9(2):163-8.
3. Ionov L. 4D Biofabrication : Materials , Methods , and Applications. *Adv Healthcare Mater*. 2018;1800412:1-14.
4. Nakayama KH, Shayan M, Huang NF. Engineering Biomimetic Materials for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2019 Mar 1;8(5):1801168.
5. Rodriguez BL, Larkin LM. 12 - Functional three-dimensional scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. İçinde: Deng Y, Kuiper J, editörler. *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*. Woodhead Publishing; 2018. s. 279-304.
6. Corona BT, Rivera JC, Owens JG, Wenke JC, Rathbone CR. Volumetric muscle loss leads to permanent disability following extremity trauma. *J Rehabil Res Dev*. 2015;52(7):785-92.
7. Grasman JM, Zayas MJ, Page RL, Pins GD. Acta Biomaterialia Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta Biomater*. 2015;25:2-15.
8. Liu J, Saul D, Böker KO, Ernst J, Lehman W, Schilling AF. Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. Jiang CP, editör. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1984879.
9. Miller RG, Sharma KR, Pavlath GK, Gussoni E, Mynhier M, Yu P, vd. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: The San Francisco study. *Muscle Nerve*. 1997 Nis 1;20(4):469-78.

10. Zhang C, Feng H yu, Huang S liang, Fang J pei, Xiao L lu, Yao X li, vd. Therapy of Duchenne muscular dystrophy with umbilical cord blood stem cell transplantation. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2005;22(4):399-405.
11. Cerletti M, Jurga S, Witczak CA, Hirshman MF, Shadrach JL, Goodyear LJ, vd. Highly Efficient, Functional Engraftment of Skeletal Muscle Stem Cells in Dystrophic Muscles. *Cell*. 2008;134(1):37-47.
12. Murphy S v, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014;32(8):773-85. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
13. Tedesco FS, Cossu G. Stem cell therapies for muscle disorders. *Curr Opin Neurol*. 2012;597-603.
14. Tibbits S. 4D Printing: Multi-Material Shape Change. *Architectural Design* [Internet]. 2014 Oca 1;84(1):116-21. Available from: <https://doi.org/10.1002/ad.1710>
15. Li X, Shang J, Wang Z. Intelligent materials : a review of applications in 4D printing. 2017;2(May 2016):170-85.
16. Scime A, Caron AZ, Grenier G. Regenerative Medicine Program and Center for Stem Cell and Gene Therapy, Ottawa Health Research Institute, 501 Smyth Road, Ottawa, Ontario, Canada, K1H 8L6, 2 Research Center on Aging, Faculty of Medicine, Department of Orthopedic Surgery, Universite de S. 2009;3012-23.
17. Qazi TH, Mooney DJ, Pumberger M, Geißler S, Duda GN. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering : Existing technologies and future trends. *Biomaterials*. 2015;53:502-21.
18. Zhuang P, An J, Chua CK, Tan LP. Bioprinting of 3D in vitro skeletal muscle models: A review. *Mater Des*. 2020;193:108794.
19. Lee BH, Tijore A, Lam CRI, Chen H, Kumar KM, Tan LP. CHAPTER 7:Engineering Stem Cell Niche and Stem Cell–Material Interactions. 2016 Ara 13;163-96.

20. Ahlstrom JD. Molecular organization of cells. Principles of Tissue Engineering. 2020 Oca 1;79-91.
21. Thorsteinsdottir S, Deries M, Cachaço AS, Bajanca F. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. Dev Biol. 2011 Haz 15;354(2):191-207.
22. Trotter JA, Purslow PP. Functional morphology of the endomysium in series fibered muscles. J Morphol. 1992 May 1;212(2):109-22.
23. Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. Muscle Nerve. 2011 Eyl 1;44(3):318-31.
24. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Cell. 2006;126(4):677-89.
25. Pek YS, Wan ACA, Ying JY. The effect of matrix stiffness on mesenchymal stem cell differentiation in a 3D thixotropic gel. Biomaterials. 2010 Oca 1;31(3):385-91.
26. Gao C, Tang L, Hong J, Liang C, Tan LP, Li H. Effect of laser induced topography with moderate stiffness on human mesenchymal stem cell behavior. Journal of Physics: Materials. 2019 May 30;2(3):034006.
27. Rowlands AS, George PA, Cooper-White JJ. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: Interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Eki;295(4).
28. Serena E, Zatti S, Zoso A, lo Verso F, Tedesco FS, Cossu G, vd. Skeletal Muscle Differentiation on a Chip Shows Human Donor Mesoangioblasts' Efficiency in Restoring Dystrophin in a Duchenne Muscular Dystrophy Model. Stem Cells Transl Med. 2016 Ara 1;5(12):1676-83.
29. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science (1979). 1993 May 14;260(5110):920 LP - 926.

30. Gokyer S, Yilgor E, Yilgor I, Berber E, Vrana E, Orhan K, vd. 3D Printed Biodegradable Polyurethaneurea Elastomer Recapitulates Skeletal Muscle Structure and Function. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021 Kas 8;7(11):5189-205.
31. Wang L, Cao L, Shansky J, Wang Z, Mooney D, Vandenburg H. Minimally Invasive Approach to the Repair of Injured Skeletal Muscle With a Shape-memory Scaffold. *Molecular Therapy*. 2014 Ağu 1;22(8):1441-9.
32. Reis RL. *Encyclopedia of tissue engineering and regenerative medicine*. 2019;3:150-80.
33. Skuk D, Roy B, Goulet M, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, vd. Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Molecular Therapy*. 2004;9(3):475-82.
34. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* [Internet]. 1989 Oca [a.yer 2022 Kas 8];337(6203):176-9. Available from: <http://www.nature.com/articles/337176a0>
35. Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, vd. Stem and Progenitor Cells in Skeletal Muscle Development, Maintenance, and Therapy. *Molecular Therapy*. 2007 May 1;15(5):867-77.
36. Salani S, Donadoni C, Rizzo F, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Generation of skeletal muscle cells from embryonic and induced pluripotent stem cells as an in vitro model and for therapy of muscular dystrophies. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2012 Tem [a.yer 2022 Kas 8];16(7):1353. Available from: </pmc/articles/PMC3823206/>
37. Ulman A, Kot M, Skrzypek K, Szewczyk B, Majka M. Myogenic Differentiation of iPS Cells Shows Different Efficiency in Simultaneous Comparison of Protocols. *Cells* [Internet]. 2021 Tem 1 [a.yer 2022 Kas 8];10(7). Available from: </pmc/articles/PMC8307201/>

38. Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, Kamath S, Osawa M, Kamm KE, vd. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nature Medicine* 2008 14:2 [Internet]. 2008 Oca 20 [a.yer 2022 Kas 8];14(2):134-43. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm1705>
39. Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. Are human and mouse satellite cells really the same? *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2010 Kas 1;58(11):941-55.
40. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, vd. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*. 2005 Tem 29;122(2):289-301.
41. Montarras D, Morgan J, Colins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, vd. Developmental biology: Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* (1979). 2005 Eyl 23;309(5743):2064-7.
42. Shadrach JL, Wagers AJ. Stem cells for skeletal muscle repair. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011 Tem 4;366(1575):2297-306.
43. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, vd. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (1979). 1999 Nis 2;284(5411):143-7.
44. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda SI, vd. Developmental biology: Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* (1979). 2005 Tem 8;309(5732):314-7.
45. Ergene E, Sezlev Bilecen D, Kaya B, Huri PY, Hasirci V. 3D cellular alignment and biomimetic mechanical stimulation enhance human adipose-derived stem cell myogenesis. *Biomedical Materials*. 2020;
46. Ferrari G, Stornaiuolo A, Mavilio F. Bone-marrow transplantation: Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature*. 2001 Haz 28;411(6841):1014-5.

47. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008 Kas 21;103(11):1204-19.
48. Sassoli C, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Trophic actions of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for muscle repair/regeneration. *Cells*. 2012 Eki 17;1(4):832-50.
49. Smythe GM, Hodgetts SI, Grounds MD. Immunobiology and the Future of Myoblast Transfer Therapy. *Molecular Therapy*. 2000;1(4):304-13.
50. Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve*. 1996;19(7):853-60.
51. Guérette B, Asselin I, Skuk D, Entman M, Tremblay JP. Control of inflammatory damage by anti-LFA-1: Increase success of myoblast transplantation. *Cell Transplant*. 1997 Mar;6(2):101-7.
52. Hernández RM, Orive G, Murua A, Pedraz JL. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Haz;62(7-8):711-30.
53. Murua A, Portero A, Orive G, Hernández RM, de Castro M, Pedraz JL. Cell microencapsulation technology: Towards clinical application. *Journal of Controlled Release*. 2008 Ara 8;132(2):76-83.
54. Cezar CA, Mooney DJ. Biomaterial-based delivery for skeletal muscle repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Nis 28;84:188-97.
55. Yilgor P, Tuzlakoglu K, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V. Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2009 Tem;30(21):3551-9.
56. Ergene E, Yagci BS, Gokyer S, Eyidogan A, Aksoy EA, Yilgor Huri P. A novel polyurethane-based biodegradable elastomer as a promising material for skeletal muscle tissue engineering. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2019;14(2).

57. Narayanan N, Jiang C, Uzunalli G, Thankappan SK, Laurencin CT, Deng M. Polymeric Electrospinning for Musculoskeletal Regenerative Engineering. *Regenerative Engineering and Translational Medicine* 2016 2:2. 2016 Mar 30;2(2):69-84.
58. Cheng J, Jun Y, Qin J, Lee SH. Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications. *Biomaterials*. 2017 Oct 1;114:121-43.
59. Naahidi S, Jafari M, Logan M, Wang Y, Yuan Y, Bae H, vd. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*. 2017 Oct 1;35(5):530-44.
60. Guex AG, Birrer DL, Fortunato G, Tevaearai HT, Giraud MN. Anisotropically oriented electrospun matrices with an imprinted periodic micropattern: a new scaffold for engineered muscle constructs. *Biomedical Materials*. 2013 Oct 23;8(2):021001.
61. Grasman JM, Do DM, Page RL, Pins GD. Rapid release of growth factors regenerates force output in volumetric muscle loss injuries. *Biomaterials*. 2015 Dec 1;72:49-60.
62. Kim MS, Jun I, Shin YM, Jang W, Kim SI, Shin H. The Development of Genipin-Crosslinked Poly(caprolactone) (PCL)/Gelatin Nanofibers for Tissue Engineering Applications. *Macromol Biosci*. 2010 Oct 11;10(1):91-100.
63. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 May 30;59(4-5):207-33.
64. Cascone MG, Barbani N, Cristallini C, Giusti P, Ciardelli G, Lazzeri L. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2001;12(3):267-81.
65. Dutta D, Heo I, Clevers H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol Med*. 2017 May 1;23(5):393-410.
66. Xie M, Gao Q, Fu J, Chen Z, He Y. Bioprinting of novel 3D tumor array chip for drug screening. *Biodes Manuf*. 2020 Oct 1;3(3):175-88.

67. Yu K, Zhang X, Sun Y, Gao Q, Fu J, Cai X, vd. Printability during projection-based 3D bioprinting. *Bioact Mater* [Internet]. 2022;11:254-67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X21004394>
68. Raviv D, Zhao W, Mcknelly C, Papadopoulou A, Kadambi A, Shi B, vd. Active Printed Materials for Complex Self-Evolving Deformations. 2014;1-9.
69. Khoo ZX, Ee J, Teoh M, Liu Y, Chua CK. 3D printing of smart materials : A review on recent progresses in 4D printing. 2015;2759.
70. Miao S, Zhu W, Castro NJ, Leng J, Zhang LG. Four-Dimensional Printing Hierarchy Scaffolds with Highly Biocompatible Smart Polymers for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016 Eki;22(10):952-63.
71. Joshi S, Rawat K, Karunakaran C, Rajamohan V, Tom A, Koziol K, vd. 4D printing of materials for the future : Opportunities and challenges. *Appl Mater Today*. 2020;18:100490.
72. Gladman AS, Matsumoto EA, Nuzzo RG, Mahadevan L, Lewis JA. Biomimetic 4D printing. *Nat Mater*. 2016 Nis;15(4):413-8.
73. Vasiev I, Greer AIM, Khokhar AZ, Stormonth-Darling J, Tanner KE, Gadegaard N. Self-folding nano- and micropatterned hydrogel tissue engineering scaffolds by single step photolithographic process. *Microelectron Eng*. 2013;108:76-81.
74. Koike Y, Yokoyama Y, Hayakawa T. Light-Driven Hydrogel Microactuators for On-Chip Cell Manipulations. *Front Mech Eng* [Internet]. 2020;6:2. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmech.2020.00002>
75. Liu D, Bastiaansen CWM, den Toonder MJ, Broer DJ. (Photo-)Thermally Induced Formation of Dynamic Surface Topographies in Polymer Hydrogel Networks. *Langmuir*. 2013 May 7;29(18):5622-9.
76. Yoon C, Xiao R, Park J, Cha J, Nguyen TD, Gracias DH. Functional stimuli responsive hydrogel devices by self-folding. *Smart Mater Struct*. 2014;23(9):94008.

