

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HÜCRESİZLEŞTİRİLMİŞ DERİ DOKU KATKILI POLİKAPROLAKTON
(PCL) DOKU İSKELELERİNİN ERİYİK ELEKTROYAZIM (MEW) YÖNTEMİ
İLE HAZIRLANMASI VE DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIM
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

Melek İpek ERTUĞRUL

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HÜCRESİZLEŞTİRİLMİŞ DERİ DOKU KATKILI POLİKAPROLAKTON (PCL) DOKU İSKELELERİNİN ERİYİK ELEKTROYAZIM (MEW) YÖNTEMİ İLE HAZIRLANMASI VE DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

Melek İpek ERTUĞRUL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sedat ODABAŞ

Eriyik elektroyazım tekniği ile yazdırılmış poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) doku iskeleleri ve üç boyutlu (3B) baskısı alınmış hücresizleştirilmiş deri doku hidrojellerinin sandviç şeklinde birleştirilmesiyle doku iskelesi tasarlanmıştır. Geliştirilen biyouyumlu ve biyoaktif doku iskelesinin deri doku mühendisliğinde kullanım potansiyeli incelenmiştir. PCL doku iskelelerinin uygun morfolojide yazdırılması ve hücresizleştirilmiş deri doku hidrojellerinin 3B baskısı için, iki farklı basım tekniğinin optimum parametreleri belirlenmiştir. Tasarlanan doku iskelelerinin karakterizasyonu için FTIR (Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi), Termogravimetrik analiz (TGA) ve X-ışını kırınım analizi (XRD) yöntemleri kullanılmıştır. Deri dokuları, Tripsin-EDTA (etilen diamintetraasetik asit), Sodyum Azid ve Triton X-100 içeren çözeltiler ile hücrelerinden arındırılmıştır. Hücresizleştirilmiş dokular, DNA içerik analizi, glikozaminoglikan (GAG) analizi, kollajen içerik analizi ve Bradford Yöntemi ile total protein analizi yapılarak karakterize edilmiştir. Dokuların morfolojileri histoloji çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Doku iskelelerinin bozunma davranışları enzimatik ve hidrolitik çözeltilerde değerlendirilmiştir. Tasarlanan doku iskelelerinin insan dermal fibroblast ve fare fibroblast (L929) hücrelerinde sitotoksik özellikleri ve iskeleler üzerindeki çoğalma davranışları incelenmiştir. Doku iskelelerinin antimikrobiyal etkinlikleri incelenmiştir.

Ocak 2023, 72 sayfa

Anahtar Kelimeler: Hücresizleştirme, poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), Eriyik Elektroyazım (MEW), Deri Doku, Doku Mühendisliği

ABSTRACT

Master Thesis

PREPARATION OF DECELLULARIZED SKIN INCORPORATED POLYCAPROLACTONE (PCL) SCAFFOLDS BY MELT ELECTROWRITING (MEW) AND INVESTIGATION OF THEIR POTENTIAL USE FOR TISSUE ENGINEERING

Melek İpek ERTUĞRUL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sedat ODABAŞ

The scaffold was designed by combining melt electrowriting poly(ϵ -caprolactone) (PCL) scaffolds and three-dimensional (3D) printed decellularized skin tissue hydrogels in the form of sandwiches. The potential of the developed biocompatible and bioactive scaffold in skin tissue engineering was investigated. The optimum parameters of two different printing techniques were determined for the printing of PCL scaffolds with the appropriate morphology and for the 3D printing of decellularized skin tissue hydrogels. FTIR (Fourier-Transform Infrared spectroscopy), Thermogravimetric analysis (TGA) and X-ray diffraction analysis (XRD) methods were used for the characterization of the designed tissue scaffolds. Skin tissues were decellularized with solutions containing Trypsin-EDTA (ethylene diaminetetraacetic acid), Sodium Azide and Triton X-100. Decellularized tissues were characterized by DNA content analysis, glycosaminoglycan (GAG) analysis, collagen content analysis and total protein analysis with the Bradford Method. The morphologies of the tissues were evaluated by histology studies. The degradation behavior of scaffolds was evaluated in enzymatic and hydrolytic solutions. The cytotoxic properties of the designed scaffolds in human dermal fibroblast and mouse fibroblast (L929) cells and their proliferation behavior on the scaffolds were investigated. The antimicrobial activities of the scaffolds were investigated.

January 2023, 72 pages

Key Words: Decellularization, poly(ϵ -caprolactone) (PCL), Melt Electro-writing (MEW), Skin Tissue, Tissue Engineering

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmalarında bana yön gösteren, destek ve emeklerini esirgemeyen, beni yüreklendiren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım değerli hocam sayın Doç. Dr. Sedat ODABAŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı),

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkısını, yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen, birlikte çalışma fırsatı elde ettiğim için kendimi şanslı hissettiğim kıymetli hocam Doç. Dr. Burak DERKUŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı),

Bütün desteklerinden dolayı laboratuvar arkadaşlarım, Öğr. Gör. Fulya ÖZDEMİR'e (Ufuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu), Melis IŞIK'a, Dilara KURT'a, Buse SARI'ya, Mustafa SÜNGÜ'ye, histoloji çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Öğr. Gör. Hakan ESKİZENGİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı), Karakterizasyon ve mikrobiyal test ve analizler için Dr. Serhat ODABAŞ ve Dr. Gülcan ŞAHAL'a, her anımda yanımda oldukları için Süveydanas KOCACIK'a, Yağmur ÇİNAR'a ve beni her zaman cesaretlendiren ve sevgisini her zaman hissettiğim Gökhan ÖZYÜREK'e,

Son olarak tüm hayatım boyunca yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, beni cesaretlendiren ve moral veren annem Ayşe ERTUĞRUL'a, bütün fedakarlıklarından dolayı babam İmayet ERTUĞRUL'a ve abim Kadir ERTUĞRUL'a,

Tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Melek İpek ERTUĞRUL
Ankara, Ocak 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Doku Mühendisliği.....	3
2.2 Hücresizleştirme.....	3
2.2.1 Hücresizleştirme yöntemleri	4
2.2.1.1 Fiziksel yöntemler	4
2.2.1.2 Kimyasal yöntemler	5
2.2.1.3 Enzimatik yöntemler.....	7
2.3 Hücre Dışı Matris (ECM).....	8
2.3.1 Hücresizleştirilmiş hücre dışı matris (dECM) iskeleleri	9
2.4 Üç Boyutlu (3B) Doku İskelesi ve Üretim Yöntemleri.....	10
2.4.1 Çözücü dökme/partikül süzme yöntemi.....	11
2.4.2 Gaz köpürtme yöntemi	11
2.4.3 Emülsifikasyon/ dondurarak kurutma yöntemi.....	12
2.4.4 Faz ayrımı yöntemi	12
2.4.5 Elektro eğirme yöntemi	13
2.4.6 Üç boyutlu (3B) baskı teknolojisi.....	13
2.4.6.1 Mürekkep püskürtmeli biyobaskı yöntemi.....	14
2.4.6.2 Lazer destekli biyobaskı yöntemi	14
2.4.6.3 Mikrovalf baskı yöntemi.....	14
2.4.6.4 Ekstrüzyon baskı yöntemi	15
2.4.6.5 Stereolitografi (STL).....	15
2.4.6.6 Seçici lazer sinterleme (SLS).....	15
2.4.6.7 Eriyik yığılma modelleme (FDM)	16
2.5 Elektro-Hidrodinamik Baskı Teknikleri	16
2.5.1 Çözeltili elektro eğirme	16

2.5.2 Eriyik elektro eğirme	17
2.5.3 Eriyik elektro yazım (MEW).....	17
3. KAYNAK ÖZETLERİ	20
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
4.1 Materyal	25
4.2 Yöntem	26
4.2.1 Hücresizleştirilmiş sıçan deri ECM iskelelerinin hazırlanması.....	26
4.2.1.1 Hücresizleştirilmiş sıçan deri ECM'sinin jelleştirilmesi	26
4.2.1.2 3B yazıcı ile hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojelinin doku iskelesi baskılanması ve çapraz bağlama yöntemi	27
4.2.2 Eriyik elektoryazım (MEW) yöntemi ile 3B PCL doku iskelelerinin hazırlanması	27
4.2.3 Hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojelleri ile modifiye edilen PCL doku iskelelerinin hazırlanması	28
4.2.4 Hücresizleştirilmiş deri ECM'sinin karakterizasyon çalışmaları	29
4.2.4.1 Hücresizleştirilmiş deri dokularının DNA içeriğinin belirlenmesi.....	29
4.2.4.2 Glikozaminoglikan (GAG) miktarının tayini	29
4.2.4.3 Kollajen miktar tayini	30
4.2.4.4 Bradford (Coomassie brilliant mavisi) Yöntemi ile total proteinin belirlenmesi	30
4.2.4.5 Histoloji çalışmaları	31
4.2.4.5.1 Hematoksilen&Eozin boyaması (H&E)	31
4.2.4.5.2 Masson trikrom boyaması.....	32
4.2.5 PCL, 3B Hücresizleştirilmiş deri ECM ve Modifiye Edilmiş PCL Doku İskelelerinin Karakterizasyon Çalışmaları	32
4.2.5.1 Şişme testi.....	32
4.2.5.2 Biyobozunurluk çalışmaları	33
4.2.5.3 Temas açısı ölçümü	33
4.2.5.4 Reoloji	34
4.2.5.5 Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	34
4.2.5.6 Termogravimetrik analiz (TGA)	34
4.2.5.7 X-ışını kırınım analizi (XRD).....	34
4.2.6 Hücre kültür çalışmaları	34
4.2.6.1 Sitotoksite testleri	35
4.2.6.1.1 MTT testi	35
4.2.6.1.2 LDH salınım testi.....	36

4.2.6.2 Hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışı.....	36
4.2.6.3 Akridin Oranj/Propidyum İyodür (AO/PI) İkili Boyama ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi	37
4.2.7 Anti-mikrobiyal etkinlik testleri	37
5. BULGULAR	38
5.1 Hücresizleştirilmiş Deri Doku ECM İskelesinin Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları.....	38
5.1.1 DNA içerik analizi	39
5.1.2 Glikozaminoglikan (GAG) miktarının tayini	40
5.1.3 Kollajen miktar tayini.....	40
5.1.4 Bradford (Coomassie brilliant mavisi) yöntemi ile total proteinin belirlenmesi	41
5.1.5 Histoloji boyamaları.....	42
5.2 PCL, 3B Hücresizleştirilmiş Deri ECM ve Modifiye Edilmiş PCL Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyon Çalışmaları	43
5.2.1 PCL, 3B hücresizleştirilmiş deri ECM ve modifiye edilmiş PCL doku iskelelerinin hazırlanması	43
5.2.2 Şişme testi.....	46
5.2.3 Biyobozunurluk çalışmaları	47
5.2.4 Temas açısı ölçümü	48
5.2.5 Reoloji çalışmaları.....	49
5.2.6 Fouirer transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	50
5.2.7 Termogravimetrik analiz (TGA)	51
5.2.8 X-ışını kırınım analizi (XRD).....	53
5.3 Hücre Kültür Çalışmaları	53
5.3.1 Sitotoksite testleri	53
5.3.1.1 MTT testi	53
5.3.1.2 LDH salınım testi	54
5.3.2 Hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışları.....	55
5.3.3 Akridin oranj/propidyum iyodür (AO/PI) ikili boyaması.....	56
5.4 Anti-mikrobiyal Etkinlik Testi Sonuçları	58
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

mg	Miligram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
ng	Nanogram
%	Yüzde oranı
M	Molar
mM	Milimolar
°C	Santigrat
kV	Kilovolt

Kısaltmalar

PCL	Poli (ε-kaprolakton)
PP	Poli propilen
ECM	Hücre Dışı Matris
dECM	Hücreleştirilmiş Hücre Dışı Matris
dsECM	Hücreleştirilmiş Deri Hücre Dışı Matrisi
MEW	Eriyik Elektroyazım
SLS	Seçici Lazer Sinterleme
FDM	Eriyik Yığma Modelleme
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EDC	1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) karbodiimid
NHS	N-hidroksisüksinimid
MES	2-(N-Morfolino) etansülfonik asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
FTIR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi
XRD	X-ışını kırınım analizi
TGA	Termal gravimetrik analiz
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
GAG	Glikozaminoglikan
H&E	Hematoksilen-Eozin
AO/PI	Akridin Oranj/Propidyum İyodür
FBS	Fetal Sığır Serumı
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium /Nutrient Mixture F-12
DNA	Deoksiribonükleik asit
LDH	Laktat dehidrogenaz
CO ₂	Karbondioksit
HCl	Hidroklorik Asit
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
Rpm	Dakikada Devir
DMMB	Dimetil metilen mavisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 MEW tekniği ile PCL polimerinin jet başlangıcı (Dalton vd. 2021).....	18
Şekil 3.1 dECM bioinkin basılabilirlik testleri (Kim vd. 2018).....	20
Şekil 3.2 Hidrojel tipine göre üç kopya halinde yapay basılabilirlik testlerinin temsili görüntüleri (Jorgensen vd. 2020)	21
Şekil 3.3 A) 0.25 mm enjektör ucu ile farklı basınç koşullarında 3B baskı denemeleri, B) Optimize edilmiş yazdırma parametrelerinde ddECM hidrojel ile basılmış yapılar (Pati vd. 2022).....	22
Şekil 4.1 MEW tekniği ile bazı PCL baskı denemeleri	28
Şekil 5.1 A) Sıçan deri doku örnekleri B) Hücresizleştirilmiş sıçan deri doku örnekleri C) Öğütülerek toz forma getirilen hücresiz deri doku.....	38
Şekil 5.2 A) dsECM'nin jelleşmesi B) Nötralize edilmiş dsECM jeli.....	39
Şekil 5.3 Doğal ve hücresizleştirilmiş doku için DNA içerik analizi grafiği, n=3 (** p<0.01).....	39
Şekil 5.4 Doğal doku ve hücresizleştirilmiş doku için GAG içerik analizi grafiği (n=3).....	40
Şekil 5.5 Doğal doku ve hücresizleştirilmiş doku için kollajen içerik analiz grafiği (n=3).....	41
Şekil 5.6 dsECM'nin protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik.....	42
Şekil 5.7 A) Doğal dokunun H&E boyaması B) Hücresizleştirilmiş dokunun H&E boyaması.....	42
Şekil 5.8 A) Doğal dokunun Masson Trikrom boyaması B) Hücresizleştirilmiş dokunun Masson Trikrom boyaması	43
Şekil 5.9 dsECM hidrojelinin 3B baskı denemeleri.....	44
Şekil 5.10 A) Çapraz bağlama işleminden sonra 3B dsECM görüntüleri, B) Işık mikroskop altındaki görüntüsü, C) Stereomikroskop altındaki görüntüleri	44
Şekil 5.11 MEW tekniği ile yazdırılan PCL doku iskelelerinin baskı sırasındaki görüntüleri	45
Şekil 5.12 A) MEW ile basılan PCL doku iskeleleri, B) Işık mikroskop altındaki görüntüsü, C) Stereomikroskop altındaki görüntüleri.....	45
Şekil 5.13 A) Sandviç doku iskelelerinin hazırlanması, B) Işık mikroskop görüntüleri, C) Stereomikroskop görüntüleri	46
Şekil 5.14 dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin zamana bağlı şişme oranlarını gösteren çizgi grafiği	46
Şekil 5.15 PCL, dsECM ve Sandviç (dsECM-PCL) doku iskelelerinin PBS ve Lizozim çözeltisi içindeki zamana bağlı bozunma grafikleri.....	47
Şekil 5.16 3B dsECM doku iskelesinin temas açısı görüntüleri	48

Şekil 5.17 %5 deri ECM, %5 deri ECM/ %0.5 kollajen (hücreleştirilmiş tendon), %5 deri ECM/ %1 kollajen (hücreleştirilmiş tendon) ve %5 deri ECM/ %1.5 kollajen (hücreleştirilmiş tendon) hidrojenlerin viskozitelerinin kayma hızı ile değişimi	50
Şekil 5.18 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin FTIR spektrumları.....	51
Şekil 5.19 Sırası ile PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin termogram grafikleri	52
Şekil 5.20 PCL, dsECM ve dsECM-PCL'nin XRD grafiği.....	53
Şekil 5.21 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin insan dermal fibroblast ve L929 hücreleri üzerinde % hücre canlılığı gösteren sütun grafikleri	54
Şekil 5.22 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin insan dermal fibroblast ve L929 hücreleri üzerinde LDH testi ile hücre canlılığı gösteren sütun grafikleri	55
Şekil 5.23 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerin üzerine ekimi yapılan insan dermal fibroblast ve L929 hücrelerin belirli günlerde MTT yöntemi ile belirlenen hücre canlılık oranları	55
Şekil 5.24 L929 hücrelerinin 24 saat kültürden sonra AO/PI boyamasının floresan mikroskop görüntüleri	56
Şekil 5.25 L929 hücrelerinin 48 saat kültürden sonra AO/PI boyamasının floresan mikroskop görüntüleri	57
Şekil 5.26 İlaç yüklü doku iskelelerinin görüntüsü A) PCL, B) dsECM C) Sandviç doku iskelesi	58
Şekil 5.27 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin anti-mikrobiyal etkinlik grafikleri	59

1. GİRİŞ

Deri, vücudumuzu enfeksiyonlar, yanıklar, kimyasal ve fiziksel hasarlar gibi birçok zararlı dış etkilere karşı koruyan, bir bariyer ve örtü görevi gören, insan vücudunun en büyük organıdır (Sobhanian vd. 2019). Epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç katmandan oluşan deri, çok katmanlı ve karmaşık bir yapıya sahiptir. Derinin yapısı hücreler, lifler, hücre dışı matris (ECM), sinirler, kıl folikülleri gibi çeşitli bileşenlerden oluşmaktadır (Pereira vd. 2017). Kendi kendini yenileyebilen cilt, bu özelliğini akut veya enfeksiyonlu yaralanmalarda gerçekleştiremez. Bu nedenle, cilt greftlerinin uygulanması tıp alanında oldukça ilgi görmektedir. Deri greftleri, çoğu yara türünü iyileştirmeye ve/veya onarmaya yardımcı olur (Khoshnood vd. 2020).