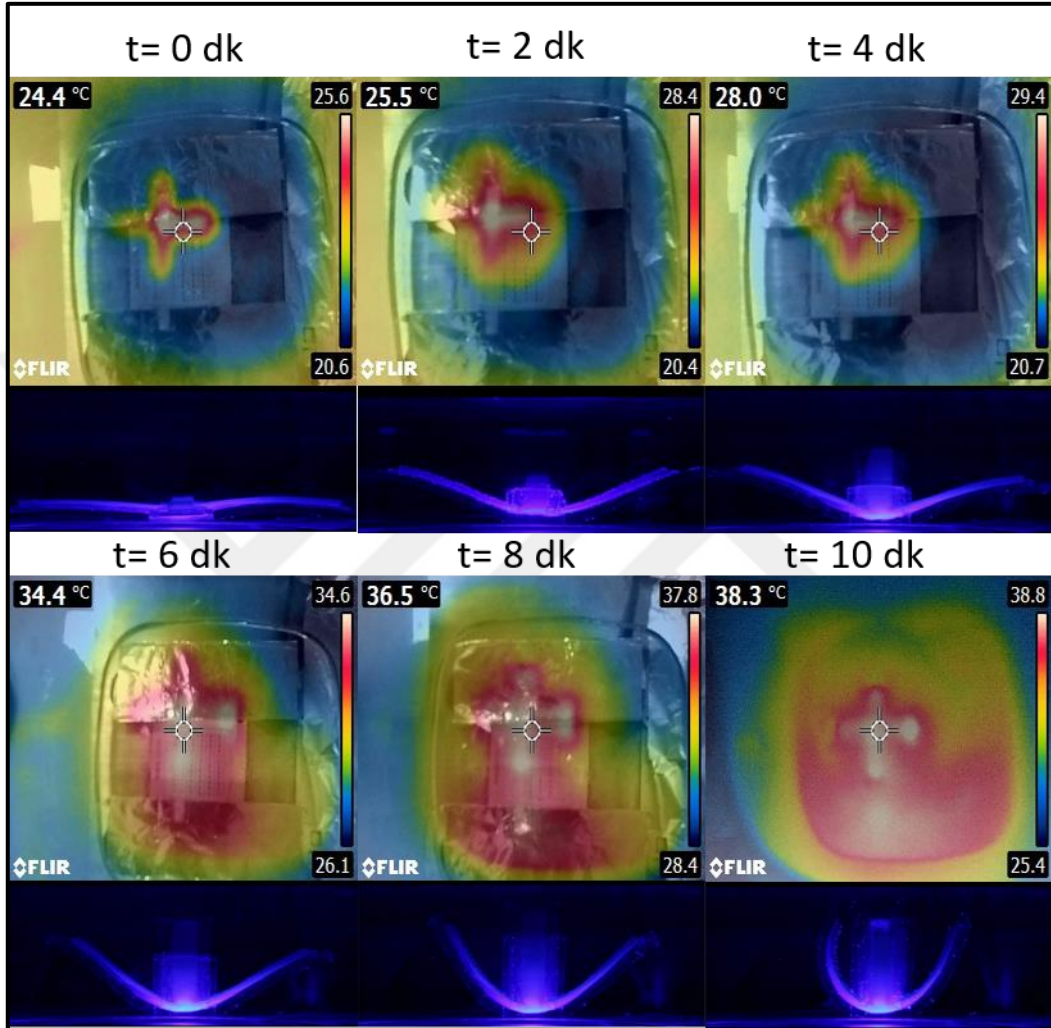
77. Kirillova A, Maxson R, Stoychev G, Gomillion CT, Ionov L. 4D Biofabrication Using Shape-Morphing Hydrogels. *Advanced Materials*. 2017;29(46):1-8.
78. Noshadi I, Hong S, Sullivan KE, Shirzaei Sani E, Portillo-Lara R, Tamayol A, vd. In vitro and in vivo analysis of visible light crosslinkable gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomater Sci*. 2017 Eyl 26;5(10):2093-105.
79. Shirahama H, Lee BH, Tan LP, Cho NJ. Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis. *Scientific Reports* 2016 6:1. 2016 Ağu 9;6(1):1-11.
80. Smeds KA, Grinstaff MW. Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation. *J Biomed Mater Res*. 2001;54(1):115-21.
81. LI W, ZHOU J, XU Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep [Internet]*. 2015 Eyl [a.yer 2022 Kas 20];3(5):617-20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26405534/>
82. Ohnsorg ML, Ting JM, Jones SD, Jung S, Bates FS, Reineke TM. Tuning PNIPAm self-assembly and thermoresponse: roles of hydrophobic end-groups and hydrophilic comonomer. *Polym Chem*. 2019;10(25):3469-79.
83. Liu Y, Shaw B, Dickey MD, Genzer J. Sequential self-folding of polymer sheets. *Sci Adv*. 2017;3:1-8.
84. Schrieber R, Gareis H. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. 2007 Nis 12;1-334.
85. Bello AB, Kim D, Kim D, Park H, Lee SH. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications. *Tissue Eng Part B Rev [Internet]*. 2020 Nis 1 [a.yer 2022 Kas 23];26(2):164-80. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2019.0256>
86. Djagny KB, Wang Z, Xu S. Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review. <http://dx.doi.org/101080/20014091091904>. 2010;41(6):481-92.

87. Davidenko N, Schuster CF, Bax D v., Farndale RW, Hamaia S, Best SM, vd. Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *J Mater Sci Mater Med*. 2016 Eki 1;27(10):1-14.
88. Stevens KR, Einerson NJ, Burmania JA, Kao WJ. In vivo biocompatibility of gelatin-based hydrogels and interpenetrating networks. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2012;13(12):1353-66.
89. Gorgieva S, Kokol V, Gorgieva S, Kokol V. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. 2011 Kas 16;
90. van den Bulcke AI, Bogdanov B, de Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules*. 2000;1(1):31-8.
91. Gomez-Guillen MC, Gimenez B, Lopez-Caballero ME, Montero MP. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll*. 2011 Ara 1;25(8):1813-27.
92. Hoch E, Schuh C, Hirth T, Tovar GEM, Borchers K. Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2012 23:11. 2012 Ağu 14;23(11):2607-17.
93. Gu H, Boehler Q, Cui H, Secchi E, Savorana G, de Marco C, vd. Magnetic cilia carpets with programmable metachronal waves. *Nature Communications* 2020 11:1. 2020 May 26;11(1):1-10.
94. Kuang P, Constant K, Kuang P, Constant K. Increased Wettability and Surface Free Energy of Polyurethane by Ultraviolet Ozone Treatment. *Wetting and Wettability*. 2015 Ara 16;
95. Zeng X, Xu G, Gao Y, An Y. Surface wettability of (3-Aminopropyl)triethoxysilane self-assembled Monolayers. *Journal of Physical Chemistry B*. 2011 Oca 27;115(3):450-4.