Son 25 yılda insan cildini taklit eden greftler yaratmak üzerine çok sayıda çalışmalar gerçekleştirilmiştir (MacNeil 2007). Bu deri greftleri, ileri doku mühendisliği yaklaşımları kullanılarak gerçekleştirilmiş olup ve klinik uygulamalarda kullanılmış, akut ve kronik yaraların iyileşmesini teşvik etmiş ve farmasötik araştırmalar için kullanılmıştır (Ponac 2002).

Deri doku mühendisliği yaklaşımlarıyla, hasarlı dokunun onarılması amaçlanmaktadır ve elde edilen deri greftlerinin uygulamalarını sınırlayan birçok etken vardır. Bunlardan bazıları, cildin yapısını ve işlevini taklit edememe, mekanik kırılganlık, donör eksikliği, düşük aşılama oranı, vaskülerizasyon ve innervasyon eksikliği, yüksek maliyet ve zaman tüketimidir (Kim vd. 2018). Kusursuz bir deri grefti, biyouyumluluk, iyi esneklik, dayanıklılık, basit hazırlama, hücre tutunma, çoğalma ve olgunlaşma, enfeksiyon önleyici özellikler gibi bazı önemli özelliklere sahip olmalıdır.

Doku mühendisliği yaklaşımlarından biri olan hücresizleştirme yöntemleri ile elde edilen hücre dışı matrisi (ECM) iskeleleri, doku yenilenmesinde yapay iskeleler oluşturmak için günümüzde oldukça tercih edilmektedir. Buna ek olarak, mekanik özellikleri ve biyobozunur olmaları nedeniyle poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) gibi yarı kristalin polyesterler, doku mühendisliği çalışmalarında güçlü bir seçenektir. PCL

bazlı malzemelerle yapılan hücre kültür çalışmaları, PCL'nin biyouyumlu olduğunu ve farklı hücre tipleri ile etkileşime girerek hücrelerin çoğalmasını desteklediğini göstermiştir (Dalton vd. 2021).

Eriyik elektro yazım (MEW) yöntemi ile elde edilen nanofiber iskeleler, yüksek çözünürlükleri ve fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı, doku mühendisliği alanında potansiyel uygulama alanı oluşturmaktadır. Eriyik elektro yazım yöntemi ile, PCL, PP gibi termoplastiklerden esnek yapıda nanofiber iskeleler üretilmektedir (Dalton 2017).

Bu tez çalışmasında, MEW yöntemiyle yazdırılacak PCL iskelelerinin, hücrelerinden arındırılmış deri dokusu ECM'si ile modifiye edilmesi sonucu oluşturulacak doku iskelelerinin deri doku mühendisliği için kullanım potansiyeli incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, farklı biyolojik doku türlerinde hasar gören dokuyu onarmak, iyileştirmek ve işlevini devam ettirmek veya yenilemek gibi doku benzeri yapılar oluşturmak için canlı hücreler, büyüme faktörleri gibi uygun biyokimyasal ve fiziksel faktörleri ve biyouyumlu malzemeleri bunların kombinasyonlarını kullanan çok disiplinli bir mühendislik alanıdır (Berthiaume vd. 2011).

Doku mühendisliği uygulamaları ile doku kaybı veya organ yetmezliği, tasarlanmış bir yapı iskelesinin implantasyonu veya alternatif olarak *ex vivo* perfüzyon sistemleri ile tedavi edilebilir. Bu teknoloji ile tasarlanmış yapı iskeleleri, tedavi sırasında tamamen işlevsel olabilir veya implantasyon üzerine beklenen fonksiyonel dokuyu entegre etme ve oluşturma potansiyeline sahip olabilir (Chapekar 2000).

Bazı durumlarda, biyomalzemeler, hasarlı dokuyu onaran veya değiştiren belirli hücre popülasyonlarının göçünü ve bağlanmasını artırmak için modifiye edilir. Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan yapı iskelelerinin, rejenerasyon sırasında mekanik destek sağlayan, biyouyumlu olan, inflamatuvar yanıtı neden olmayan, rejenerasyon hızına ve dolayısıyla degradasyona uygun, toksik olmayan, hücrenin yapışmasını ve çoğalmasını sağlayan özelliklere sahip olması gerekir. Doku mühendisliğinde kullanılan yapı iskeleleri hem sentetik hem de doğal olmak üzere farklı yöntemler ve malzemelerle elde edilebilir.

2.2 Hücresizleştirme

Hücresizleştirme, doku ve organların geriye hücre dışı matris (ECM) kalacak şekilde canlı hücrelerinden arındırılmasını amaçlayan doku mühendisliği uygulamalarından biridir. Hücresizleştirilmiş matrisler, kıkırdak, deri, kemik, mesane, kan damarları, kalp, karaciğer, akciğer vb. gibi fonksiyonel doku ve organların mühendisliği için yaygın olarak kullanılmaktadır (Hoshiba vd.2010).

Hücresizleştirilmiş doku ve organlardan türetilen biyolojik iskeleler, hem klinik öncesi hayvan çalışmalarında hem de insan klinik uygulamalarında başarılı sonuçlar elde etmiştir (Badylak vd. 2004, Wainwright 1995).

Hücresizleştirme yöntemindeki temel amaç, ECM bileşiminin, biyolojik aktivitesi ve mekanik bütünlüğü üzerindeki herhangi bir olumsuz etkiyi en aza indirirken tüm hücresel ve nükleer materyali (DNA) verimli bir şekilde uzaklaştırmaktır. Hücresizleştirme işleminin yöntemi ve etkinliği, ECM'nin üç boyutlu mimarisini ve bilemişini etkilemektedir.

2.2.1 Hücresizleştirme yöntemleri

Doku veya organın etkili bir hücresizleştirme işlemi için farklı teknikler (kimyasal, fiziksel ve enzimatik) bulunmaktadır. Bu yöntemler, hücresizleştirme işleminin etkinliğini artırmak için birbirinin kombinasyonu halinde kullanılmaktadır (Mishra vd. 2017).

Hücresizleştirme protokolü genellikle fiziksel işlemler veya iyonik çözeltiler kullanılarak hücre zarının parçalanmasıyla başlar, ardından enzimatik işlemler kullanılarak hücresel bileşenlerin ECM'den ayrılması sağlanır, deterjanlar kullanılarak sitoplazmik ve nükleer hücresel bileşenlerin çözünmesi ve son olarak dokudan hücresel kalıntıların çıkarılması ile sonlanır (Badylak vd. 2004). Bu adımlar, hücresizleştirmenin etkinliğini artırmak için mekanik çalkalama ile desteklenebilir. Hücresizleştirmenin ardından, kimyasala olumsuz bir konakçı doku tepkisinden kaçınmak için tüm kalıntı kimyasallar çıkarılmalıdır (Badylak vd. 2004).

2.2.1.1 Fiziksel yöntemler

Dokuların hücresizleştirilmesini kolaylaştırabilecek fiziksel yöntemler arasında, donma ve çözülme, doğrudan basınç, sonikasyon ve çalkalama yer almaktadır. Donma ve çözülme, hücre parçalanmasına neden olan hücre içi buz kristallerinin

oluşumuyla hücre zarını bozar. Buz kristallerinin ECM'ye zarar vermesini önlemek için sıcaklık değişimi kontrol edilmelidir. Donma ve çözülme, tendon bağ dokusunun (Jackson vd. 1987, Roberts vd. 1991), sinir dokusunun (Gulati 1988) hücreleştirilmesinde sıklıkla kullanılmıştır.

Dokuya doğrudan basınç uygulanarak, akciğer ve karaciğer gibi yoğun bir şekilde organize edilmiş ECM'lerle karakterize edilemeyen doku veya organlardaki hücrelerin parçalanması sağlanabilir (Badylak vd. 2004). İnce bağırsak ve idrar kesesi gibi doğal diseksiyon düzlemleri ile karakterize edilen organlardan doku katmanlarını ayırmak için uygulanan mekanik kuvvet etkili bir yöntemdir. Bu yöntemle dokudaki ECM'nin üç boyutlu yapısında minimum bozulma meydana gelir.

Çalkalama ve sonikasyon hücre parçalanmasına ve hücre kalıntılarının çıkarılmasına yardımcı olmak için, genellikle kimyasal işlemle aynı anda kullanılır. Çalkalama işlemi, uygun damar sistemine sahip olmayan ince dokuların hücreleştirilmesi için kullanılan en yaygın yöntemdir ve bu yöntem, orbital çalkalayıcı, manyetik karıştırma plakası veya düşük profilli bir silindir kullanılarak uygulanabilir.

Sonikasyonun optimal büyüklüğünü ya da sıklığını belirlemek için hiçbir çalışma yapılmamış olsa da standart bir ultrasonik temizleyicinin hücre materyali çıkarmada dokuyu bir orbital çalkalayıcıya yerleştirmek kadar etkili olduğu görülmektedir (Badylak vd. 2004). Uygulanan bu yöntemlerde, reaktif hacmi, optimum hız ve mekanik çalkalamanın uzunluğu, dokunun bileşimine, hacmine ve yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir.

2.2.1.2 Kimyasal yöntemler

Hücrelerin sitoplazmik bileşenini çözmek ve RNA ve DNA gibi nükleik asitleri uzaklaştırmak için alkalın ve asitler uygulanır. Perasetik asit, sülfürik asit, hidroklorik asit, asetik asit ve amonyum hidroksit, hücrenin zarını ve hücre içi organelleri etkili bir şekilde bozabilir (Badylak vd. 2004, Yoo vd. 1998). Ayrıca bu

kimyasallar glikozaminoglikan (GAG) gibi moleküllerin kollajen dokulardan ayrılmasını sağlar.

İyonik olmayan deterjanlar, dokunun yapısı üzerindeki zayıf etkileri nedeniyle hücresizleştirme protokollerinde sıklıkla kullanılan kimyasal yöntemlerdendir. Bu deterjanlar, lipid-lipid ve lipid-protein etkileşimlerini bozarken, protein-protein etkileşimlerinde bir etki göstermez (Seddon vd. 2004).

Hücresizleştirme protokollerinde en çok kullanılan iyonik olmayan deterjan Triton X-100'dür. Yapılan bir çalışmada kalp kapakçığını hücresizleştirmek için Triton X-100 kullanılmış ve 24 saat sonra kapakçığın yapısının korunduğu, nükleer materyalin tamamen ortadan kaldırıldığı gözlenmiştir (Grauss vd. 2005). Ayrıca Triton X-100'ün GAG içeriğinin neredeyse tamamının zarar görmesine ve laminin ve fibronektin içeriğinde azalmasına neden olmuştur. Triton X-100 etkili bir hücresizleştirme yöntemi olabilse de etkinliği hücresizleştirilecek dokuya ve belirli bir hücresizleştirme protokolünde birleştirildiği diğer yöntemlere bağlıdır.

İyonik deterjanlar, hem sitoplazmik hem de nükleer hücresel zarları çözmede oldukça etkilidir fakat protein-protein etkileşimlerini bozarak proteinlerin denatüre olmasına yol açabilmektedir (Seddon vd. 2004).

En yaygın kullanılan iyonik deterjanlar, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum deoksilat ve Triton X-200'dür (Woods vd. 2005). SDS, hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasında oldukça etkili bir deterjandır. SDS, doğal doku yapısını bozma eğilimi, GAG konsantrasyonunun azalması ve kollajen bütünlüğüne zarar vermesi gibi dezavantajlara sahiptir.

Zwitter iyonik deterjanlar, hem iyonik olmayan hem de iyonik deterjanların özelliklerini taşıyan kimyasal hücresizleştirme yöntemlerindendir. Bu deterjanların, iyonik olmayan deterjanlara kıyasla proteinleri denatüre etme eğilimleri daha fazladır. Yaygın olarak kullanılan zwitter iyonik deterjanlar arasında, kan damarlarının hücresizleştirilmesinde kullanılan (Dahl vd. 2003) 3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonyo]-1 propan sülfonat (CHAPS), sinirlerin

hücreleştirilmesinde kullanılan (Hudson vd. 2004) sülfobetain-10 (SB-10) yer almaktadır.

Hipotonik ve hipertonic çözeltiler (deiyonize su veya düşük iyonik güçlü çözeltiler gibi) ile osmotik şok, doku ve organlardaki hücrelerin parçalanmasında kullanılan bir diğer kimyasal yöntemdir (Woods vd. 2005). Kimyasal işleme birleştirilen bu yöntem, ECM bileşiminde minimum bir değişikliğe neden olur. Ek olarak, enzimatik veya kimyasal işlemler, hücre kalıntıların çıkarılmasını kolaylaştırmak için tipik olarak gereklidir.

2.2.1.3 Enzimatik yöntemler

Kalsiyum şelatlayıcı ajanlar, proteaz sindirimi ve nükleazlar enzimatik hücreleştirme yöntemleri arasında yer almaktadır. Tripsin, arginin ve lizinin karboksil ucundaki peptit bağlarının parçalanmasını sağlayan, hücreleştirme protokollerinde en çok kullanılan proteolitik enzimlerden biridir (Gamba vd. 2002). Endonükleazlar gibi nükleazlar, ribonükleotid veya deoksiribonükleotid zincirlerinin iç bağlarının hidrolizini katalize ederken, eksonükleazlar, deoksiribonükleotid veya ribonükleotidin termal bağlarının hidrolizini katalize ederek RNA veya DNA'nın bozulmasını sağlar (Freyman 2005).

Çeşitli doku türlerinde hücre materyalin ECM'den çıkarılması için enzimatik yöntemlerin etkinliği incelenmiştir. Bazı çalışmalarda ajitasyon ile 24 saat boyunca %0.05 tripsin / EDTA uygulamasından sonra hücre materyalin domuz pulmoner kapaklarından etkili bir şekilde uzaklaştırıldığı görülürken (Schenke-Layland vd. 2003), diğer çalışmalar daha az verimli hücreleştirme göstermektedir. Örneğin, ultra saf su içinde %0,5 tripsin, %0,05 EDTA, %0,02 Gentamisin, 0,02 mg/ml DNaz ve 20 mg/ml RNase-A ile 17 saate kadar 37°C'de ajitasyonla işleme tabi tutulan domuz aort kapakçıkları hücrelerini cansız hale getirilirken, hücre materyalin dokudan uzaklaştırılamadığı gözlenmiştir (Grauss vd. 2005).

Enzimatik hücreleştirme yöntemleri, doku ve organların ECM'si üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmamaktadır. Tripsin/EDTA kullanımı genellikle

dokudaki kollajen miktarını etkilememektedir. Tripsin/EDTA'nın uzun süre maruziyeti zamanla elastin içeriğini ve GAG'ları büyük ölçüde azaltırken en çok kondroitin sülfatlar, keratin sülfatlar ve dermatan sülfatları etkilemektedir (Badylak vd. 2004).

Bu tür enzimatik hücresizleştirme protokolleri sonucunda geriye kalan ECM'nin endotelial hücre büyümesini *in vitro* olarak desteklediği görülmektedir (Schenke-Layland vd. 2003). ECM'nin altyapısı ve bileşimi üzerindeki yıkıcı etkileri en aza indirmek için uygulanan yöntemlerin maruz kalma sürelerinin sınırlandırılması arzu edilmektedir.

2.3 Hücre Dışı Matris (ECM)

Hücre dışı matris (ECM), her dokuyu oluşturan hücreler tarafından sentezlenen, farklı bileşime ve fiziksel özelliklere sahip yapısal proteinler, lipitler, proteoglikanlar ve diğer biyomoleküllerden oluşan karmaşık bir yapıdır (Badylak vd. 2011). Bir dokunun hücre ve ECM'si, davranışlarını değiştirmek için ECM'deki sinyallere yanıt veren hücrelerle dinamik karşılıklılık durumunda bulunur ve hücreler, ECM'nin organizasyonunu ve bileşimini değiştirir (Nelson vd. 2006).

Her dokudaki ECM'nin mimarisi ve bileşimi benzersizdir, dolayısıyla o dokunun işlevselliğini tanımlar. Bununla birlikte, her spesifik ECM proteininin yapısı ve bileşimi, türler arasında büyük ölçüde korunur, ECM'yi büyük ölçüde bağışıklık reddi olmadan türler içinde ve arasında tanınabilir hale getirir (Gilbert 2012). ECM iskeleleri, ECM'ye zarar vermeden bağışıklık reddini tetikleyecek hücrel antijenleri çıkarmak için uygun şekilde işlendiğinde, yaralanmadan sonra dokunun yeniden modellenmesini teşvik etmek için güçlü bir kaynaktır. "Yapıcı yeniden modelleme", ECM iskelelerinin, skar dokusunun aksine implantasyon bölgesinde bölgeye uygun doku oluşumunu teşvik ettiği anlamına gelir (Badylak 2007).

ECM sadece destekleyici bir malzeme olarak değil, aynı zamanda hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını, morfogenez ve farklılaşma gibi hücrel fonksiyonların düzenlenmesi görevini de görmektedir (Adachi vd. 1997).

ECM'den oluşan biyolojik iskele malzemeleri, hem preklinik hayvan çalışmalarında hem de insan klinik uygulamalarında çeşitli dokuların yapıcı yeniden şekillenmesini kolaylaştırmak için yaygın olarak kullanılan malzemelerdir. Bu iskele malzemelerini oluşturmak için kullanılan ECM, deri (Chen vd. 2004), ince bağırsak submukozası (Badylak vd. 1989), idrar kesesi (Gilbert vd. 2005), kan damarları (Conklin vd. 2002) ve kalp kapakçıkları (Bader vd. 2005) dahil olmak üzere birçok farklı dokudan toplanabilir.

2.3.1 Hücresizleştirilmiş hücre dışı matris (dECM) iskeleleri

Doku iskeleleri, doku mühendisliğinin son yıllarda hızla gelişmesiyle birlikte, biyouyumluluk, biyoaktivite ve destekleyici hücreler için iyi olarak tanımlanabilecek düzeyde mekanik özellikleri nedeniyle büyük ilgi kaynağı olmaktadır.

Tasarlanan doku iskeleleri arasında, hücresizleştirme yöntemleri kullanarak insan veya hayvan doku ve organlarından elde edilen biyomalzemeleri ifade eden, hücresizleştirilmiş hücre dışı matris (dECM) doku iskeleleri ile, hasarlı doku ve organlarda yeniden modellenmesi, yenilenmesi veya desteklenmesi amacıyla rejeneratif stratejiler geliştirilmektedir (Zhang vd. 2022).

Temel olarak, kollajen (Chen vd. 2016), elastin (Ramaswamy vd. 2019), fibronektin (Catoira vd. 2019), laminin (Song vd. 2011) gibi hücre dışı makromoleküller içeren üç boyutlu ECM'den oluşan dECM doku iskeleleri, ilk olarak aşıl tendon onarımı için ince bağırsak submukoza matrislerinden elde edilmiştir (Badylak vd. 1995). 2008 yılında yapılan bir çalışmada biyo-yapay kalp tasarlamak ilk kez hücresizleştirilmiş kalp matrisi (Ott vd. 2008), ardından 2010 yılında akciğer rejenerasyonu ve transplantasyonu amacıyla hücresizleştirilmiş akciğer matrisi (Ott vd. 2010), yeniden hücrelendirerek nakledilebilir karaciğer greftlerinin geliştirilmesi amacıyla hücresizleştirilmiş karaciğer matrisi (Uygun vd. 2010), 2013 yılında böbreğin rejenerasyonu ve ortotopik transplantasyonu amacıyla hücresizleştirilmiş böbrek matrisi (Song vd. 2013) kullanılmıştır. 2014 yılından itibaren dECM hidrojel, 2017 yılında ise kök hücre içeren dECM biyomürekkepleri ile, üç boyutlu (3B) biyobaskı teknolojisi kullanılarak doku iskeleleri tasarlanmıştır (Pati

vd. 2014). 2021 yılında yapılan son çalışmalarda ise, dECM materyallerini analiz etme amacıyla proteomik yöntemler geliştirilmiştir (Asthana vd. 2021).

Bu gelişmelerden sonra, hücreleştirilmiş doku ve organlardan türetilen çeşitli üç boyutlu doku iskeleleri, dermal doku onarımı, kalp kapakçığı değişimi ve vasküler doku rejenerasyonu gibi birçok doku mühendisliği çalışmalarında uygulanmıştır (Hinderer vd. 2016, Chen vd. 2016).

2.4 Üç Boyutlu (3B) Doku İskelesi ve Üretim Yöntemleri

Doku mühendisliği stratejileri ile üretilen doku iskeleleri, hücreler için gözenekli yapıyı sağlayan en önemli unsurlardan bir tanesidir. Bu gözeneklilik, doku içerisindeki besin ve oksijen akışına, hücre göçüne olanak sağlar.

İdeal bir 3B doku iskelesi, istenilen dokuya göre uygun mekanik özellikler, biyoyumluluk, biyolojik olarak kontrollü parçalanma ve toksik olmama gibi özelliklere sahip olmalıdır (Turnbull vd 2018). Doku iskelesinin yüzeyi ayrıca, hücrenin çoğalmasına ve farklılaşmasına yardımcı olacak şekilde optimize edilmelidir (Loh vd. 2013).

Doku iskeleleri ve parçalanma ürünlerinin biyoyumlu olması, iskelede kullanılacak malzemenin hücreler için toksik olmamasını, vücuttan kolayca atılmasını ve varlığının ihmal edilebilir bir bağışıklık tepkisi yaratması açısından oldukça önemlidir (Lloyd vd. 2001). Kontrollü biyobozunurluk ise doku iskelesinin en temel özelliğidir. Üretilen bir iskele çok hızlı bozunuyorsa, mekanik olarak hasara neden olabilirken, yeterince hızlı bozunmaması durumunda da iskelenin yabancı maddesine karşı bir inflamatuvar yanıt oluşabilir ve bu da dokunun rejenerasyonunu olumsuz yönde etkiler (Amaral vd. 2002).

Doku iskelelerinin gözenek boyutu ve yoğunluğu ise, hücresel büyüme ve bağlanma üzerinde oldukça etkilidir. Gözenek boyutu küçüldükçe iskelenin yüzey alanı artar ve bu durum hücrelerin etkileşimi için iskele ligandlarının mevcudiyetini artırır (Barrere vd. 2008). Gözeneklerin yapısı, oksijen ve besinlerin içe doğru difüzyonu, atık

ürünlerin iskeleden dışarıya doğru difüzyonuna izin verirken, iskeleye hücre göçünü destekler ve çevre dokularla etkileşimi için mevcut yüzey alanını geliştirir (O'Brien vd. 2005).

3B doku iskeleleri, katmanlı üretim adı altında çok çeşitli teknikler ve bazen de bu tekniklerin kombinasyonu kullanılarak tasarlanır, fakat karmaşık doku iskelesinin mikro mimarisini oluşturmak oldukça zordur. Katmanlı üretimin süreçleri, bilgileri daha sonra sterelitografi (STL) dosyasına dönüştürülen bilgisayar destekli tasarım (CAD) dosyasında yer alır.

2.4.1 Çözücü dökme/partikül süzme yöntemi

Solvent döküm/partikül süzme yöntemi, polimerin organik bir çözücü içinde çözünmesine dayanan geleneksel bir iskele üretim yöntemidir. Bu yöntemde, kalıplanmış bir yapıya dağılabilen ve ardından yapı sertleştikten sonra çözünerek gözeneklerin oluşmasını sağlayan bir porojen maddeler kullanılır. Polimer çözeltisine porojenler eklenir ve böylelikle polimer porojen ağı elde edilir. Çözücü buharlaştıkça polimer sertleştirilir ve porojeni çözmek için su kullanılır.

Bu yöntem düzenli gözenekliliğe, kontrollü bileşime ve gözenek boyutuna sahip basit bir teknik olsa da gözenek şeklini kontrol etmek zordur. Başka bir dezavantajı ise, organik çözücülerin kullanımının hücre ve biyomoleküllerin doğrudan doku iskelesine dahil edilmesini engellemesidir (Jhonson vd. 2010).

2.4.2 Gaz köpürtme yöntemi

Gaz köpürtme yöntemi, çözücü dökme/partikül süzme yönteminde kullanılan organik çözücülerin kullanımını ortadan kaldırır. Bu yöntemde, polimer boyunca dağılmış gaz kabarcıklarının çekirdeklenmesi ve büyümesi ile gözenekli bir yapı elde edilir. Sıkıştırarak kalıplama ile ilk olarak ısıtılmış kalıp içinde bir polimer malzemenin katı diskleri oluşturulur. Diskler, 72 saat boyunca CO₂ gazına maruz bırakılarak karbondioksit doyurulduktan sonra, CO₂ basıncı atmosferik seviyeye getirilir ve

böylece gazın polimer içerisindeki çözünürlüğünün hızla düşürülmesi sağlanır ve böylelikle CO₂ gazı bir arada toplanarak gözeneklilik (%93'e kadar) oluşur.

Bu yöntemle, hücrelerin ve biyoaktif moleküllerin doğrudan doku iskelelerine dahil edilmesi engellenir ve gözenek bağlantısı ve boyutunun kontrol edilmesi zordur (Dehghani vd. 2011).

2.4.3 Emülsifikasyon/ dondurarak kurutma yöntemi

Dondurarak kurutma, polimer çözeltisinin dondurulması ve polimer agregatları ile çevrilenmiş çözücü buz kristallerinin oluşmasına dayanır. Burada uygulanan basınç, bir vakum yardımıyla donmuş çözücünün denge buhar basıncından daha düşük seviyeye getirilir. Böylelikle çözücünün doğrudan katı fazdan gaz fazına süblimleşmesi sağlanır.

Emülsifikasyon dondurarak kurutma işleminde, emülsiyon elde etme amacıyla polimerlerin bir çözücü içerisinde çözülmesi ve su ile karıştırılmasıyla başlar. Elde edilen karışım bir kalıba dökülür ve faz ayrımı olmadan önce dondurulur. Dondurulmuş emülsiyon daha sonra çözücü ve dağılan suyu uzaklaştırmak için dondurularak kurutulur ve katı, gözenekli bir iskele elde edilir (Whang vd. 1995). Bu yöntemle gözenek boyutlarını kontrol etmek ve birbirine bağlılığı sağlamak zor olmakla birlikte, gözenek boyutu küçük ve düzensizdir.

2.4.4 Faz ayrımı yöntemi

Faz ayrımı, homojen polimer-çözücü içeren çözeltinin karışmasını önlemek için termal enerji değişimlerine dayanan bir yöntemdir. Poli-L-laktik asit gibi polimer, çözücü içerisinde çözündüğünde, düşük sıcaklıkta termodinamik olarak kararsız hale gelip, polimer ve çözücü açısından zengin bir faza ayrılabilir.

Başka bir deyişle, polimer, yüksek kaynama noktalı ve düşük moleküler ağırlıklı bir çözücü içinde yüksek sıcaklıkta, polimerin erime noktasında çözülmesiyle başlar ve böylece homojen eriyik bir karışım oluşur. Bu aşamadan sonra çözelti istenilen

iskelenin şekline dökülür ve kontrollü soğutularak faz ayrımı ile nanolifli bir matris elde edilir. Çözücü ortamdan uzaklaştırıldığında, polimer matrisinde gözenekler bıraktığı için gözenekli bir iskele oluşur.

2.4.5 Elektro eğirme yöntemi

Elektro eğirme yöntemi, doğal ve sentetik polimer çözeltilerinin 2 nanometre ile birkaç mikrometre çaplarına sahip polimer lifler üretmek için elektriksel güce dayalı elektrostatik lif oluşumu için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. (Ahn vd. 2006). Bu yöntemde, yüklü polimer çözelti ipliklerini veya polimer eriyiklerini kılcal bir borudan, toplayıcı plakaya doğru ince jetler halinde çekmek için harici olarak uygulanan elektriksel alan kullanılır.

2.4.6 Üç boyutlu (3B) baskı teknolojisi

Doku iskele üretim yöntemleri, genellikle gözenek boyutu ve geometri üzerinde sınırlı kontrol edilebilirlik sağlamaktadır. Üç boyutlu baskı teknolojisinin ortaya çıkmasıyla üretilecek iskelenin mikro mimarisi ve uzamsal içeriğinde kontrol edebilme avantajı elde edilmiştir. 3B baskı, nesnelerin toz, sıvı veya katı malzeme alt tabakalarının katman katman işlenmesi ile iskeleyi üretir (Turnbull vd. 2018). Bu teknoloji ile iskelenin alt katmanından başlayıp inşa ederek, yeni oluşturulan her katmanın bir önceki katmana yapışması sağlanır ve bu kademeli olarak artan boyutta bir yapının elde edilmesi ile sonuçlanır.

Doku iskelesinde biyobaskı süreci, yapıya dahil edilecek hücre ve biyomalzemelerin belirlenmesi ile başlar. Belirlenen hücreler ve biyomalzemeler, bir iletim ortamı veya biyomürekkep içerisinde kapsülленir ve biyomürekkep önceden belirlenmiş 3B geometride dağıtan bir 3B yazıcıya yüklenir. Genellikle biyoyazıcıların birden fazla yazdırma başlığı bulunur ve bu sayede hücre-biyomalzeme kombinasyonlarının basılı bir yapıda elde edilmesini sağlar. Bu sebeple, üretilen doku iskelesinin mimarisi ve içeriği yüksek ölçüde uzamsal kontrol edilebilmektedir. Baskının sonucunda iskele doğrudan implante edilebilir veya *in vitro* çalışmalarla

olgunlaştırılabilir (Li vd. 2016). Mürekkep püskürtmeli, lazer destekli, mikrovalf ve ekstrüzyon, yaygın olarak kullanılan biyobaskı türleridir.

2.4.6.1 Mürekkep püskürtmeli biyobaskı yöntemi

Mürekkep püskürtmeli baskı, iki boyutlu masaüstü püskürtmeli yazıcılardan türetilen yaygın bir temassız baskı yöntemidir. Baskı, bilgisayar kontrolü altında bir substrat üzerinde pikolitre hacminde biyomürekkep damlacıklarının oluşturulmasına ve konumlandırılmasına dayanır (Saunders vd. 2014). Biyomürekkep damlacıkların akması için termal veya akustik kuvvetler kullanılır. Termal uygulamada, baskı kafasında basınç oluşturmak için ısı kullanılır ve damlacıkların akması sağlanırken, voltaj uygulanması sonucunda ise yeterli basıncı sağlayan akustik dalgalar oluşur ve damlacıkların akması sağlanır. Bu yöntem, düşük maliyet, geniş kullanılabilirlik ve yüksek baskı hızı gibi avantajlar sağlarken, enjektör ucunun tıkanması, hücre ve/veya malzemenin termal ve mekanik strese maruz kalma riski gibi dezavantajlar içermektedir (Cui vd. 2012).

2.4.6.2 Lazer destekli biyobaskı yöntemi

Lazer destekli baskı yöntemi, enjektör yerine, hücre içeren malzemeleri, ilk baskı malzemesi şeridinden bir toplayıcı alt tabakaya doğru iten yüksek basınçlı bir balon oluşturmak için darbeli lazer ışını kullanımına dayanır. Hücreleri substrat üzerine yönlendirmek için ışık tuzağı kullanarak lazer ışınının odaklanmasını sağlayan bu yöntem, hücreler üzerinde ısı kaynaklı hasar, yüksek hücre ve biyomalzeme konsantrasyonu ile uzun zaman alıcı şeritler oluşturma gibi dezavantajlar içermektedir (Koch vd. 2013).

2.4.6.3 Mikrovalf baskı yöntemi

Mikrovalf baskı, sabit pnömatik bir basınç altındaki küçük damlacıkların, bir valf açılıp kapatılarak kartuş uçlarından dağıtıldığı damlacık tabanlı bir baskı yöntemidir (Agarwala 2016). Kontrollü bir basınç sistemi, biyomürekkebi enjektör geçmeye

zorlarken, valf, mekanik, elektriksel ve manyetik etki altında açılıp kapanabilir. Mikrovalf baskı yöntemi, yüksek baskı hızı ve yüksek hücre yoğunluğuna sahiptir.

2.4.6.4 Ekstrüzyon baskı yöntemi

Ekstrüzyon baskı, malzeme filamentlerini biriktirmeye dayanan yöntemdir. Bu yöntemin diğer baskı yöntemlerinden farkı damlacık oluşumu içermemesine dayanır. Enjektörden biyomürekkep ekstrüzyonunu sağlamak için, şırıngaya pnömatik veya mekanik basınç uygulanır. Bu yöntem çok yüksek hücre yoğunluğu biriktirme yeteneğinden dolayı önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ekstrüzyon baskı yöntemi, doku sferoidleri, hücre peletleri, hücreleştirilmiş matris bileşenleri ve hücre içeren hidrojel gibi farklı biyomürekkeplerin başarılı bir şekilde baskısı sağlanmıştır. Bu yöntemin sınırlama ve zorlukları arasında, yüksek baskı çözünürlüğünü elde etme, baskı ucunun hücreler üzerindeki kesme gerilim etkisi ve yazdırılabilir biyomürekkeplerin geliştirilmesi yer almaktadır (Özbolat vd. 2016).

2.4.6.5 Stereolitografi (STL)

Stereolitografi, bilinen en eski 3B baskı yöntemlerinden biridir. Bu yöntemde sıvı, ultraviyole (UV) ile kürlenebilen fotopolimer reçineyi katman katman polarize etmek için, lazerin kullanımına dayanır ve sonucunda üç boyutlu bir model elde edilir. UV lazer ile modelin enine kesiti kalınlaştırılır ve her enine kesitten sonra baskı platformu, sertleşme için, katı polimeri bir başka reçine tabakası ile kaplayarak aşağı hareket eder. Stereolitografi baskı yöntemi, mikrometre çözünürlük ve kontrollü mimari ile doku iskelelerinin hızlı bir şekilde üretilmesini sağlarken, bir yandan da oldukça maliyetli ve kullanımı sınırlı malzemeler içerir (Kim vd. 2010).

2.4.6.6 Seçici lazer sinterleme (SLS)

Seçici lazer sinterleme, toz malzemeyi sinterleyerek bir tozun katman katman kaynaştırılması için bilgisayar kontrollü lazer ışını ile 3B yapıyı oluşturan baskı yöntemidir (Williams vd. 2005). Bu yöntem, trabeküler kemiğe benzer mekanik özellikte biyoaktif ve kompozit iskelelerin üretilmesi ile başarılı olsa da, yüksek

sıcaklık faktörü, hücre ve biyomalzemelerin bu yöntemde doku iskelesi oluşturmasını engeller (Xia vd. 2013).

2.4.6.7 Eriyik yığma modelleme (FDM)

Eriyik yığma modelleme, termoplastik bir malzemenin, sıcaklık kontrollü bir yazıcı başlığı yardımıyla, platforma katman katman yerleştirilmesi ile 3B yapıyı oluşturan yöntemdir. Termoplastik filament, ısıtılmış yazıcı başlığa gönderilir ve bu da filamentin erimesine neden olarak polikaprolakton (PCL) gibi yarı eriyik bir polimerin ince katmanlarının sıra sıra hassas bir şekilde yığılmasını sağlar. Eriyen filament, baskı ortamının havasında soğur ve filamentin doku iskelesi oluşturmak için hızlı bir şekilde kaynaşmasını sağlar (Zein vd. 2002). Bu yöntem sentetik doku iskelesi üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmıştır, ancak bu yöntem de SLS gibi yüksek sıcaklık içerdiğinden biyomoleküller ve hidrojenlerin kullanımını engeller.

3B baskı teknolojisindeki tüm bu katmanlı üretim yöntemleri, kısmen hastaya özel tasarımından dolayı, biyomalzemeler, doku mühendisliği ve biyofabrikasyondaki uygulamalar için günümüzde giderek daha fazla kullanılmaktadır ve her fabrikasyon teknolojisi, ideal bir baskı çözünürlük aralığına sahiptir (Henkel vd. 2013, Dalton vd. 2021). Birçok baskı tekniğinde bu çözünürlük 50-500 µm aralığındadır.

Biyomedikal uygulamalarda, doku mikro mimarisini çoğaltmak amacıyla, düşük mikrometre veya nanometre ölçeğinde daha da küçük yapısal özelliklerin basılabilmesi gerekmektedir. Bu özellikteki küçük lifli çaplar, çözelti elektroğirme, eriyik elektroğirme ve eriyik elektroyazım (MEW) gibi elektro-hidrodinamik tekniklerle elde edilebilir (Brown vd. 2014).