96. Thiang Yian Wong, Preston LA, Schiller NL. Alginate Lyase: Review of Major Sources and Enzyme Characteristics, Structure-Function Analysis, Biological Roles, and Applications. *Annu Rev Microbiol.* 2003 Kas 28;54:289-340.
97. Lai J, Ye X, Liu J, Wang C, Li J, Wang X, vd. 4D printing of highly printable and shape morphing hydrogels composed of alginate and methylcellulose. *Mater Des.* 2021 Tem 1;205:109699.
98. Collinsworth AM, Zhang S, Kraus WE, Truskey GA. Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283(4 52-4):1219-27.
99. Boontheekul T, Hill EE, Kong HJ, Mooney DJ. Regulating Myoblast Phenotype Through Controlled Gel Stiffness and Degradation. <https://home.liebertpub.com/ten>. 2007 Tem 15;13(7):1431-42.
100. Boularaoui S, Shanti A, Khan KA, Iacoponi S, Christoforou N, Stefanini C. Harnessing shear stress preconditioning to improve cell viability in 3D post-printed biostructures using extrusion bioprinting. *Bioprinting.* 2022 Mar 1;25:e00184.

EKLER

EK-1 TERMAL KAMERA GÖRÜNTÜLERİ



Termal Kamera Görüntüleri

EK-2 C2C12 ALAMAR BLUE TESTİ KALİBRASYON EĞRİSİ



C2C12 Alamar Blue Kalibrasyon Eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emre Ergene

Doğum Yeri:

Doğum Tarihi:

Medeni Hali:

Yabancı Dili:

Eğitim Durumu

Lise:

Lisans:

Yüksek Lisans:

Yayınlar ve Bildiriler

1. Basturkmen B, **Ergene E**, Doganay D, Yilgor Huri P, Unalan HE, Aksoy EA. Silver Nanowire Loaded Poly(ϵ -caprolactone) Nanocomposite Fibers as Electroactive Scaffolds for Skeletal Muscle Regeneration. Materials Science & Engineering C, 2022; <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112567>.
2. Gokyer S, **Ergene E**, Demirak O, Yilgor Huri P. 3D printing in Shoulder Surgery. In: Ozkan M., Huri G, Bilsel K. (eds.) Fundamentals of the Shoulder, Chapter 22, Springer, 2022 (ISBN: 978-3-030-74820-3). DOI : 10.1007/978-3-030-94702-6
3. **Ergene E**, Liman G, Yildiz E, Yilgor Huri P, Demirel G. Folding Control of Hydrogel Platforms through Pattern Design and Light Illumination, ACS Applied Polymer Materials, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00458>.
4. Bilge S*, **Ergene E***, Talak E, Gokyer S, Donar YO, Snağ A, Yilgor Huri P. Recycled Algae-Based Carbon Materials as Electroconductive 3D Printed Skeletal Muscle

Tissue Engineering Scaffolds, J Mater Sci:Mater Med 2021; 32:73. [https://doi.org/ 10.1007/s10856-021-06534-6](https://doi.org/10.1007/s10856-021-06534-6)

5. Renkler NZ, **Ergene E**, Gokyer S, Tuzlakoglu Ozturk M, Yilgor Huri P, Tuzlakoglu K. Facile modification of polycaprolactone nanofibers with egg white protein. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2021; 32(34)
6. **Ergene E**, Bilecen DS, Kaya B, Yilgor Huri P, Hasirci V. 3D cellular alignment and biomimetic mechanical stimulation enhance human adipose-derived stem cell myogenesis. Biomedical Materials, 2020; 15 (5), 055017
7. Kaya M, Ahi ZB, **Ergene E**, Yilgor Huri P, Tuzlakoglu K. Design of a New Dual Mesh with an Absorbable Nanofibrous Layer as a Potential Implant for Abdominal Hernia Treatment, J Tissue Eng Regen Med, 2020; 14 (2), 347-354
8. **Ergene E**, Yagci BS, Gokyer S, Eyidogan A, Aksoy EA, Yilgor Huri P. A Novel Polyurethane-Based Biodegradable Elastomer as a Promising Material for Skeletal Muscle Tissue Engineering, Biomedical Materials, 2019; 14: 025014.
9. Aktas B, Garipcan B, Ahi ZB, Tuzlakoglu K, **Ergene E**, Yilgor Huri P. Osteoimmunomodulation with Biomaterials. In: N. E. Vrana (ed.) Biomaterials and Immune Response: Complications, Mechanisms and Immunomodulation, Chapter 8, CRC Press, 2019. (ISBN: 978-1-3151-4714-7)
10. Yilgor Huri P, Hamsici S, **Ergene E**, Huri G, Doral MN. Infrapatellar Fat Pad-Derived Stem Cell Based Regenerative Strategies in Orthopaedic Surgery. Knee Surg Rel Res, 2018; 30(3): 179-186
11. Sözlü Sunum: **Ergene E**, Liman G Yıldız E, Yılğör Huri P, Demirel G. Light-Triggered Hydrogels for Folding Control with Pattern Design, NANOTR-16, Ankara, Turkey September 3-5, 2022

12. Poster: **Ergene E**, Malikmammadov E, Yılğör Huri P, Hasırcı V. Cellular Alignment Enhance the Mechanical Properties of ASC Laden Fibrin Microfibers, 22nd International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2017), Ankara, Turkey, May 12-14, 2017.

13. Sözlü Sunum: **Ergene E**, Sezlev Bilecen D, Ermis Sen M, Yilgor Huri P, Hasirci V. 3D Cellular Alignment Enhance ASC Myogenesis for Skeletal Muscle Tissue Engineering. 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB 2017), Athens, Greece, September 4-8, 2017.

İş Tecrübesi



TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Ergene E, Liman G, Yildiz E, Yilgor Huri P, Demirel G. Folding Control of Hydrogel Platforms through Pattern Design and Light Illumination, ACS Applied Polymer Materials, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00458>



Folding Control of Hydrogel Platforms through Pattern Design and Light Illumination

Emre Ergene, Gorkem Liman, Emrecan Yildiz, Pinar Yilgor Huri,* and Gokhan Demirel*

Cite This: *ACS Appl. Polym. Mater.* 2021, 3, 3272–3277

Read Online

ACCESS |

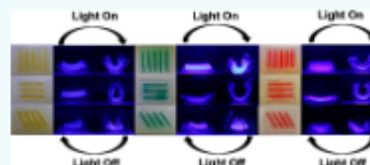
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Herein, we demonstrated a strategy to control the folding ability of hydrogel platforms through pattern design and light illumination. Hydrogel platforms, which consist of a temperature-responsive colored pattern, a temperature-responsive intermediate layer, and a passive (non-responsive) layer, were fabricated in molds with different geometries. Folding ability of the resulting films was manipulated by the light illumination, pattern design, and color. Furthermore, as a proof-of-concept, sample capturing from a target point was successfully demonstrated using the fabricated hydrogel platforms. These results show that our strategy may provide promising possibilities for the fabrication of the next-generation soft foldable materials.