2.5 Elektro-Hidrodinamik Baskı Teknikleri

2.5.1 Çözelti elektro eğirme

Çözelti elektro eğirme cihazı, ince bir enjektöre bağlı şırınga, bacinç uygulayan şırınga pompası, yüksek voltaj sağlayıcısı ve toplayıcıdan oluşur. Enjektörden

toplayıcıya uygulanan elektrik alanı kullanılırken sürekli bir polimer çözelti jeti oluşturulur. Çözücü ise biriktirme sırasında veya sonrasında kendi kendine buharlaştırma yoluyla uzaklaştırılır. Polimer jet, iyonların elektrostatik itmeleri ile yüzey gerilimi arasındaki dengeden dolayı daralır ve konik şeklindeki jet kollektöre doğru fırlatılır. Uygulanan voltajın artmasıyla enjektör ucundaki filament ‘Taylor konisi’ adı verilen konik şekilli bir jet akımına dönüşür (Dalton vd. 2017). Jet, kollektöre yaklaştıkça yoğunlaşan yüzey yükleri, “kırbaçlama” olarak adlandırılan ikincil bir elektriksel kararsızlıkların meydana geldiği bir seviyeye ulaşır. Elektrik kararsızlığının fazlası, polimer jetinin nano ölçekli boyutlara gerilmesini sağlar (Han vd. 2007).

2.5.2 Eriyik elektro eğirme

Eriyik elektroegirme tekniğinde polimer jet, enjektör ucunda elektrostatik çekme, yüzey gerilimi ve viskoelastik kuvvetlere maruz kalır. Polimer, çok daha yüksek viskozite ve düşük iletkenlik ile erir ve biriktirme sırasında daha kararlı püskürtmeye yol açar. Böylelikle kontrollü bir şekilde filament eldesi kolaylaşır. Eriyik elektroegirme tekniği ile elde edilen filament, çözelti elektroegirme tekniği ile kıyasladığında daha büyük gözeneklilik, lif çapları ve yüksek yüzey kalitesine sahiptir. Ayrıca bu teknikte, herhangi bir çözücü içerisinde çözünmeyen polimerler işlenebildiği için, çözelti elektroegirme tekniğindeki gibi çözücünün uzaklaştırılması gerekmez ve bu da tekniğin maliyetini düşürür (Lian vd. 2017).

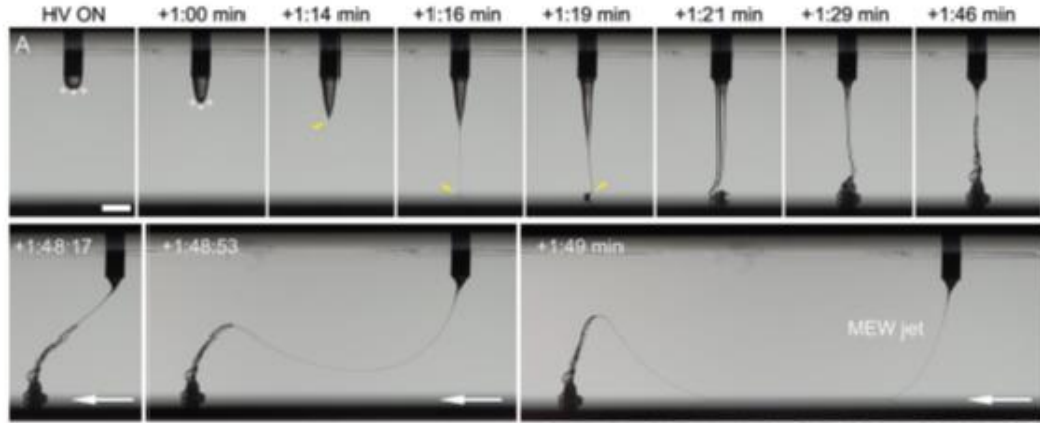
2.5.3 Eriyik elektro yazım (MEW)

Eriyik elektro yazım (MEW), farklı parametreler ve doğrudan yazmayı kolaylaştıran hareketli bir toplayıcı haricinde, eriyik elektroegirme benzeri bir konfigürasyona dayalı, mikro ve nanometre aralığında lifler üretebilen, yüksek çözünürlüklü bir katmanlı üretim yöntemidir (Henkel vd. 2013).

Tipik bir eriyik elektroyazım cihazı, metal bir enjektöre gönderilen şırınga içindeki malzemeyi eritmek için, bir ısıtma sistemi bulunduran baskı başlığından oluşur. Baskı başlığı, bir kollektör üzerine doğrudan yazımın sağlanması için bilgisayar

destekli bir çeviri sistemi ile donatılmıştır (Dalton vd. 2021). Dağıtım sistemi olan hava basıncı, polimerin ekstrüzyonunu enjektör boyunca erimeye zorlar ve enjektör ile toplayıcı arasında uygulanan potansiyel fark bir elektrik alan oluşturur. Bu sistem, eriyik elektroegirme yöntemine benzese de özellikle “kollektör mesafesi” ve gerekli elektrik alanına göre önemli farklılıklara sahiptir (Dalton 2017). MEW baskı tekniğinde kullanılan polimer eriyikleri diğer tekniklerdeki polimerlere göre daha viskozdur ve ayrıca çözücü temelli tekniklere göre daha az yüklenebilen daha az moleküler türe sahiptir.

MEW’de polimer jetin başlatılması, enjektöre giden kütle akış hızına, uygulanan gerilime ve kolektör mesafesine bağlıdır. Jet başlangıcı, akış hızına veya eriyik polimerin viskozitesine bağlı olarak bir veya birkaç dakika sürebilir. Erimiş polimer jet voltaj ile dengelendiği için elektroegirmede görülen elektriksel kararsızlık burada gerçekleşmez.



Şekil 2.1 MEW tekniği ile PCL polimerinin jet başlangıcı (Dalton vd. 2021)

Şekil 2.1’de, Paul Dalton (2021), eriyik elektroyazım tekniği ile, poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) polimerinin jet başlangıcını şu şekilde açıklar; PCL eriyik damlasına yüksek voltaj ile elektrik alanı uygulandığında, yükler toplayıcıya en yakın sıvının yüzeyinde birikir. Eriyik damlanın hacmi 1 dakika veya daha uzun bir süre içerisinde artıçça deforme olur ve daha sonra kolektör üzerindeki (+1:16 dakikada, sarı ok ile gösterilen) sıvı kolonuna ve jete neden olur. Taylor konisindeki fazla hacmin toplayıcıya çekilmesi için yaklaşık 30 saniye daha gerekir ve bu sürenin sonunda (+1:48 dakikada), eriyik elektroyazım jeti doğrudan yazmaya hazır hale gelir.

Elektroaktif polimerler (Dalton vd. 2019), suda çözünebilen polimerler (Groll vd. 2014), hidrojeller (Luxenhofer vd. 2020), PCL gibi polyesterler (Castilho vd. 2017), eriyik elektroyazım tekniği ile işlenebilir.

MEW için “altın standart” olarak değerlendirilen ve bu nedenle en çok kullanılan polimer PCL’dir. PCL, düşük erime sıcaklığı (60-90°C) ve hızlı katılaşabilme özelliğinden dolayı eriyik elektroyazım ile kolayca işlenebilen, yarı kristalli ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polyesterdir. PCL ayrıca, farklı moleküler ağırlıklara sahip olması ve farklı hücre tipleri ile etkileşiminden dolayı doku mühendisliği ve biyomedikal alanlarda sıklıkla tercih edilmektedir (Hutmacher vd. 2019).

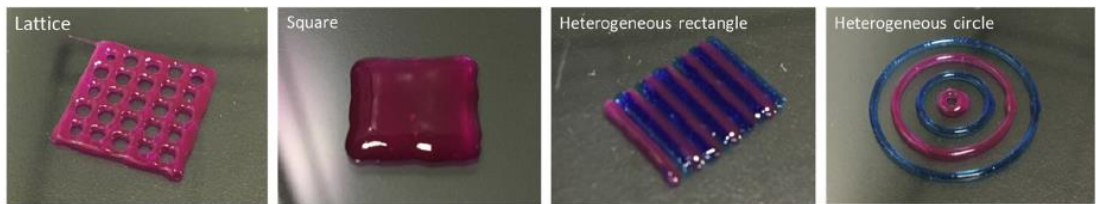


3. KAYNAK ÖZETLERİ

Deri dokusunun hücreleştirilmesi ve karakterizasyonu, deri doku mühendisliği çalışmalarındaki kullanımı ve MEW ile baskılanmış PCL iskelelerinin doku mühendisliği çalışmalarındaki kullanımları aşağıdaki çalışmalarda özet olarak anlatılmıştır.

Kamalvand vd. 2021 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, balık deri dokularını 7 farklı teknik (fiziksel, kimyasal ve enzimatik) tasarlayarak hücrelerinden arındırmışlardır. Hücrelerinden arındırılmış deri dokularının DNA ve GAGs içerikleri değerlendirilmiş ve Hematoksilen & Eozin (H&E), Masson Trikrom boyamaları ile histolojik görüntüleri analiz edilmiştir. Hücre kültür çalışmalarında 72 saatlik toksisite deneyi ile hücrelerin doku iskelesi üzerinde yaşayabilirliği ve çoğalma hızını değerlendirmişlerdir. Bulgular sonucunda, en başarılı hücreleştirme yönteminin hipertonic ve hipotonic yöntemlerle ve Triton X-100 ile gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Ayrıca hücre kültür çalışmaları sonucunda hücrelerin hücreleştirilmiş matris üzerinde etkili bir yapışma gösterdiğinden, doku iskelelerinin cilt doku rejenerasyonu için uygun bir aday olduğunu değerlendirmişlerdir.

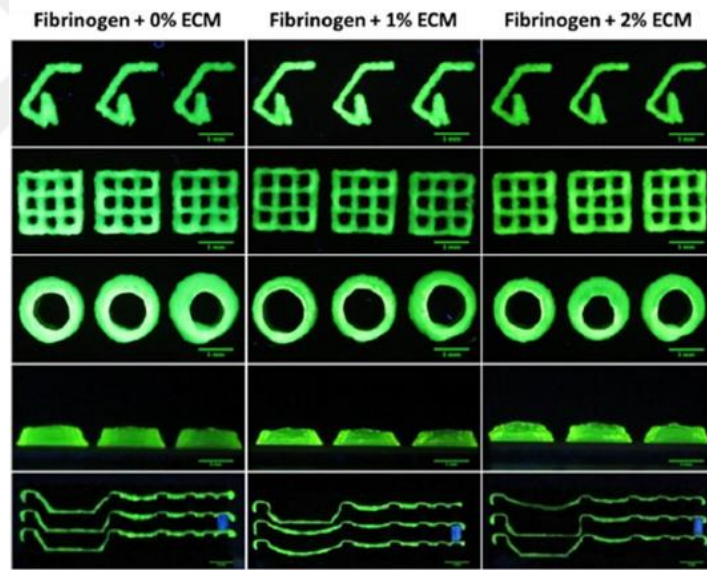
Kim vd. 2018 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, temel ECM bileşenlerinin yanı sıra uygun büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin korunduğu başarılı bir hücreleştirme işlemi ile domuz derisini ilk kez basılabilir bir malzeme olarak formüle etmişlerdir. Hücreleştirilmiş deriden türetilen bu biyomürekkep, liyofilize deri dokunun 100mg doku başına 15mg pepsin içeren 0.5M asetik asit içerisinde çözünmesiyle elde edilmiş ve yara örtü malzemesi amacıyla tam kalınlıkta insan derisi modeli yazdırmak için kullanılmıştır.



Şekil 3.1 dECM bioinkin basılabilirlik testleri (Kim vd. 2018)

Çalışma sonucunda, hücreleştirilmiş ECM kullanarak olgunlaştırılmış 3B hücre baskılı deri yaması ticari 3B hücre baskılı tip-I kollajen ile kıyaslanmış ve minimum büzülme ile stabilize edilmiş ve *in vivo* çalışmaların neovaskülarizasyonu, yeniden epitelizasyonu ve kan akışını hızlandırdığı ve ayrıca yara kapanmasını önemli ölçüde uyardığı değerlendirilmiştir.

Jorgensen vd. 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada, insan derisinin hücreleştirilmesinden elde edilen ECM ile desteklenmiş fibrinojen hidrojelinin, fiziksel ve biyolojik özelliklerini ve oluşan hibrit hidrojel üç boyutlu basılabilirliğini değerlendirmiştir. Deri dokusu %0.25 tripsin ve %1 Triton X-100 çözeltileri kullanılarak hücreleştirilmiştir. Ardından hücreleştirilmiş ECM çözeltisi ile fibrinojen hidrojel farklı konsantrasyonlarda karıştırılarak basılabilirliği denenmiştir.

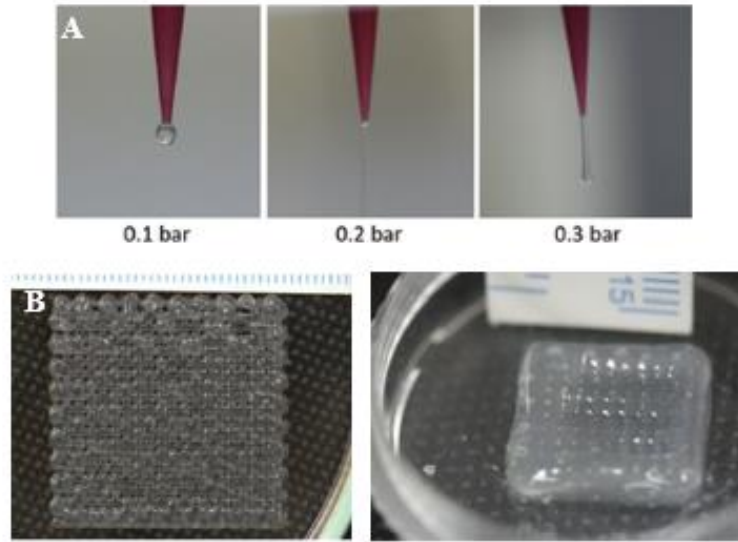


Şekil 3.2 Hidrojel tipine göre üç kopya halinde yapay basılabilirlik testlerinin temsili görüntüleri (Jorgensen vd. 2020)

Çalışmanın sonucunda, hibrit hidrojellerin, 8 mm, 4 mm, 2 mm ve 1 mm boşluk genişliklerinde sadece fibrinojen içeren hidrojellere göre daha az sapma olduğunu ve bu durumda ECM takviyeli hidrojellerde şekil doğruluğunda genel bir gelişme olduğunu göstermişlerdir. Ek olarak hücre kültür çalışmalarının sonucunda, hibrit hidrojellerin fibrinojen hidrojellere kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde

iyileştirildiği gözlenmiş ve biyobaskılı hibrit hidrojelin yeni damar oluşumu ile birlikte cilt yara rejenerasyonunu destekleyebileceği sonucuna varılmıştır.

Pati vd. 2022 yılında yaptıkları çalışmada, keçi deri dokusunu kimyasal ve enzimatik yöntemler dışında, sodyum klorür ile hipotonik/hipertonik çözeltisini kullanarak başarılı bir alternatif hücresizleştirme yöntemi gerçekleştirmişlerdir. Liyofilize edilmiş hücresiz deri ECM'si öğütülmüş ve kullanılan dokunun %10'u kadar pepsin ile 36 saat boyunca 0.5 M asetik asit çözeltisi ile kısmi sindirimi sağlanarak, iyi kesme incelmesi ve kesme geri kazanımı özellikleri sergileyen bir 3B basılabilir hidrojel tasarlamışlardır. Hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojelini, pnömatrik basınca dayalı ekstrüzyon baskı yaklaşımıyla yatak üzerinde biriktirilerek her bir baskı kafası için malzeme akışı, ayrı ayrı basınç ve akış hızı parametreleriyle kontrol edilmiştir.



Şekil 3.3 A) 0.25 mm enjektör ucu ile farklı basınç koşullarında 3B baskı denemeleri, B) Optimize edilmiş yazdırma parametrelerinde ddECM hidrojel ile basılmış yapılar (Pati vd. 2022)

Çalışmaların sonucunda, diğer hücresizleştirme yöntemleri ile kıyaslandığında, uygulanan bu hipotonik/hipertonik sodyum klorür yönteminin DNA konsantrasyonunun etkili bir şekilde azaldığını ve GAG ve kollajen içeriğinin daha iyi korunduğunu doğrulamışlardır. Reoloji analizi değerlendirildiğinde, hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojellerinin yeterli ağ gücüne, viskoelastik davranışa

ve akma gerilimine sahip olduğu gözlenmiştir ki bu da hidrojinin ekstrüzyon tabanlı 3B biyobaskı ile yazdırılabileceğini doğrular. Ek olarak tasarlanan hidrojinin, üstün hücresel tepkilere sahip cilt doku iskeleleri oluşturmak için uygun olduğu ve doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta uygulanabileceği önerilmiştir.

PCL son zamanlarda, özellikle MEW tekniğinin geliştirilmesi ile birlikte farklı doku mühendisliği çalışmalarında en çok tercih edilen polimerlerden biri olarak yer almaktadır.

Hewitt vd, onarılması zor yanık ve tam kat yara oluşumlarında cilt yenilenmesini desteklemek için 2019 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, biyouyumlu ve biyobozunur PCL polimerini, biyoaktif doku iskeleleri oluşturmak için ortaya çıkan MEW yöntemi ile yazdırmışlardır. Bu çalışmada, PCL polimerinin biyolojik işlevselliğini artırmak için, farklı konsantrasyonlarda, biyoaktif süt proteinleri (laktoferrin ve peynir altı suyu proteini) ile PCL birleştirilmiş ve MEW yöntemi ile üç boyutlu baskısı alınarak, doku yenilenme kapasitesi fiziksel ve kimyasal olarak karakterize edilmiş ve biyolojik aktiviteleri *in vitro* çalışmalarla değerlendirilmiştir.

Bulgular sonucunda, süt proteinlerini içeren MEW baskılı PCL doku iskelelerinin, yüksek gözeneklilik, düşük bozunma ve hızlı protein salınımı gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, insan keratinosit ve dermal fibroblast hücreleri kullanılarak *in vitro* deri modeli aracılığıyla belirlenen biyolojik aktivite, süt proteini içeren PCL doku iskelesinin, tek başına PCL'ye kıyasla hücre büyümesini ve yayılmasını önemli ölçüde artırdığını ve bu doku iskelelerinin doku rejenerasyonunda potansiyel bir kullanım sergileyebileceğini göstermişlerdir.

Koç vd 2022 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, MEW ile yazılmış PCL ve PCL-biyoaktif cam parçacıkları ile güçlendirilmiş hidrojel matrisi içeren, hibrit doku iskeleleri tasarlamış ve yara iyileşmesi ve deri doku mühendisliği uygulamaları için kullanımını değerlendirmişlerdir. MEW ile üretilen PCL fiberler, farklı büyüme faktörü taşıyıcı mikroküreler ile yüklenmiş foto çapraz bağlanabilir jelatin hidrojel matrisleri ile doldurularak tasarlanmıştır. Daha sonra bu hibrit iskelelere inorganik biyoaktif cam parçacıklar eklenerek etkisi incelenmiştir.

Çalışmanın sonucunda, hibrit doku iskelelerine, büyüme faktörlerinin ve biyoaktif camın seçici olarak dahil edilmesiyle tedavi edilen yara gruplarına kıyasla, yara kapanma oranının ve ikincil yara iyileşme indekslerinin önemli ölçüde iyileştiği gösterilmiştir. *In vitro* veriler, hibrit doku iskelelerin biyouyumlu olduğunu ve foto çapraz bağlanabilir hidrojel matrisinin, hücre canlılığında önemli bir düşüşe neden olmadığını göstermiştir. Ayrıca, *in vivo* çalışma sırasında yara dokularının histolojik incelemeleri, deneylerin 7. ve 21. günlerinde kontrol grubuna kıyasla aktif biyomoleküllerle tedavi gruplarında granülasyon dokusunda artış, fibroblastik proliferasyon, kollajen artışı ve epitel hücrelerinin rejenerasyonunda bir artış gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmanın bulguları, MEW tekniği ile elde edilen mikron boyutlu polimerik ağ yapılarının, hidrojel matrislerini güçlendirmesiyle oluşan ve aktif biyomoleküllerin dahil edildiği hibrit doku iskelelerinin, gelişmiş yara iyileşmesi için büyük bir kullanım potansiyeli olduğunu göstermiştir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

Sıçan derileri, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)’nden, %0.09 (v/v) NaCl çözeltisinde laboratuvara getirilmiştir (Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı – Sayı No: 66332047). Sıçan deri dokuları hücresizleştirme işleminden önce tıraşlanıp ince kesitler halinde parçalara ayrılmış ve kullanılmadan önce -80°C’ de muhafaza edilmiştir. Sıçan deri dokularının hücresizleştirme işlemi için, Tripsin-EDTA (Merck, Almanya), Triton X-100 (Merck, Almanya), sodyum azid (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

Hücresizleştirilmiş deri dokuların DNA miktarının belirlenmesi için Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, ABD), kollajen miktarının belirlenmesi için Hidroksiprolin Kiti (Shangai Coon Koon Biotech Co, Çin) kullanılmıştır. Absorbans ölçümleri için bir mikro plaka okuyucu (Thermo Scientific, Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, ABD) kullanılmıştır.

Eriyik elektroyazım tekniği için, Axolotl Biosystems-MEW cihazı (Axolotl Biosystems, Türkiye) kullanılmıştır. Üç boyutlu nanofiber doku iskelelerini elde etmek için PCL poli(ϵ -kaprolakton) (e-Sun, Çin) kullanılmıştır.

Hücre kültür çalışmaları 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem ortamı sağlayan inkübatör (Panasonic, Japonya) ve laminer akış kabini ile gerçekleştirilmiştir. Besiyeri olarak DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Gibco, ABD), antibiyotik-antimikotik, fetal sığır serumu (FBS), Tripsin/EDTA kullanılmıştır.

İnsan dermal fibroblast ve fare fibroblast hücrelerinin görüntülenmesi invert mikroskop (Thermo Scientific, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığının kalitatif analizi için Akridin oranj/Propidyum iyodür kullanılmıştır. Sitotoksitesite

testleri için MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid reaktifi ve LDH test kiti (Roche Diagnostics GmbH, Almanya) kullanılmıştır.

4.2 Yöntem

4.2.1 Hücresizleştirilmiş sıçan deri ECM iskelelerinin hazırlanması

Tıraşlanan ve ince kesitleri alınan deri dokusu, deiyonize su ile yıkanmış ve daha sonra hücresizleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücresizleştirme işleminin ilk aşamasında sıçan derileri, epidermisi ve diğer bazı hücresel bileşenleri dermal matrinden ayırmak için, oda sıcaklığında 0.5 mM EDTA içeren %0.25 tripsin çözeltisinde 48 saat manyetik karıştırıcıya bırakılmıştır. Bakteri üremesini önlemek için, çözeltiliye %0.02 (a/h) sodyum azid eklenmiştir. Birkaç kez deiyonize su ile yıkama işleminin ardından dokular, oda sıcaklığında 24 saat boyunca %0.5 Triton X-100 deterjanı ile sürekli karıştırılmıştır. Dokular, deterjanın uzaklaştırılması için deiyonize su ile ikişer defa 30 dakika yıkamaya bırakılmıştır.

Hücresizleştirme aşamaları tamamlandıktan sonra dokular -80°C'ye kaldırılmış ve daha sonra 48 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen dokular öğütücü yardımı ile toz forma getirilerek +4°C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.1.1 Hücresizleştirilmiş sıçan deri ECM'sinin jelleştirilmesi

Hücresizleştirildikten sonra öğütülerek toz forma getirilen %5 (a/h) oranında sıçan deri dokuları, bir kollajen kaynağı olarak tanımlanabilecek %1.5 (a/h) hücresizleştirilmiş sıçan kuyruğu tendonu içeren 0.05 M asetik asit çözeltisi içerisinde 24 saat boyunca mekanik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. Çözelti, deri kalıntılarının giderilmesi amacı ile homojenizatörden geçirilmiş ve çözeltinin jelleşmesi gerçekleştirilmiştir. Jelleşen çözelti daha sonra 1M NaOH ilavesi ile nötralize edilmiştir.

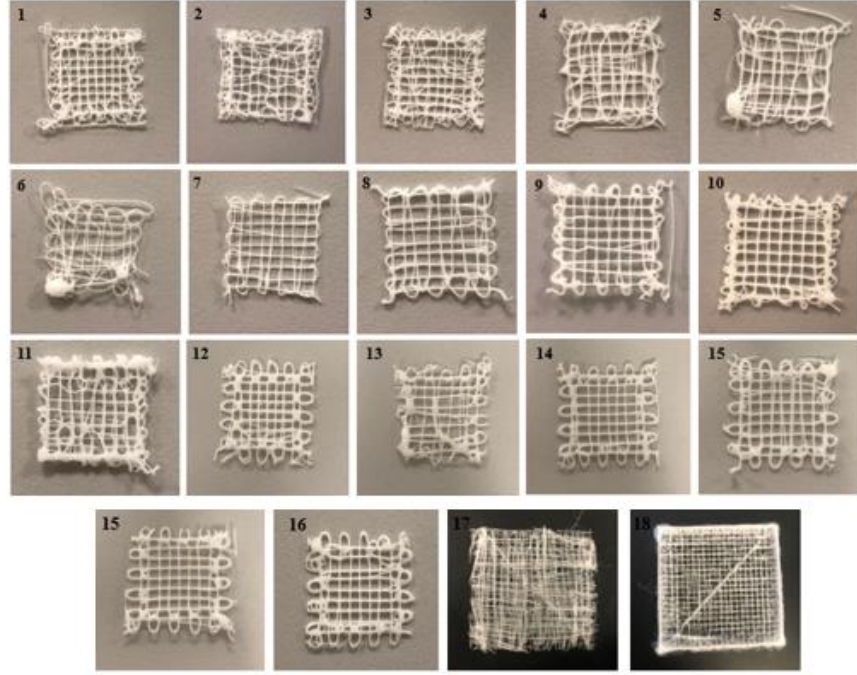
4.2.1.2 3B yazıcı ile hücreleştirilmiş deri ECM hidrojelinin doku iskelesi baskılanması ve çapraz bağlama yöntemi

Hücreleştirilmiş deri ECM hidrojellerinin katmanlı doku iskelesi üretimi için 3B yazıcı (Axolotl Biosystems, Türkiye) kullanılmıştır. Hücreleştirilmiş deri ECM hidrojelinin 3B basımı için 10 mL şırınga kullanılmıştır. İskele tasarımı 30x30x5 kutu modeli ile x, y, z boyutları 0.6 mm olacak şekilde bilgisayar programı aracılığı ile kare olarak ayarlanmıştır. Deri ECM hidrojellerinin, enjektör ucu, basınç, gözenek doluluğu gibi farklı basınç parametreleri kullanarak, herhangi bir sıcaklık işlemi uygulanmadan baskıları alınmıştır.

3B baskısı alınan hücreleştirilmiş deri ECM hidrojeli, EDC (1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) karbodiimid) / NHS (N-hidroksisüksinimid) kullanılarak çapraz bağlanmıştır. EDC ve NHS, MES (2-(N-Morfolino) etansülfonik asit) tamponu içerisinde çözünmüş ve baskısı alınan doku iskelelerinin yüzeyi kaplanacak şekilde eklendikten sonra 4 saat bekletilmiştir. Çapraz bağlama işlemi tamamlandıktan sonra baskılı doku iskeleleri PBS ile yıkanarak +4°C’de muhafaza edilmiştir.

4.2.2 Eriyik elektroyazım (MEW) yöntemi ile 3B PCL doku iskelelerinin hazırlanması

Eriyik elektroyazım tekniği ile fiber doku iskeleleri üretmek amacıyla tıbbi sınıf PCL alınmıştır. Fiber doku iskeleleri Axo-MEW 3B yazıcı ile üretilmiştir. İskele tasarımında önceden tasarlanmış 30x30x5 box modeli, bilgisayar programı aracılığı ile x,y,z boyutları 1,6 mm ve doluluk oranı %50 olacak şekilde ayarlanmıştır. Eriyik elektroyazım ile yazdırılacak olan boncuk şeklindeki PCL polimeri metal enjektöre doldurularak, enjektör sıcaklığı PCL’nin erime sıcaklığına göre 100°C’ye ayarlanmış ve yazdırmaya hazır hale getirilmiştir.



Şekil 4.1 MEW tekniği ile bazı PCL baskı denemeleri

PCL doku iskelelerinin eriyik elektroyazım yöntemi ile yazdırılması sırasında uygulanan farklı enjektör uçları, kollektör mesafesi, gerilim ve basınç ile PCL fiber doku iskeleleri elde edilmiştir.

4.2.3 Hücreleştirilmiş deri ECM hidrojelini ile modifiye edilen PCL doku iskelelerinin hazırlanması

Eriyik elektroyazım tekniği ile yazdırılan PCL doku iskeleleri, 3B baskılı hücreleştirilmiş deri ECM hidrojelini ile “sandviç modeli” şeklinde tasarlanarak modifiye edilmiştir. Üç boyutlu basılmış ve çapraz bağlanmış deri ECM hidrojelini, eriyik elektroyazım ile yazdırılan PCL doku iskelesinin üzerine koyulur ve PCL doku iskelesi katlanarak üçgen şeklindeki sandviç modeli oluşturulmuştur. Daha sonra eritilmiş PCL yardımı ile katlanan iskele kenarlarının yapıştırılması sağlanmıştır.

4.2.4 Hücresizleştirilmiş deri ECM'sinin karakterizasyon çalışmaları

4.2.4.1 Hücresizleştirilmiş deri dokularının DNA içeriğinin belirlenmesi

Hücresizleştirme işleminden sonra deri dokusunda kalan artık DNA miktarının belirlenmesi için DNA içerik analizi yapılmıştır. İşlem görmemiş doğal deri (kontrol) doku ve hücresizleştirilmiş deri doku için örnek sayısı 3 tekrar olarak belirlenmiştir. Liyofilize edilen kontrol ve hücresizleştirilmiş deri doku örnekleri 10 mg tartılır ve üzerine 180 µL parçalama çözeltisi ile 20 µL Proteinaz K eklenerek vortekslenmiştir. Örnekler, 56°C çalkalamalı su banyosu yardımı ile parçalanana kadar inkübe edilmiştir. Daha sonra DNA kantifikasyon kitinin (Genomic DNA Purification Kit, ThermoFisher, ABD) talimatları uygulanmıştır. DNA içeriği, Thermo-Scientific Multiscan GO µdrop plaka okuyucu ile ölçülmüş ve DNA miktarı yüzde azalma olarak belirlenmiştir.

4.2.4.2 Glikozaminoglikan (GAG) miktarının tayini

Kontrol deri dokuları ve hücresizleştirilmiş deri dokularının ECM'sindeki GAG miktarı Dimetil Metilen Mavisi (DMMB) metodu kullanılarak belirlenmiştir. Her iki grup için örnek sayısı 3 tekrar olarak belirlenmiş ve liyofilize dokular 10mg tartıldıktan sonra 24 saat boyunca, 65°C çalkalamalı su banyosu kullanarak 2 mg/ml proteinaz-K ile enzimatik olarak parçalanmıştır. DMMB çözeltisi, distile su içerisinde 40 mM NaCl ve 40 mM glisini çözdükten sonra, 0.1 M HCl ve 4mg 1,9-dimetil-metilen mavisi çinko klorür ikili tuzunun eklenmesi ile hazırlanmıştır. DMMB çözeltisi, bir sonraki kullanıma kadar karanlık ortamda muhafaza edilmiştir. Örnekler 96 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğuna 40 µL hacminde alınarak, üzerine 200 µL DMMB çözeltisi ilave edilmiş ve 525 nm dalga boyu ile mikropilaka okuyucuda absorban ölçümleri alınmıştır.

4.2.4.3 Kollajen miktar tayini

Kontrol ve hücresizleştirilmiş deri dokularının kollajen miktar değişiminin hesaplanması için Hidroksiprolin test kiti kullanılmıştır. Liyofilize edilmiş kontrol ve hücresizleştirilmiş 0.2 g deri doku örnekleri 6M hidroklorik asit (HCL) ile 110°C’de 3 saat süreyle parçalamaya bırakılmıştır. Örnekler 3 saatin sonunda 16000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek çökeltinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Doku ekstraktı, 96 kuyucuklu kültür kabına 60 µL olacak şekilde eklenmiş ve Hidroksiprolin test kitinin talimatları uygulanarak mikrolaka okuyucuda 560 nm’deki absorbans değerleri alınmıştır.

4.2.4.4 Bradford (Coomassie brilliant mavisi) Yöntemi ile total proteinin belirlenmesi

Hücresizleştirilmiş deri doku ECM’sinin total protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Bradford yöntemi, reaktif olarak kullanılan Coomassie brilliant mavisi boyasının proteinlere bağlanarak mavi renk oluşturması esasına dayanır ve 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir.

Kontrol ve hücresizleştirilmiş deri dokularının total protein miktarları, ticari kit kullanılarak (ProteinEx™ ,GeneAll) kitin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Protein miktarının konsantrasyonunun belirlenmesi için standart olarak sıgı serum albümin (BSA) kullanılmıştır. 10 µL standart BSA ve 10 µL seyreltilmiş örnekler 90 µL Bradford reaktifi eklendikten sonra karanlık ortamda 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra optik yoğunluk ölçümleri 595 nm’de mikrolaka okuyucu ile ölçülmüştür. Standart protein çözeltilerinden (BSA) alınan absorbans ölçümleri ile standart grafiği çizilerek, grafik üzerinden örnekler ait total protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

4.2.4.5 Histoloji çalışmaları

İşlem görmemiş deri (kontrol) dokuları ve hücresizleştirilmiş deri dokularının çekirdek ve sitoplazma bütünlüğü histolojik boyama yapılarak incelenmiştir. Kontrol ve hücresizleştirilmiş deri dokuları %10 formalin çözeltisi içerisinde 24 saat boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminin ardından dokular, 24 saat boyunca distile su içerisinde çalkalamaya bırakılmıştır. Dokular 2 tekrarlı 15'er dakika tekrar distile suda çalkalandıktan sonra suyun tamamen uzaklaştırılması için alkol serisinden (30'ar dk. %80- %90- %96) geçirilmiş, ardından 30 dk 2:1 alkol-ksilol, 15 dk 1:2 alkol-ksilol, 15 dk ksilol çözeltileri ile muamelesinden sonra dokular sertleştirilmiş ve ksilol-parafin (15 dk 2:1 ve 30 dk 1:2) muamelesinden sonra ise parafin eklenmiş bloklara gömülerek 24 saat boyunca 58°C'de parafinin dokuya işlenmesi sağlanmıştır. Parafin içerisindeki dokular etüvden alınarak üzeri beyaz kasetlerle kapatılmış ve kasetin üzerini tamamen kaplayacak şekilde parafin eklenerek soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan parafine gömülü dokular boyamaya hazır hale getirmek için tıraşlanmış ve mikrotom yardımı ile 5 µm'lik kesitleri alınmıştır.

4.2.4.5.1 Hematoksilen&Eozin boyaması (H&E)

Hücresizleştirme yönteminin deri doku üzerindeki etkinliğini görüntülemek amacıyla, hücre çekirdeklerini mavi-mor renge, sitoplazmayı ise pembe renge boyayan H&E boyaması yapılmıştır. Kesitleri alınan kontrol ve hücresizleştirilmiş deri dokuları, boyama yapılmadan önce bir gece boyunca parafinden uzaklaştırmak için etüve (58°C) bırakılmıştır. 15 dk'lık ksilol muamelesinden sonra alkol serilerinden geçirilmiş ve 30 dk boyunca hematoksilen çözeltisinde bekletilerek çekirdeklerin mavi-mor renge boyanması sağlanmıştır. Ardından 2 dk eozin çözeltisine alınarak hücre dışı matrisin pembe renge boyanması sağlanmıştır. Kesitler boyama işlemlerinin ardından tekrar alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildikten sonra ksilol çözeltisine alınmış ve entellan aracılığı ile lameller kapatılmıştır. Görüntülemeye hazır hale gelen boyanmış kesitler ışık mikroskobu (Leica, Almanya) altında incelenmiştir.