KEYWORDS: foldable material, stimuli-responsive polymer, soft gripper, hydrogel, smart material, soft actuator



INTRODUCTION

Foldable platforms in response to an external stimulus offer new and unforeseen opportunities for many applications, including robotics, actuators, wearable electronics, biomedicine, and photonics.^{1–6} By manipulating the material chemistry and/or composition, the folding ability for such platforms can be controlled. To date, different materials have been used to fabricate foldable materials, e.g., metals, ceramics, and polymers.^{7–10} Among them, soft materials, which can provide both ease of production and greater degree of freedom compared to hard materials, are on the rise for the fabrication of platforms that can be folded in a controlled manner.^{11,12} Hydrogels, which are soft materials, can undergo reversible swelling and shrinkage behavior by exposing to an external stimulus such as pH, temperature, and ionic strength.^{13,14} The swelling ratio of the hydrogels can be easily manipulated by controlling the cross-linking density of the hydrogel network.¹⁵ Despite the unique features of hydrogels, they suffer from controlled folding or bending due to their homogeneous and anisotropic nature.^{16,17} However, it is well documented that the key parameter in the folding process is the material inhomogeneity and isotropic structure which provides the local actuation.^{13,18–20} Inhomogeneity in materials can be introduced using different strategies such as cross-linking gradients and forming multilayered materials with varying stiffness leading to controlled folding.¹² For example, Gracias and colleagues fabricated a foldable microscale platform using poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels.²¹ They showed that the resulting platforms can be reversibly actuated by temperature or pH. In another work, Stoychev et al. demonstrated a reversible encapsulation/releasing of yeast cells using a star-like patterned bilayer polycaprolactone-

poly(*N*-isopropylacrylamide) film by controlling temperature of medium.²² Anju et. al also reported a chitosan-poly(*N*-isopropylacrylamide) bilayer film.²³ The fabricated bilayer film showed reversible actuation when exposed to physiological range of body temperature without any solvent bath around. It is obvious that exploring new foldable materials and strategies are important not only to widen the scope of shape-changing platforms for potential applications but also to understand key parameters that controls folding mechanisms.

Despite the current advancements on foldable platforms,^{24–26} manipulation and control of folding process is still challenging. In this work, a trilayered polymeric platform consisting of a temperature-responsive colored pattern, the temperature-responsive intermediate layer, and the passive (nonresponsive) layer, was designed, and fabricated in a controlled manner to manipulate the folding ability of platforms. Different colors of acrylic dyes were used as coloring reagents. Platforms were fabricated within the molds with different designs. In design, the active hydrogel layer swells in aqueous medium together with the nonresponsive part at room temperature. As the temperature of medium rises, the active layer starts to shrink rapidly whereas the volume of the nonresponsive part remains almost constant. This difference in shrinkage creates a stress between layers and results into self-folding of the platform.^{27,28} The folding ability of the fabricated platforms was manipulated by controlling the

Received: April 13, 2021

Accepted: June 23, 2021

Published: June 24, 2021



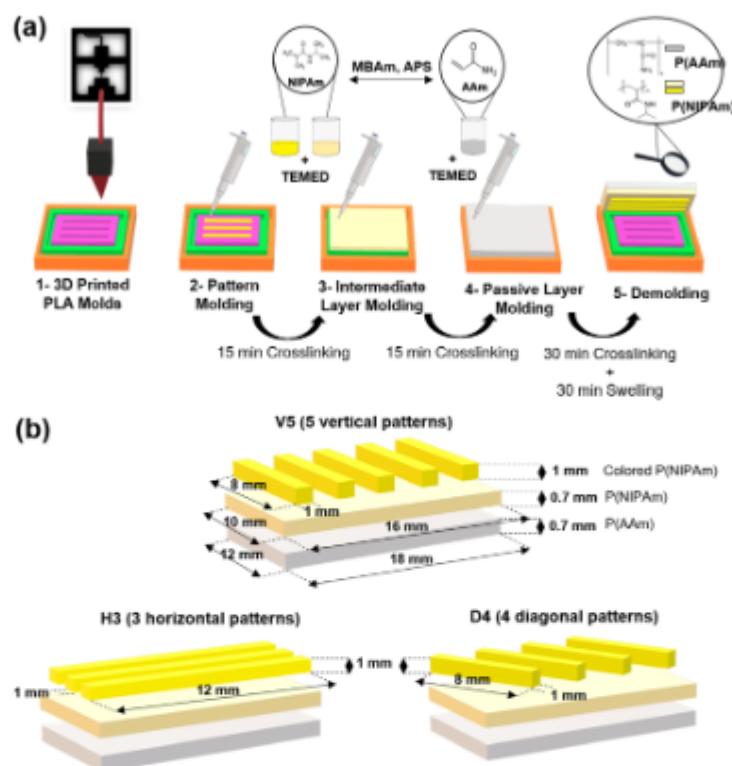


Figure 1. Schematic representation of the fabrication process for trilayered hydrogel platforms (a). Printing the molds with 3D printer (1). Filling the patterns with colored P(NIPAm) (2), the intermediate layer with colorless P(NIPAm) (3), and the passive layer with P(AAm) (4). Demolding the hydrogel platforms after cross-linking (5). Layer dimensions of the different models of the fabricated hydrogels after demolding (b).

pattern designs on the active layers and their colors. Additionally, we demonstrated the ability to control the motion of the resulting hydrogel platforms via a simple modification, which would dramatically facilitate the gripping a sample from the target environment.

MATERIALS AND METHODS

Materials. *N*-Isopropylacrylamide (NIPAm) 97%, acrylamide (AAm), *N,N'*-methylenebis(acrylamide) (MBAm) 99%, ammonium persulfate (APS), and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine 99.5% (TEMED) were purchased from Sigma-Aldrich (USA) and used as received. Molds were 3D printed by using poly(lactic acid) (PLA) filaments obtained from eSUN (China). Videos of controlled folding were also recorded with a Canon EOS 650D SLR camera (Japan).

Fabrication of Trilayered Responsive Hydrogel within 3D Printed Molds. Hydrogel platforms were produced to have two layers of temperature-responsive material and one layer of passive, non-responsive material (Figure 1a). This trilayered structure was fabricated successively within the molds as follows: Models of molds were first built using the 3D Builder software (Microsoft, USA) with various patterns and converted into G-codes using Cura software (Ultimaker, Netherlands). The molds were then printed with an Ultimaker2+ 3D

printer using PLA filaments. Printing parameters were as follows: 0.4 mm nozzle diameter, 50 mm/s printing speed, and 5% infill density.

For the fabrication of trilayered hydrogels, P(NIPAm) and P(AAm) hydrogels were synthesized using a free-radical polymerization technique within the molds in a successive manner. MBAm was selected as a cross-linker; APS and TEMED were also used as the initiator and accelerator, respectively.