4.2.4.5.2 Masson trikrom boyaması

Masson Trikrom, bağ dokusu lifleri, kollajen ve hücre çekirdeklerinin görüntülenmesinde kullanılan üç renk boyalı histoloji protokolüdür. Bu boya ile bağ doku lifleri kırmızıya, kollajen maviye ve çekirdekler koyu kahve/siyah renklerine boyanır. Hücresizleştirilmiş deri ve doğal deri dokularının boyaması Masson Trikrom boyama kiti kullanılarak yapılmıştır. Kesitleri alınan kontrol ve hücresizleştirilmiş deri dokuları, boyama yapılmadan önce bir gece boyunca parafinden uzaklaştırmak için etüve (58°C) bırakılmıştır. Boyamaya hazır hale gelen kesitler ilk olarak karıştırılan A ve B solüsyonlarında 10 dk bekletilmiştir. Ardından hızlıca distile sudan geçirilmiş ve C solüsyonuna koyularak 4 dk bekletilmiştir. Kesitler tekrar distile sudan geçirildikten sonra D solüsyonuna koyularak 15 dk bekletilmiştir. Distile su ile yıkandıktan sonra E solüsyonuna koyularak 5 dk bekletilmiş ve yıkama işlemi yapılmadan F solüsyonuna koyularak 7-8 dk bekletilmiştir. Boyama aşamaları tamamlandıktan sonra %96 ve %99.9 etanol serisinden geçirilerek ksilol çözeltisine alınmış ve ardından entellan yardımı ile lameller kapatılmıştır. Görüntülemeye hazır hale gelen boyanmış kesitler ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

A solüsyonu: Weigert demir hematoksilen

B solüsyonu: Weigert demir hematoksilen

C solüsyonu: Alkollü pikrik asit

D solüsyonu: Ponceau asit fuksin

E solüsyonu: Fosfomolibdik asit

F solüsyonu: Masson anilin mavisi

4.2.5 PCL, 3B Hücresizleştirilmiş deri ECM ve Modifiye Edilmiş PCL Doku İskelelerinin Karakterizasyon Çalışmaları

4.2.5.1 Şişme testi

Hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojel, PCL ve sandviç modeli doku iskelelerinin (n=2) su tutma kapasitelerinin ölçülebilmesi için şişme testi yapılmıştır. Numuneler

37°C’de 1 saat kurutulduktan sonra tartımları alınarak (W_0), farklı sürelerde (1 dk, 3 dk, 5 dk) distile su içerisinde bekletilmiştir. Belli bir miktar su absorblayan numuneler, filtre kâğıdı üzerine alınarak kısa bir süre bekletilmiş ve tartımı alınmıştır (W_s). Şişme derecesi;

$$\% \text{ Şişme Derecesi} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100$$

denklemine göre hesaplanmıştır.

4.2.5.2 Biyobozunurluk çalışmaları

Hücreleştirilmiş deri ECM hidrojel, PCL ve sandviç modeli doku iskelelerinin ($n=3$) biyobozunma hızları hidrolitik (PBS) ve enzimatik (Lizozim) bozunma testleri ile gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinin başlangıçtaki kuru ağırlıkları tartılmış ve daha sonra ayrı ayrı 7.5 mL PBS ve 7.5 mL lizozim çözeltisi içerisinde 1., 3., 5., 10., 20., 30. günler boyunca 37°C, 75 rpm çalkalama hızıyla bozunmaya bırakılmıştır. Bu süreler zarfında doku iskeleleri çözeltilerden çıkarılarak kurutulmuş ve ağırlıklarının tartımı alınmıştır.

4.2.5.3 Temas açısı ölçümü

Temas açısı ölçümü, malzeme ve yüzey arasındaki hidrofobik veya hidrofilik etkileşim hakkında bilgi vermek adına yapılan yöntemdir. Hücreleştirilmiş deri ECM hidrojel, temas açısı ölçümü için, 3B yazıcıda gözenek boşluğunun olmaması için %100 doluluk oranında yazdırılmıştır. Alınan ölçümlerde öncelikle oda sıcaklığında mikro şırınga vasıtasıyla hidrojel üzerine 5 µL distile su damlatılarak kısa bir süre beklenmiştir. Hidrojel üzerindeki damlacığın temas açısı kamera yardımı ile yakalanır. Tüm ölçümler, kaydedilen sonuçların ortalaması alınarak, hidrojel farklı yüzeyinde en az 3 defa tekrar edilmiştir.

4.2.5.4 Reoloji

Farklı konsantrasyonlarda kollajen (hücreleştirilmiş tendon) içeren (%0.5, %1 ve %1.5) ve düz hücreleştirilmiş deri ECM hidrojellerinin viskozite özellikleri bir reometre cihazı (Anton Paar, İngiltere) kullanılarak, kayma hızına karşı viskoziteleri değerlendirilmiştir.

4.2.5.5 Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

FTIR analizi, farklı moleküller arasındaki bağların farklı frekans bölgelerinde titreşim yaparak moleküllerin kendine ait absorpsiyon profilini gösterir. Tez kapsamında, PCL doku iskelelerinin ve 3B hücreleştirilmiş deri ECM doku iskelesi ve sandviç modellenmiş doku iskelelerinin kimyasal yapısı analiz edilmiştir.

4.2.5.6 Termogravimetrik analiz (TGA)

Hücreleştirilmiş deri ECM doku iskeleleri, PCL doku iskeleleri ve sandviç modellenmiş doku iskelelerinin sıcaklığa bağlı kütlelerinde meydana gelen değişimler TGA ile ölçülmüştür. Numunelerin analizi, 25-800°C sıcaklık aralığı, 10°C/dk ısıtma hızı ve azot ortamında gerçekleştirilmiştir.

4.2.5.7 X-ışını kırınım analizi (XRD)

PCL, 3B hücreleştirilmiş deri ECM ve sandviç modellenmiş doku iskeleleri XRD analizi ile incelenmiştir. Analiz, 40 kV ivmeli, 2°/dk tarama hızı ve 30 mA akımlı X-ışın tüpü ölçüm koşullarıyla gerçekleştirilmiştir.

4.2.6 Hücre kültür çalışmaları

Tez kapsamında hücre kültür çalışmaları, insan dermal fibroblast ve fare fibroblast (L929) hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışılan iki hücre hattı, 37 °C'de çözdürülmüş ve hücre süspansiyonu 15 mL tüplere alınarak 1200 rpm'de 6 dk

santrifüjlenmiştir. Hücre pelletlerinin süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra pelletin üzerine DMEM-F12 besiyeri (%10 fetal sığır serumu, FBS, ve %1 antibiyotik-antimikotik ile hazırlanmış) 3 mL eklenmiş ve 2'şer 75 cm²'lik kültür kaplarına aktarılmıştır. Kültür kapları, 37 C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür edilmişlerdir.

4.2.6.1 Sitotoksosite testleri

PCL, 3B hücreleştirilmiş deri ECM ve sandviç modeli doku iskelelerinin sitotoksik (biyouyumluluk) testleri, insan dermal fibroblast ve L929 fibroblast hücrelerinin kullanımıyla hem MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) hem de LDH (Laktat dehidrogenaz) testleri ile değerlendirilmiştir.

4.2.6.1.1 MTT testi

MTT, sitotoksosite veya hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan, temelde süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçen ve aynı zamanda hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunun belirlenmesi ile hücre canlılığı hakkında fikir veren kolorimetrik testlerden biridir.

Tez kapsamında MTT testi, insan dermal fibroblast ve L929 hücreleri ile dolaylı yoldan gerçekleştirilmiştir. PCL, 3B hücreleştirilmiş deri ECM ve sandviç modeli doku iskeleleri, 30 dk UV altında tutulduktan sonra %80 etanol içerisinde 2.5 saat bekletilmiş ve ardından 0.25 g sodyum azid içerikli dPBS tamponu ile 4 defa yıkanmıştır. Daha sonra %5 antibiyotik-antimikotik içeren besiyerine alınarak bir gün boyunca inkübe edilmiş ve böylelikle doku iskelelerinin sterilizasyonu tamamlanmıştır. Deneysel çalışma, 48 kuyucuklu plakalara, 1x10⁴ hücre ekimi yapılarak kontrol ve doku iskele grupları n=3 olacak şekilde inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. MTT testi 1,3 ve 5. gün boyunca yapılmıştır. Belirlenen günlerde yapılacak MTT ölçümünden önce kuyucuklardaki besi yerleri malzeme içerikli besi yerleri ile değiştirilip inkübe edilmiş ve sonra MTT reaktifi ilave edildikten sonra 4 saat inkübatörde bekletilmiştir. 4 saatin sonunda kuyucuklardaki karışım çekilerek 96

kuyucuklu plakalara aktarılmış ve örnekler mikrolaka okuyucuda 570 nm’de ölçümü alınmıştır.

4.2.6.1.2 LDH salınım testi

LDH salınım testinde, hücre ölümü ile ilgili hücre zarı bütünlüğü değerlendirilir. Hasar gören veya ölü hücrelerden salınımı gerçekleşen sitoplazmik LDH enziminin seviyesi kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Tez çalışmasında, Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (Roche, Almanya) LDH kit protokolü uygulanarak analiz gerçekleştirilmiştir.

24 kuyucuklu plakalara kontrol kuyucuğu ve doku iskeleleri için n=3 olacak şekilde 2.5×10^4 hücre ekilmiş ve 24 ve 48 saat kültür edilmiştir. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa kitte bulunan liziz solüsyonundan 10 µl eklenmiş ve 45 dk, 37°C’de %5CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki besiyerinin 50 µl’si 96 kuyucuklu plakalara alınarak üzerine 50 µl LDH bileşeni eklenmiş ve 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Ardından kuyucukların üzerine 50 µl stop solüsyonu eklenerek 1 saat bekletilmiş ve mikrolaka okuyucuda 490-600 nm aralığında ölçümü alınmıştır.

4.2.6.2 Hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışı

Dermal fibroblast ve L929 fibroblast hücrelerinin doku iskeleleri üzerindeki çoğalma davranışları MTT kullanılarak 1., 3., 5., ve 7. günlerde incelenmiştir. Bu amaçla, PCL, 3B hücresizleştirilmiş deri ECM ve sandviç modellenli doku iskeleleri n=3 olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara alınarak üzerlerine 3×10^4 hücre/iskele olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin iskelelere yapışması için 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatöre alınmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucukların kenarlarından dikkatlice besiyeri ilave edilmiştir. Belirlenen günlerde kültür ortamı aspire edilmiş ve MTT reaktifi, DMEM-F12 besiyeri ile 1:15 oranında seyreltilerek kültür ortamındaki örnekler eklenmiş ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İndirgenmiş MTT çözeltileri, 4 saatlik inkübasyonun ardından 96 kuyucuklu plakaya aktarılmış ve mikrolaka okuyucuda 570 nm’de ölçümü alınmıştır.

4.2.6.3 Akridin Oranj/Propidyum İyodür (AO/PI) İkili Boyama ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi

Akridin oranj ve Propidyum iyodür, hücre canlılığının değerlendirilmesinde, canlı ve ölü hücrelerin aynı anda görüntülenmesini sağlayan, nükleik asitlerle etkileşime giren floresan boyalardır. L929 fibroblast hücreleri, 24 kuyucuklu plakalara kontrol kuyucuğu ve doku iskeleleri için $n=2$ olacak şekilde 2.5×10^4 hücre ekilmiş ve 24 ve 48 saat kültür edilmiştir. İskelelerin bulunduğu besiyerleri 24 saatlik kültürün sonunda kuyucuktaki besiyerleri ile değiştirilmiştir. 24 ve 48 saat sonra görüntüleri alınmadan önce akridin oranj ve propidyum iyodür 1:1 oranında karıştırılmıştır. Kuyucuklardaki besiyerleri çekilmiş ve PBS ile yıkanmıştır. AO/PI boyası kuyucuklara eklenmiş ve 20 sn bekledikten sonra tekrar PBS ile yıkanarak floresan mikroskop altında görüntüleri alınmıştır.

4.2.7 Anti-mikrobiyal etkinlik testleri

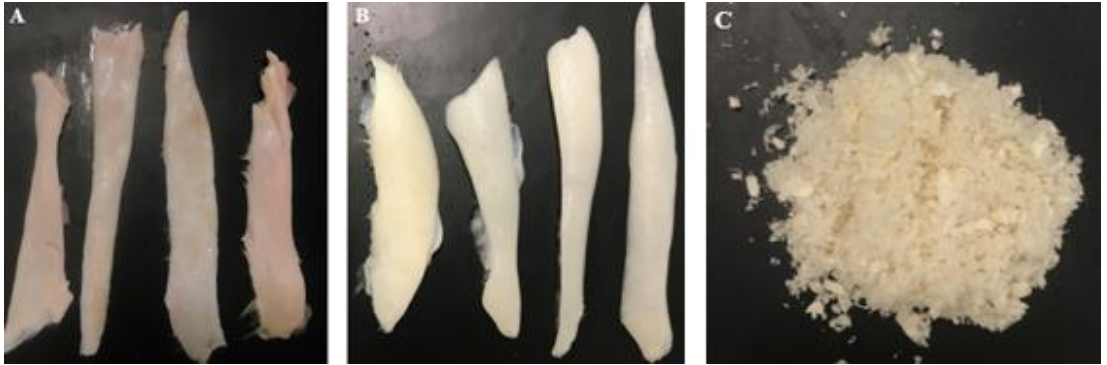
PCL, 3B dsECM ve sandviç modeli doku iskelelerinin olası antimikrobiyal etkisi, deri florası patojenik mikroorganizması olan *Staphylococcus epidermidis* W17 kullanılarak incelenmiştir. Doku iskelelerinin test öncesi sterilizasyonları için, laminar kabin içerisine alınarak 30 dk UV altında bekletilmiş, daha sonra 2 saat %80 etanol ile muamele edilmiş ve 4 defa PBS ile yıkanmıştır. Ardından % Penisilin/Streptomisin içeren PBS içerisine alınarak 1 gün boyunca inkübe edilmiş ve sterilizasyonu tamamlanmıştır. Agar plak üzerindeki koloniler 10 mL beyin kalp infüzyon besiyeri (Brain Heart Infusion Broth-BHI) içerisine inoküle edilmiş ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. 1.5 mL karışık kültür, 30 mL BHI içine aşılanarak bir gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Deneyde kullanılan doku iskeleleri sırasıyla 0, 1 ve 5 mg/mL derişimlerde Ampisilin/steril distile su (2 mL) ile oda sıcaklığında 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra mikrobiyal hücreler McFarland 2.0 bulanıklığına ayarlanmış ve 100 µL'si BHI Agar plakalarına inoküle edilmiştir. 24 saat antibiyotik emdirilmiş doku iskeleleri ise bu kültürlerin inokülasyonundan sonra yerleştirilmiş ve 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak pamuk ve pozitif kontrol olarak ise ticari ampisilin diskleri kullanılmıştır.

5. BULGULAR

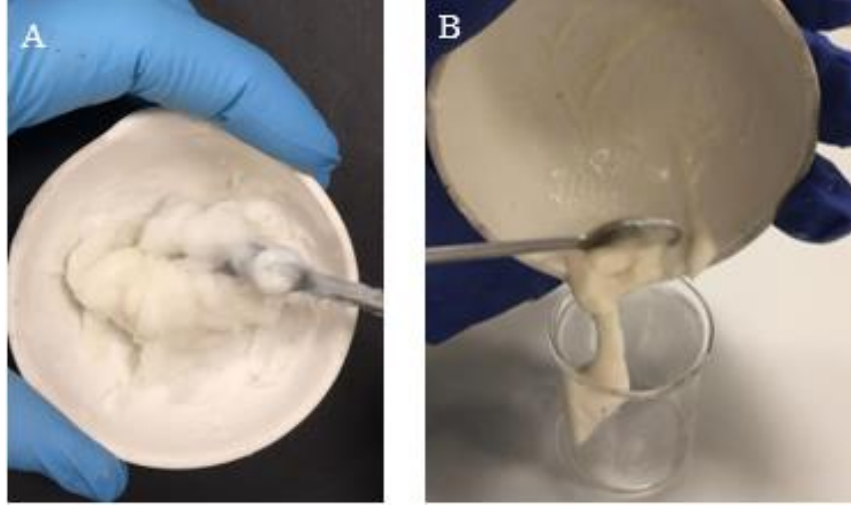
Deri doku mühendisliğine ideal doku iskele malzemesi tasarlamak amacıyla, eriyik elektroyazım tekniği ile yazdırılan ve 3B baskılı hücresizleştirilmiş deri doku ECM'si ile modifiye edilen nanofiber yapıdaki PCL doku iskeleleri üretilmiş ve karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmalarının sonucunda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

5.1 Hücresizleştirilmiş Deri Doku ECM İskelesinin Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları

Doğal deri ve hücresizleştirme işlemi uygulanan deri dokuları şekil 4.1'de verilmiştir. Deri dokuları ince kesitler halinde parçalara ayrılarak hücresizleştirme işlemi uygulandığında, Tripsin-EDTA ve Triton x-100 çözeltileri dokulara daha fazla nüfuz ederek etkin bir hücresizleştirme gerçekleştirilmiştir. Hücresizleştirilen deri dokuların, asetik asit muamelesi ile parçalanması ve kollajen kaynağı olarak değerlendirilen hücresizleştirilmiş sıçan kuyruğu tendonu ilavesi ile jelleştirme protokolü uygulanmıştır.



Şekil 5.1 A) Sıçan deri doku örnekleri B) Hücresizleştirilmiş sıçan deri doku örnekleri C) Öğütülerek toz forma getirilen hücresiz deri doku

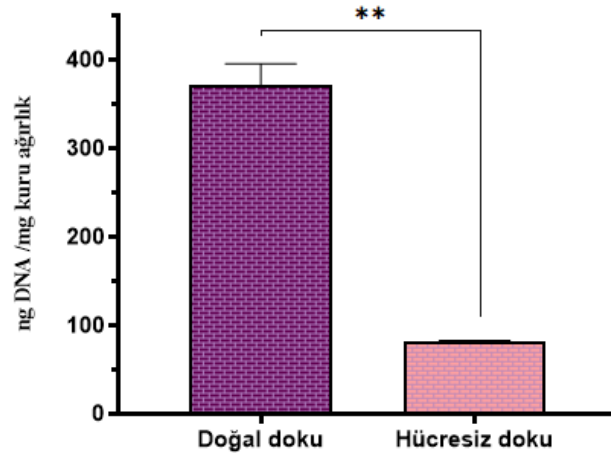


Şekil 5.2 A) dsECM'nin jelleşmesi B) Nötralize edilmiş dsECM jeli

5.1.1 DNA içerik analizi

Hücreleştirilmiş deri dokularındaki artık DNA miktarının belirlenmesi için DNA içerik analizi gerçekleştirilmiş ve bu işlem Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit ile yapılmıştır. Hücreleştirilmiş ve işlem görmemiş sıçan deri dokuları -80°C'de dondurulduktan sonra liyofilize edilmiş ve GeneJet DNA saflaştırma kit protokolü gerçekleştirilmiştir. Dokulardaki DNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{DNA Konsantrasyonu } (\mu\text{g/ mL}) = (A_{260} - A_{320}) \times (50/0.049)$$

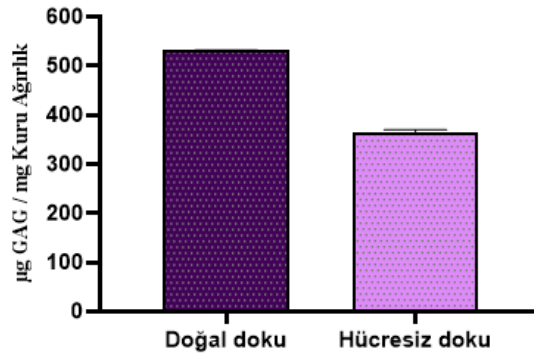


Şekil 5.3 Doğal ve hücreleştirilmiş doku için DNA içerik analizi grafiği, n=3 (** p<0.01)

Kontrol grubu olarak doğal deri dokusu baz alınmış ve tek yönlü Anova analizinin doğal ve hücreleştirilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark görülmüştür ($p<0,01$). Genomik DNA analiz sonuçlarına göre, doğal dokuya kıyasla hücreleştirilmiş deri dokusunun DNA içeriğinin $78,1 \pm 1,21$ oranında uzaklaştırıldığı belirlenmiştir.

5.1.2 Glikozaminoglikan (GAG) miktarının tayini

Hücreleştirilmiş ve doğal sıçan deri dokularının GAG miktarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analiz için, deri dokuları liyofilize edilmiş ve GAG analiz protokolü uygulanmıştır. Ardından örneklerin 525 nm’de absorpsiyon ölçümleri alınarak % GAG kaybı hesaplanmıştır.



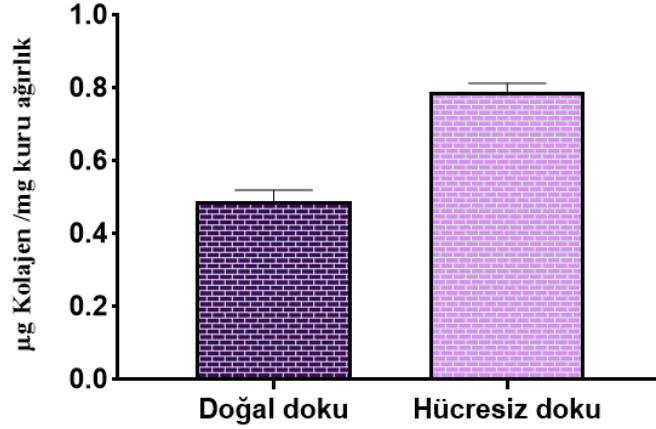
Şekil 5.4 Doğal doku ve hücreleştirilmiş doku için GAG içerik analizi grafiği (n=3)

GAG analizinin sonuçlarına göre, doğal ve hücreleştirilmiş deri dokunun tek yönlü ANOVA analizinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Doğal deri dokunun GAG miktarı 0.531 mg /10 mg kuru doku (531 µg) olarak hesaplanırken, hücreleştirilmiş sıçan deri dokuda kayıp yaşanmış ve geriye kalan 360 µg GAG miktarı ile doku iskelesinde %67.8’inin korunduğu belirlenmiştir.

5.1.3 Kollajen miktar tayini

Deri doku iskelesinin %70-80’ini kollajen oluşturur. Doğal ve hücreleştirilmiş sıçan deri dokularının kollajen miktar tayini hidroksiprolin test kiti ile analiz edilmiş

ve örnekler mikropłaka okuyucuda 565 nm’de ölçümleri alınmıştır. Burada doğal deri dokusunun kollajen içeriği $0,4877 \pm 0,030$ mg, hücresizleştirilmiş deri dokunun kollajen içeriği $0,7886 \pm 0,023$ mg olarak hesaplanmıştır.



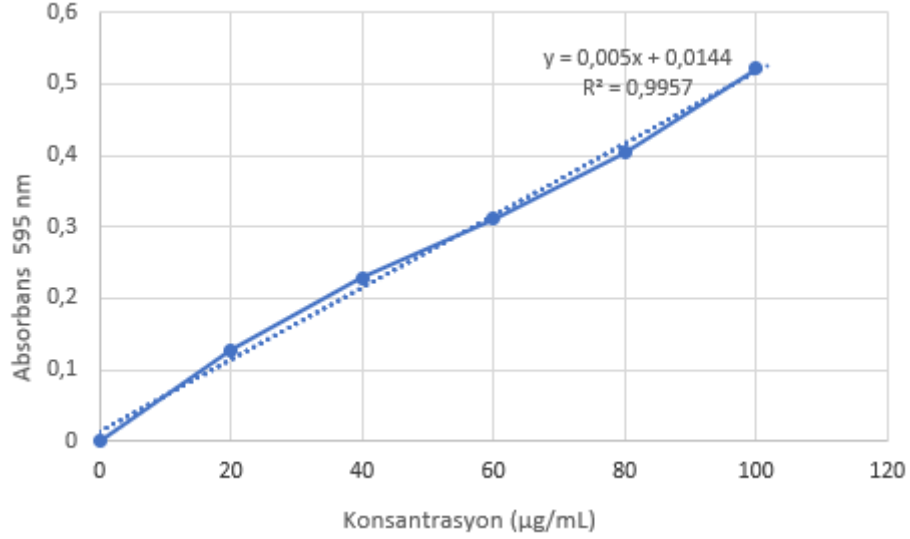
Şekil 5.5 Doğal doku ve hücresizleştirilmiş doku için kollajen içerik analiz grafiği (n=3)

Hücresizleştirilmiş dokunun, doğal dokuya kıyasla daha yüksek miktarda kollajen içerdiği görülmekte ve literatürde benzer bulgulara rastlanmaktadır. Hücresizleştirme işlemi sırasında, dokunun kollajen matrisinin uzaklaştırılamaması ve beraberinde diğer hücresel proteinlerin uzaklaştırılmasından dolayı kollajen miktarı hücresizleştirme işleminden sonra kuru ağırlığın bir yüzdesi olarak artma eğilimi göstermiştir. Ayrıca, hücresizleştirme işleminin sonucunda dokunun kollajen içeriğinde kaybın görülmemesi histoloji çalışmaları ile de desteklenmektedir. Masson Trikrom boyamasında görülen kollajenlerin, hücresizleştirilmiş deri doku örneğinde oldukça başarılı boyanması bu sonuçların kalitatif bir göstergesidir.

5.1.4 Bradford (Coomassie brilliant mavisi) yöntemi ile total proteinin belirlenmesi

Hücresizleştirilmiş deri doku ECM’sinin total protein konsantrasyonu, Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve 90 µL Bradford reaktifi 10 µL standart ve 10 µL numunelere ilave edilerek 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra 595 nm’de mikro plaka okuyucu ile absorbansları ölçülmüştür. BSA ile hazırlanan standart protein çözeltileri ile şekil 5.4’te verilen standart grafik oluşturulmuş ve

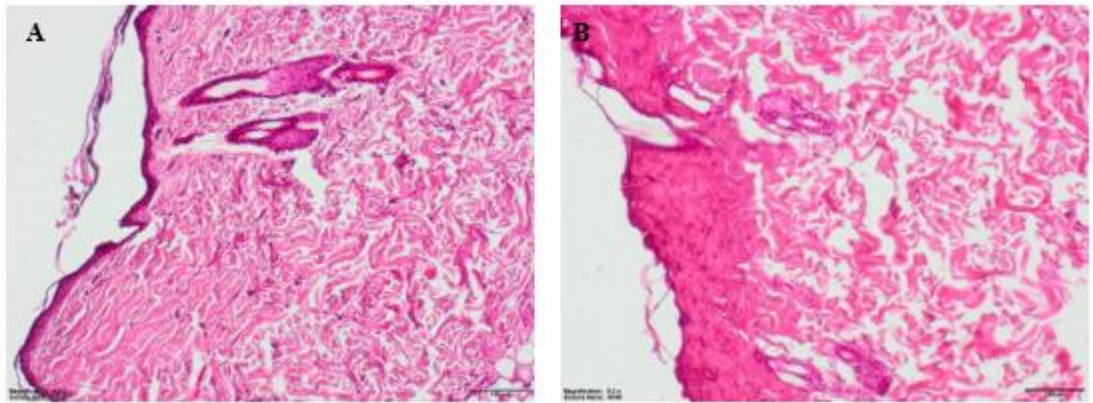
hücreleştirilmiş ve kontrol deri doku gruplarının total protein içeriği standart grafiğın eğri denklemin ile hesaplanmıştır. Yapılan hesaplama sonucunda, işlem görmemiş kontrol dokunun protein içeriği 209,96 µg/mg doku, hücreleştirilmiş deri dokunun protein içeriği ise 227,1 µg/mg doku olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.6 dsECM'nin protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik

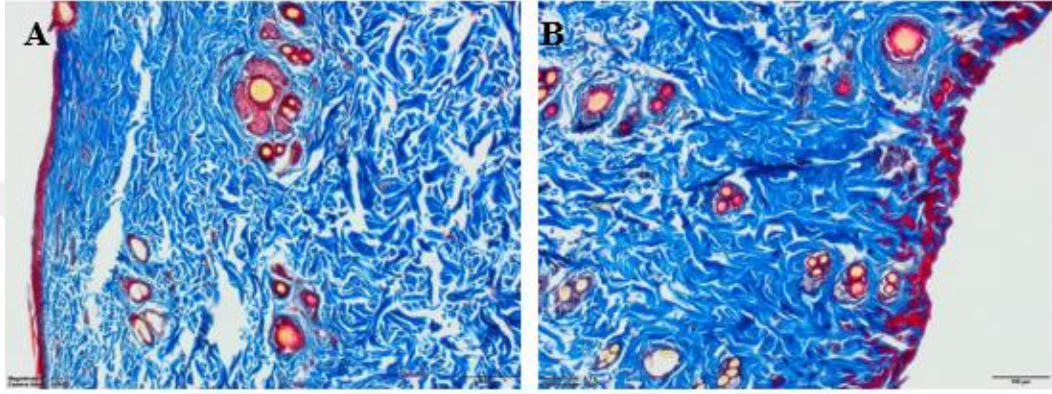
5.1.5 Histoloji boyamaları

Boyu 1 cm³ ve eni 2 cm³ olacak şekilde kesilen doğal (kontrol) deri ve hücreleştirme işlemi uygulanmış deri dokularının Hematoksilen&Eozin ve Mason Trikróm boyama görüntüleri şekil 5.5 ve şekil 5.6'da gösterilmiştir.



Şekil 5.7 A) Doğal dokunun H&E boyaması B) Hücreleştirilmiş dokunun H&E boyaması

Hematoksilen&Eozin boyama görüntüleri incelendiğinde, doğal deri dokunun çekirdeklerinin mor renge boyandığı, sitoplazmanın ise pembe renge boyandığı görülmektedir. Hücresizleştirilmiş deri dokunun ise hücresizleştirme aşamalarında kullanılan kimyasal ajanlar sayesinde çekirdeklerinin uzaklaştırıldığı ve ECM bütünlüğünün neredeyse hiç bozulmadığı ve hücresizleştirme yönteminin başarılı olduğu görülmektedir.



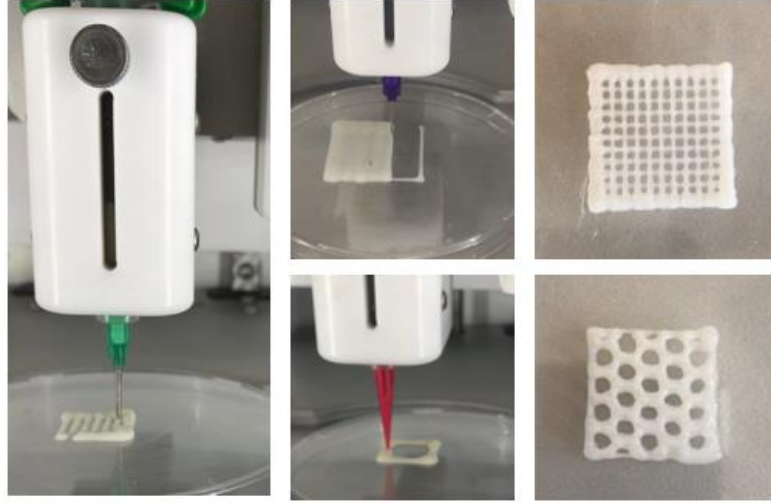
Şekil 5.8 A) Doğal dokunun Masson Trikrom boyaması B) Hücresizleştirilmiş dokunun Masson Trikrom boyaması

Şekil 5.6’da gösterilen Masson Trikrom boyamaları incelendiğinde, hücresizleştirme işlemi uygulanmamış dokunun kollajen lifleri mavi renge boyandığı görülmektedir. Benzer şekilde hücresizleştirilmiş deri dokunun da kollajen liflerinin mavi renge boyandığı ve hücresizleştirme sonrası yapının korunarak ve ECM bütünlüğünün bozulmadığı gözlenmektedir.

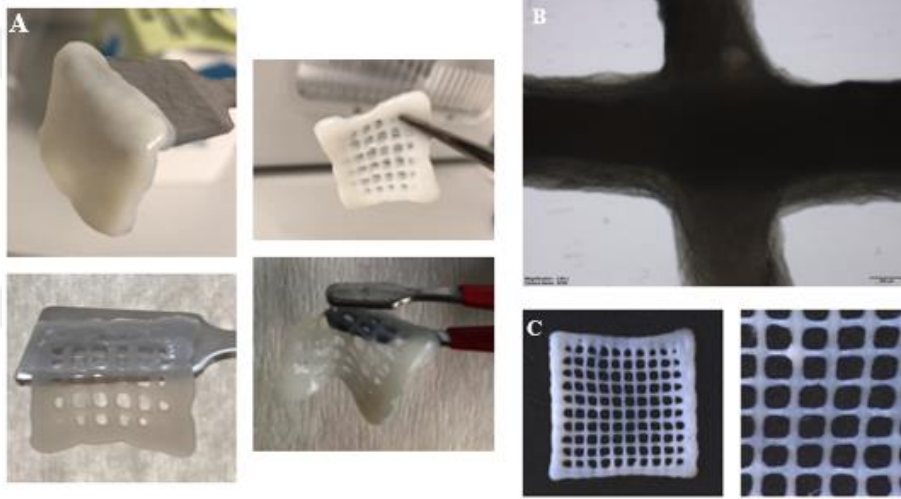
5.2 PCL, 3B Hücresizleştirilmiş Deri ECM ve Modifiye Edilmiş PCL Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyon Çalışmaları

5.2.1 PCL, 3B hücresizleştirilmiş deri ECM ve modifiye edilmiş PCL doku iskelelerinin hazırlanması

Hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojellerinin basım parametreleri 37 psi basınç altında, 21G enjektör ucu ve % 40 doluluk oranı ve 6 katmanlı basımı alınacak şekilde optimize edilmiş ve hem ışık mikroskopu hem de stereo mikroskop altında görüntüleri alınmıştır.

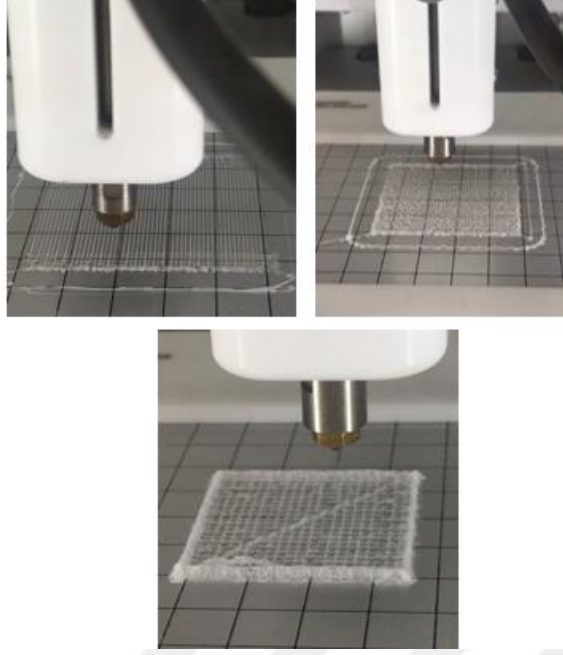


Şekil 5.9 dsECM hidrojelinin 3B baskı denemeleri

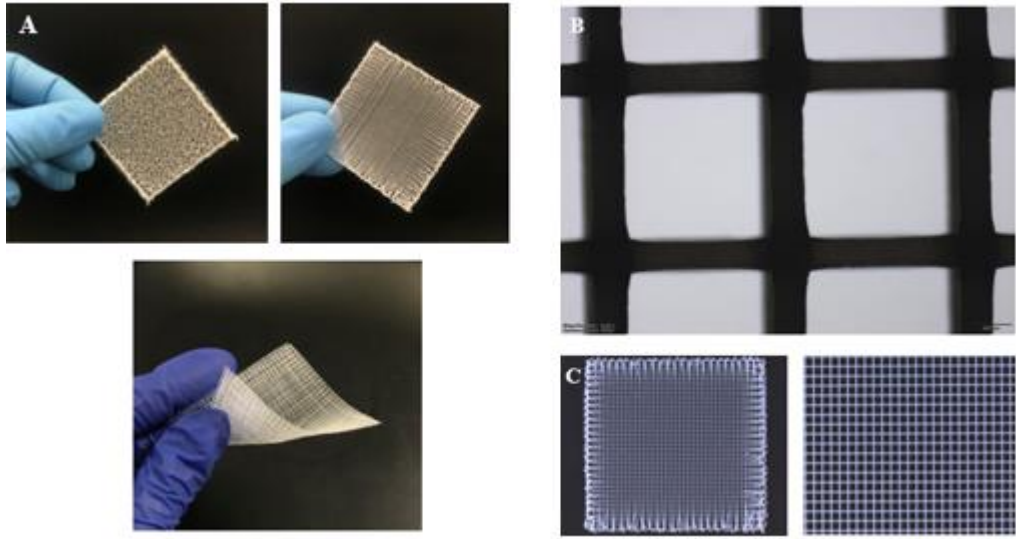


Şekil 5.10 A) Çapraz bağlama işleminden sonra 3B dsECM görüntüleri, B) Işık mikroskop altındaki görüntüsü C) Stereomikroskop altındaki görüntüleri

MEW tekniği ile yazdırılan PCL doku iskelelerinin basım parametreleri, 0.20 mm enjektör ucu, 6 mm kollektör mesafesi 0.9 bar basınç ve uygulanan gerilim 4 kV olacak şekilde optimize edilmiş ve %50 doluluk oranı içeren 8 katmanlı doku iskeleleri elde edilmiş ve hem ışık mikroskobu hem de stereo mikroskop altında görüntüleri alınmıştır.