The bottom temperature-responsive patterned layer was obtained by adding the acrylic paint (3%, v/v) into a NIPA-APS (2:1) solution. After addition of TEMED (0.1%, v/v), this mixture was quickly poured into the molds (Figure 1a-2). The reaction was carried out at room temperature (RT) for 15 min, resulting in a stable and cross-linked patterned layer. These patterned layers were fabricated in yellow, red, and green colors. After this step, colorless NIPA-APS (2:1) and 0.1% TEMED solution were mixed and poured into the molds (Figure 1a-3). The cross-linking of the thermoresponsive layers was completed within 15 min at RT.

For the temperature-responsive intermediate layer, NIPAm (0.4 g) and MBAm (10 mg) were first dissolved in 4 mL of distilled water. APS (47 mg) solution was also prepared using a 2 mL aliquot of distilled water in a separate container. These solutions were then mixed in a 2:1 ratio just before pouring into molds.

For the fabrication of uppermost passive layer, 1 g of AAm, 5 mg of MBAm, and 10 mg of APS were dissolved into 5 mL of distilled water. TEMED (0.1% v/v) was then added to this mixture and quickly poured into the precross-linked active layers (Figure 1a–4). Cross-linking was completed within 30 min at RT. Demolding of cross-linked polymers was succeeded after swelling in distilled water for 30 min at RT (Figure 1a–5). The resulting structure of the layers after demolding was as follows: the bottom layer of the structure is passive (nonresponsive; P(AAm)), the intermediate layer is temperature-responsive (P(NIPAm)), and the top layer is the colored temperature-responsive pattern (P(NIPAm)) (Figure 1b).

Following the fabrication process, the hydrogel platforms were stimulated with a blue LED light (470 nm, 50 W) in order to activate the temperature-responsive hydrogels and to control their folding. For all investigations, the distance between the light source and the platform was kept constant at ~10 cm, and the illumination angle was also 90°.

RESULTS AND DISCUSSION

In our investigation, P(NIPAm) was chosen as a stimuli-responsive polymer, and P(AAm) was used as a nonresponsive polymer. It is well-known that P(NIPAm) is a temperature sensitive polymer, which exhibits a temperature-dependent phase transition in aqueous solution upon a direct heating and cooling cycle, leading to changes in its hydrophobic/hydrophilic properties.²⁹ However, the direct heating and cooling method can cause problems, especially in the folding control of P(NIPAm)-based platforms. Liu et al. has recently demonstrated a technique to fold prestrained polystyrene (PS) sheets with colored hinges in a controlled manner using a light source with varying wavelengths.³⁰ As these materials absorb light at a particular wavelength, temperature of the colored areas increases due to the heat generated by the light and results in folding of the PS sheets. The wavelength of light source and its absorption by the dye are the key parameters in this strategy for self-folding. Compared with the conventional direct heating, heat generation by light illumination not only allows a tunable temperature-dependent phase transition but also provides much faster folding rate for platforms (Figure S2). In the present work, the molds were first designed with a software (3D Builder, Microsoft, USA) to have different patterns and produced with an FDM 3D printer using PLA filaments (Figure 1a–1). The number of patterns in designs was determined to cover the entire surface at equal intervals (Figure 1b). In the V5 model, five pieces of linear line were placed at an angle of 90° with respect to the X-axis while three linear lines were placed parallel to the X-axis in the H3 model. For the D4 model, patterns (four pieces) were integrated at an angle of 120° to the X-axis. The foldable trilayered hydrogel platforms were then fabricated into these molds with different thicknesses (Figure 1b). During fabrication, the third layer was also colored using acrylic dyes with yellow, green, and red color to control the heat generation by light (Figure S1). In the samples with only a pattern layer and a passive layer (no intermediate layer), the patterns cannot generate a level of stress between layers that would be sufficient to fold the passive layer. In order to overcome this problem, a second active layer (i.e., the intermediate layer) was included to the design to cover the surface of the passive layer. After lift-off, the folding ability of the resulting platforms was evaluated in water medium by exposing the platforms to 50-W blue LED light. For all investigations, the distance between the light source and the platform was kept constant at ~10 cm. Figure 2b shows the folding behavior of fabricated platforms before and after light illumination. For V5 model, platforms were folded along its long side of the hydrogel (Videos S1, S4, and S7) while hydrogels,

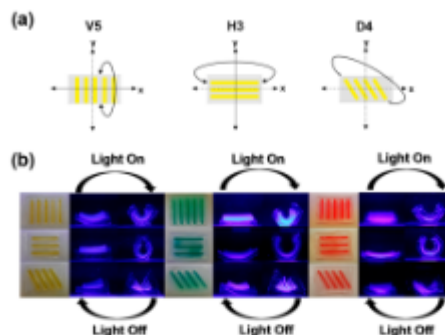


Figure 2. (a) Folding axis determined by the patterns. (b) Folding condition before and after illumination with a blue LED.

which were fabricated using the H3 model, were folded along their short side (Videos S2, S5, and S8). Once the hydrogel platforms obtained using the D4 model were illuminated with blue LED, they were folded from their corners where the pattern axis passes and formed a helix-like morphology (Figure 2a and Videos S3, S6, and S9). It should be noted that the thickness of the layers in platforms plays a key role in the folding process. Once the thicker nonresponsive P(AAm) layer (>0.7 mm) or thinner active P(NIPAm) layer (<1.0 mm) was fabricated, the resulting platforms did not exhibit any folding ability. Similarly, platforms showed random shrinkage behavior instead of controlled folding when they were heated conventionally in hot water (~40 °C). In the absence of a dye, the light cannot heat the environment of the platform sufficiently to be able to fold (Figure S3). To test this aspect, we fabricated a trilayered polymeric platform without any dye. The temperature change of the platforms without the introduction of dye was monitored using a thermal camera (FLIR E5). As expected, the temperature of the platforms was only increased from 23 to 25 °C after 40 min of light illumination. Therefore, platforms without dye cannot exhibit any folding ability.

To understand the folding ability of the fabricated hydrogels, V5- and H3-based platforms were investigated in detail. Depending on pattern color and geometry, hydrogel platforms exhibit different folding behaviors (Figure 3a). For the V5-based platforms, it has been determined that the pattern color does not have a significant effect on folding. Compared to the yellow- (Supporting Information, Video S1) and green-colored (Supporting Information, Video S4) patterns, the red-colored (Supporting Information, Video S7) platforms were able to exhibit much lower and slower folding. However, none of the V5-based platforms could reach complete folding. After 40 min, the yellow-colored platforms, which showed the best folding ability among the fabricated platforms, could only reach a folding angle of ~77° (Figure 3b). When H3-based platforms were examined, their folding capabilities differed very clearly depending on the pattern colors compared with the V5-based platforms. While the platforms colored with red (Supporting Information, Video S8) and green dyes (Supporting Information, Video S5) cannot reach complete folding in 60 min, the platforms colored with a yellow dye (Supporting Information, Video S2) have reached complete folding within ~30 min (Figure 3c). Our results clearly show that both pattern geometry

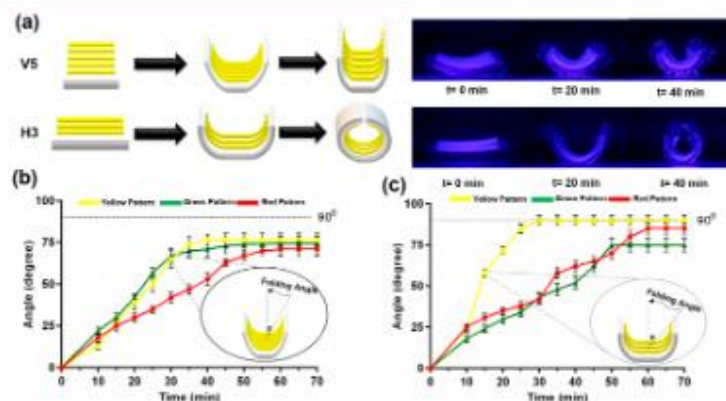


Figure 3. (a) Schematic demonstration and the video captured images of the self-folding hydrogels under light illumination. (b) Variation of folding angles for the V5 model as a function of time. (c) Variation of folding angles for the H3 model as a function of time.

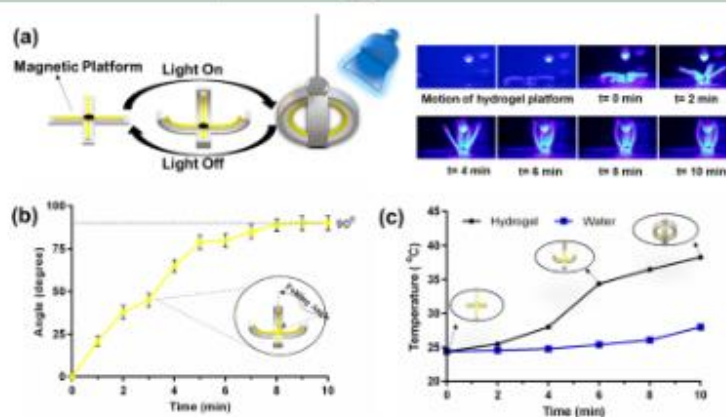


Figure 4. (a) Schematic representation of four-arm hydrogel platforms with magnetic film and the video-captured images of magnet-powered motion and sample capturing. (b) Variation of folding angles for four-arm platforms as a function of time. (c) Relationship between the temperature and the folding angle as a function of time.

and pattern color play an important role in folding process, and the folding ability of hydrogel-based materials could be manipulated using different platform design or color as desired.

To demonstrate the applicability of our approach, a proof-of-concept demonstration was carried out. At this point, our goal is to grip a sample material from a target point by controlling the motion and folding of fabricated four-arms hydrogel platforms. To control the motion of hydrogel platforms, they were decorated with a magnetic film (2 mm × 2 mm, 0.4 mm thickness) during fabrication. Magnetic film provides the motion of platforms with the help of a magnetic field. A Styrofoam ball (~1 cm in diameter) was used as a target sample. It should be noted that all experiments were carried out under water. In the experiment, the four-arms hydrogel platform was

first delivered to the target destination by controlling the magnetic field and, sample material from the target were subsequently gripped by the arms of platforms using the light source (Figure 4a and Supporting Information, Video S10). The folding was started immediately with the light illumination and completed in 10 min. During the folding process, temperature of the hydrogel was also monitored. Although the temperature of the platform reached ~38 °C at the end of the process, the medium temperature remained constant at ~26 °C (Figure 4c).

CONCLUSION

A trilayered hydrogel platform with a tunable folding ability has been designed and fabricated by using P(NIPAm) and P(AAm) hydrogels. Folding of platforms was manipulated using different

colors of acrylic dyes, mold design, and light illumination. Compared with the conventional direct heating, heat generation by light illumination not only allows a tunable temperature-dependent phase transition but also provides much faster folding rate for platforms. The hydrogel platforms with different geometries and sizes could be fabricated to expand their applicability. Furthermore, as a proof-of-concept, sample capturing from a target point was successfully demonstrated by controlling the platform motion and folding. These observations bring a new promising entry for the design of hydrogel-based soft actuator platforms.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsapm.1c00458>.

Video captions, chemical structure of acrylic dyes, optical images of trilayered platforms without dye under blue light illumination and direct heating, and thermal camera images of the platforms before and after folding process under light illumination (PDF)

Videos for folding process of VS-, H3-, and D4-based hydrogel platforms with different dyes and a video for magnetic field powered motion and gripping target using hydrogel platform (ZIP)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Gokhan Demirel – Bio-inspired Materials Research Laboratory (BIMREL), Department of Chemistry, Gazi University, Ankara 06500, Turkey; orcid.org/0000-0002-9778-9178; Email: nanobiotechnology@gmail.com

Pinar Yilgor Huri – Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Ankara University, Ankara 06830, Turkey; Medical Design Research and Application Center (MEDITAM), Ankara University, Ankara 06560, Turkey; Email: phuri@ankara.edu.tr

Authors

Enure Ergene – Bio-inspired Materials Research Laboratory (BIMREL), Department of Chemistry, Gazi University, Ankara 06500, Turkey; Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Ankara University, Ankara 06830, Turkey; Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara 06135, Turkey

Gorkem Liman – Bio-inspired Materials Research Laboratory (BIMREL), Department of Chemistry, Gazi University, Ankara 06500, Turkey

Emrehan Yildiz – Bio-inspired Materials Research Laboratory (BIMREL), Department of Chemistry, Gazi University, Ankara 06500, Turkey

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsapm.1c00458>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

(1) Huang, H. W.; Sakar, M. S.; Petruska, A. J.; Pané, S.; Nelson, B. J. Soft Micromachines with Programmable Motility and Morphology. *Nat. Commun.* 2016, 7, 1–10.

(2) Wu, Z.; Wang, Y.; Liu, X.; Lv, C.; Li, Y.; Wei, D.; Liu, Z. Carbon-Nanomaterial-Based Flexible Batteries for Wearable Electronics. *Adv. Mater.* 2019, 31 (9), 1800716.

(3) Apsite, I.; Stoychev, G.; Zhang, W.; Jehnichen, D.; Xie, J.; Ionov, L. Porous Stimuli-Responsive Self-Folding Electrospun Mats for 4D Biofabrication. *Biomacromolecules* 2017, 18 (10), 3178–3184.

(4) Li, L.; Lin, H.; Michon, J.; Huang, Y.; Li, J.; Du, Q.; Yadav, A.; Richardson, K.; Gu, T.; Hu, J. A New Twist on Glass: A Brittle Material Enabling Flexible Integrated Photonics. *Int. J. Appl. Glass Sci.* 2017, 8 (1), 61–68.

(5) Li, L.; Zhang, P.; Wang, W.-M.; Lin, H.; Zerdoun, A. B.; Geiger, S. J.; Liu, Y.; Xiao, N.; Zou, Y.; Ogburn, Q.; Du, Q.; Jia, X.; Li, J.; Hu, J. Foldable and Cytocompatible Sol-Gel TiO₂ Photonics. *Sci. Rep.* 2015, 5 (1), 13832.

(6) Suo, Z.; Ma, E. Y.; Gleskova, H.; Wagner, S. Mechanics of Rollable and Foldable Film-on-Foil Electronics. *Appl. Phys. Lett.* 1999, 74 (8), 1177–1179.

(7) Yang, H.; Yeow, B. S.; Li, Z.; Li, K.; Chang, T. H.; Jing, L.; Li, Y.; Ho, J. S.; Ren, H.; Chen, P. Y. Multifunctional Metallic Backbones for Origami Robotics with Strain Sensing and Wireless Communication Capabilities. *Sci. Robot.* 2019, 4 (33), eaar7020.

(8) Shi, Q.; Shi, X.; Gattas, J. M.; Kitipornchai, S. Folded Assembly Methods for Thin-Walled Steel Structures. *J. Constr. Steel Res.* 2017, 138, 235–245.

(9) Kwag, H. R.; Cho, J. H.; Park, S. Y.; Park, J.; Gracias, D. H. Self-Folding Nanostructures with Imprint Patterned Surfaces (SNIPS). *Faraday Discuss.* 2016, 191, 61–71.

(10) Azam, A.; Laffin, K. E.; Jamal, M.; Fernandes, R.; Gracias, D. H. Self-Folding Micropatterned Polymeric Containers. *Biomed. Microdevices* 2011, 13 (1), 51–58.

(11) Zhou, L.-Y.; Fu, J.; He, Y. A Review of 3D Printing Technologies for Soft Polymer Materials. *Adv. Funct. Mater.* 2020, 30 (28), 2000187.

(12) Liu, J.; Gao, Y.; Lee, Y.-J.; Yang, S. Responsive and Foldable Soft Materials. *Trends Chem.* 2020, 2 (2), 107–122.

(13) Chen, G.; Hoffman, A. S. Graft Copolymers That Exhibit Temperature-Induced Phase Transitions over a Wide Range of PH. *Nature* 1995, 373 (6509), 49–52.

(14) Bin Imran, A.; Esaki, K.; Gotoh, H.; Seki, T.; Ito, K.; Sakai, Y.; Takeoka, Y. Extremely Stretchable Thermosensitive Hydrogels by Introducing Slide-Ring Polytetraene Cross-Linkers and Ionic Groups into the Polymer Network. *Nat. Commun.* 2014, 5, 1–8.

(15) Ganji, F.; Vashghani-Farahani, S.; Vashghani-Farahani, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iran. Polym. J. (English Ed.)* 2010, 19 (5), 375–398.

(16) Qin, H.; Zhang, T.; Li, N.; Cong, H.-P.; Yu, S.-H. Anisotropic and Self-Healing Hydrogels with Multi-Responsive Actuating Capability. *Nat. Commun.* 2019, 10 (1), 2202.

(17) Zhang, C.-L.; Cao, F.-L.; Wang, J.-L.; Yu, Z.-L.; Ge, J.; Lu, Y.; Wang, Z.-H.; Yu, S.-H. Highly Stimuli-Responsive Au Nanorods/Poly(N-Isopropylacrylamide) (PNIPAM) Composite Hydrogel for Smart Switch. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9 (29), 24857–24863.

(18) Chen, Y.; Yang, J.; Zhang, X.; Feng, Y.; Zeng, H.; Wang, L.; Feng, W. Light-Driven Bimorph Soft Actuators: Design, Fabrication, and Properties. *Mater. Horiz.* 2021, 8 (3), 728–757.

(19) Xue, P.; Bisoyi, H. K.; Chen, Y.; Zeng, H.; Yang, J.; Yang, X.; Lv, P.; Zhang, X.; Priimagi, A.; Wang, L.; Xu, X.; Li, Q. Near-Infrared Light-Driven Shape Morphing of Programmable Anisotropic Hydrogels Enabled by MXene Nanosheets. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2021, 60 (7), 3390–3396.

(20) Wang, L.; Li, Q. Photochromism into Nanosystems: Towards Lighting up the Future Nanoworld. *Chem. Soc. Rev.* 2018, 47 (3), 1044–1097.

(21) Yoon, C.; Xiao, R.; Park, J.; Cha, J.; Nguyen, T. D.; Gracias, D. H. Functional Stimuli Responsive Hydrogel Devices by Self-Folding. *Smart Mater. Struct.* 2014, 23 (9), 094008.

(22) Stoychev, G.; Pureskiy, N.; Ionov, L. Self-Folding All-Polymer Thermoresponsive Microcapsules. *Soft Matter* 2011, 7 (7), 3277–3279.

- (23) Anju, V. P.; Pratoori, R.; Gupta, D. K.; Joshi, R.; Annabattula, R. K.; Ghosh, P. Controlled Shape Morphing of Solvent Free Thermoresponsive Soft Actuators. *Soft Matter* **2020**, *16* (17), 4162–4172.
- (24) Lim, H.-R.; Kim, H. S.; Qazi, R.; Kwon, Y.-T.; Jeong, J.-W.; Yeo, W.-H. Advanced Soft Materials, Sensor Integrations, and Applications of Wearable Flexible Hybrid Electronics in Healthcare, Energy, and Environment. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (15), 1901924.
- (25) Tang, L.; Wang, L.; Yang, X.; Feng, Y.; Li, Y.; Feng, W. Poly(N-Isopropylacrylamide)-Based Smart Hydrogels: Design, Properties and Applications. *Prog. Mater. Sci.* **2021**, *115*, 100702.
- (26) Rong, Q.; Lei, W.; Liu, M. Conductive Hydrogels as Smart Materials for Flexible Electronic Devices. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24* (64), 16930–16943.
- (27) Li, X.; Cai, X.; Gao, Y.; Serpe, M. J. Reversible Bidirectional Bending of Hydrogel-Based Bilayer Actuators. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (15), 2804–2812.
- (28) Ionov, L. Soft Microorigami: Self-Folding Polymer Films. *Soft Matter* **2011**, *7* (15), 6786–6791.
- (29) Ohmorig, M. L.; Ting, J. M.; Jones, S. D.; Jung, S.; Bates, F. S.; Reineke, T. M. Tuning PNIPAm Self-Assembly and Thermoresponse: Roles of Hydrophobic End-Groups and Hydrophilic Comonomer. *Polym. Chem.* **2019**, *10* (25), 3469–3479.
- (30) Liu, Y.; Shaw, B.; Dickey, M. D.; Genzer, J. Sequential Self-Folding of Polymer Sheets. *Sci. Adv.* **2017**, *3* (3), e1602417.