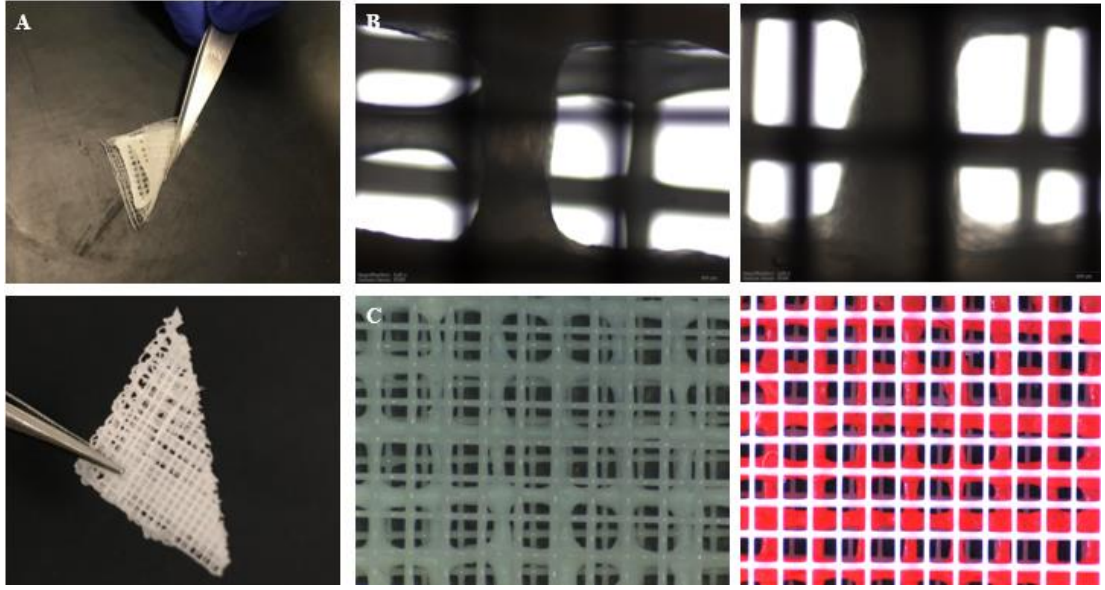


Şekil 5.11 MEW tekniği ile yazdırılan PCL doku iskelelerinin baskı sırasındaki görüntüleri



Şekil 5.12 A) MEW ile basılan PCL doku iskeleleri, B) Işık mikroskop altındaki görüntüsü, C) Stereomikroskop altındaki görüntüleri

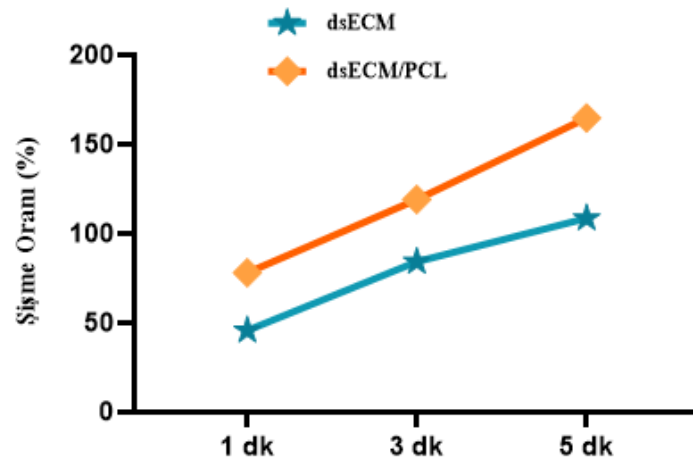
PCL doku iskeleleri, 3B hücreleştirilmiş deri ECM ile sandviç modeli olacak şekilde modifiye edilmiş ve ışık mikroskobu ve stereo mikroskop altındaki görüntüleri alınmıştır.



Şekil 5.13 A) Sandviç doku iskelelerinin hazırlanması B) Işık mikroskop görüntüleri C) Stereomikroskop görüntüleri

5.2.2 Şişme testi

Çapraz bağlı, 3B hücreleştirilmiş deri ECM doku iskeleleri ve sandviç modellen (dsECM-PCL) doku iskelelerinin şişme davranışları zamana bağlı, distile su ortamında değerlendirilmiş ve ağırlık değişimi cinsinden % şişme oranı belirlenmiştir.

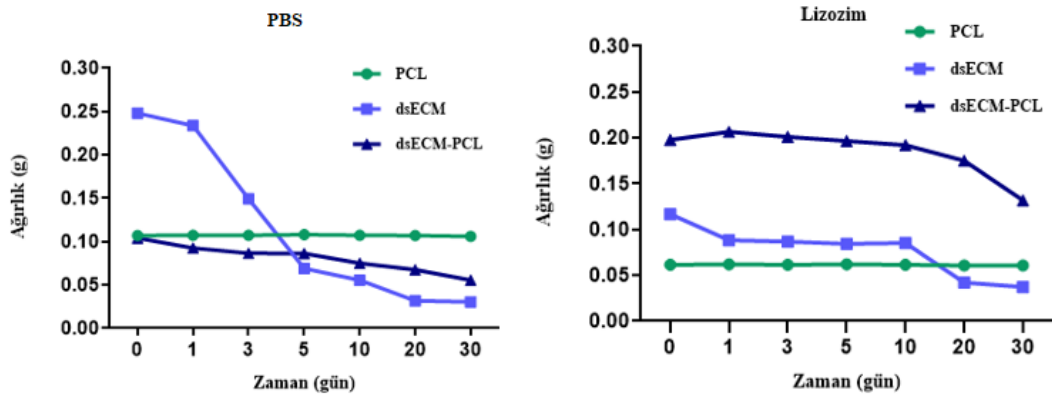


Şekil 5.14 dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin zamana bağlı şişme oranlarını gösteren çizgi grafiği

Doku iskelelerinin şişme testi grafiği incelendiğinde; çapraz bağlı hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojelinin zamana bağlı olarak şişme derecesinin arttığı gözlenmiştir. PCL'nin, deri ECM hidrojel ile modifiye edildiği sandviç modellenli doku iskelesinin ise deri ECM hidrojele kıyasla daha çok su tutma ve şişme kabiliyetine sahip olduğu görülmektedir.

5.2.3 Biyobozunurluk çalışmaları

Doku iskelelerinin bozunma süresi doku mühendisliğindeki kullanımı açısından oldukça önemlidir. Bozunma hızı çok yüksek olduğunda iskele, hücrenin kendi hücre dışı matrisini oluşturmasını destekleyemezken bozunma hızı düşük olduğunda ise yabancı maddelere karşı bir inflamasyon oluşumuna neden olur.



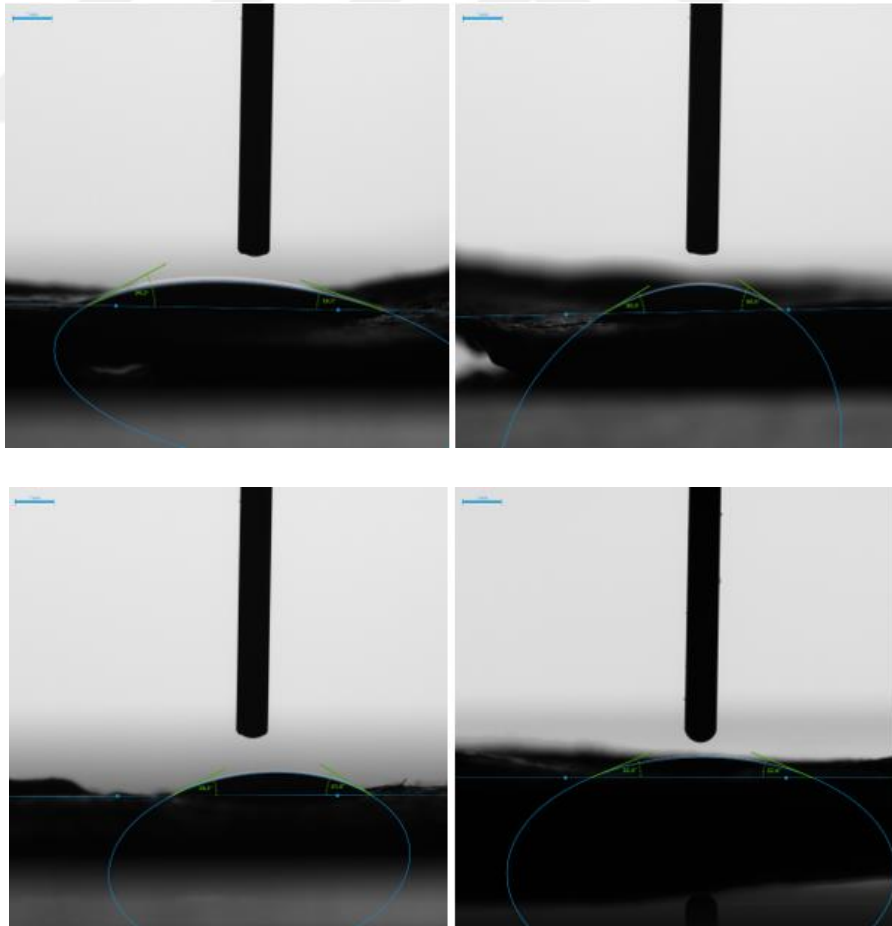
Şekil 5.15 PCL, dsECM ve Sandviç (dsECM-PCL) doku iskelelerinin PBS ve Lizozim çözeltileri içindeki zamana bağlı bozunma grafikleri

Çalışma kapsamında, PCL, hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojel ve sandviç modellenli (dsECM-PCL) modifiye doku iskelelerinin (n=3) PBS ve enzimatik içerikli 30 günlük deney süresindeki bozunma grafikleri incelendiğinde; PCL'nin hem enzimatik hem de hidrolitik ortamdaki bozunma oranının 30. gün sonunda başlangıca göre %1,6-0,93 arasında olduğu gözlenmiştir. Çapraz bağlı deri ECM hidrojelinin PBS ortamındaki bozunma oranındaki en büyük değişim 5.günde gerçekleşmiş ve bu oran %72 olarak belirlenmiştir. Lizozim içerikli ortamda ise ilk değişim 1.günde ~ %24 azalma olarak görülürken 20. güne gelindiğinde %65.5 oranında azalmış ve sonraki 10 gün boyunca daha yavaş ve kontrollü bir bozunma gerçekleşmiştir. Sandviç modellenli modifiye iskelelerindeki en belirgin azalma 30.gün sonunda

gerçekleşmiş ve bu oran PBS ortamında ~%52, lizozim ortamında ise ~ %33,5 olarak gözlenmiştir.

5.2.4 Temas açısı ölçümü

Katı bir yüzey ile temas eden sıvının temas açısının büyüklüğü, adezyon ve kohezyon kuvvetlerinin büyüklüğüne bağlıdır. Temas açısının büyüklüğü katı yüzeye ve damlatılacak sıvının türüne göre değişmektedir. Hidrofobik bir yüzeye su damlatıldığında, su molekülü yüzey enerjisini minimum seviyeye indirmek için küre şeklini almaktadır. Ortaya çıkan bu kürenin sayısal değerini ölçmek için temas açısı yöntemi geliştirilmiştir. Temas açısı yöntemine göre, su molekülünün örnek ile temas derecesi 90° 'den büyük olması örneğin hidrofobik, küçük olması ise örneğin hidrofilik, 0° 'ye yakın olması ise örneğin süper hidrofilik özellikte olduğu anlamına gelmektedir (Leite vd. 2019).

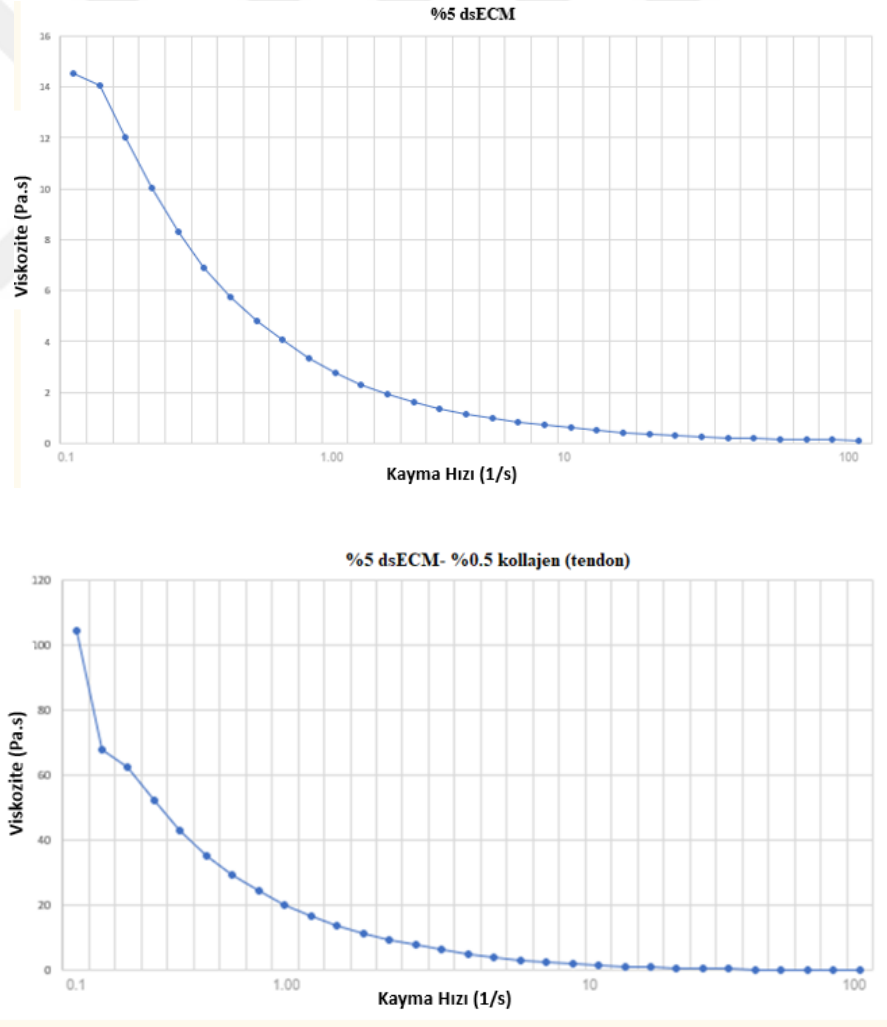


Şekil 5.16 3B dsECM doku iskelesinin temas açısı görüntüleri

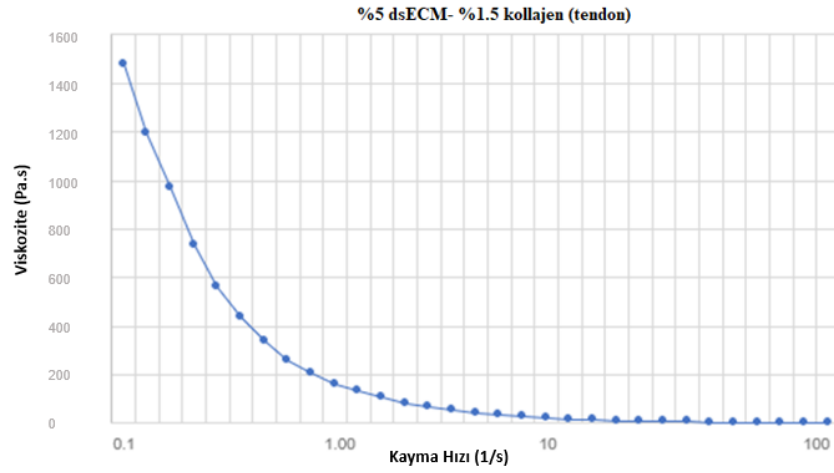
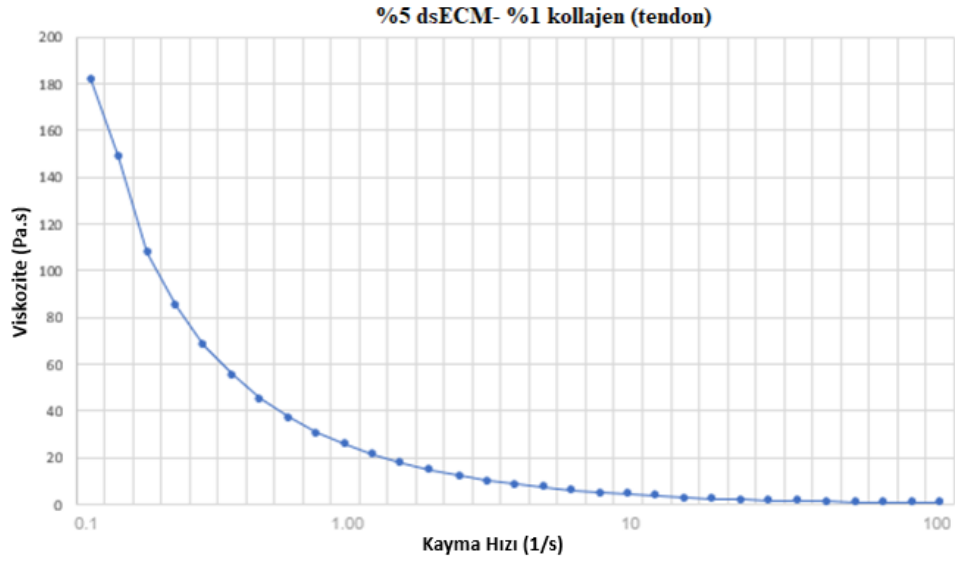
Şekil 5.9'da, %100 doluluk oranına sahip hücreleştirilmiş deri ECM hidrojelinin, farklı noktalarında gerçekleştirilen temas açısı ölçümü gösterilmektedir. Mikro şırınga ile hidrojel yüzeyine damlatılan suyun temas açısı, numunenin farklı noktalarında 22,5-36,5° arasında değişmektedir. Ölçülen bu açılar, hazırlanan hidrojel oldukça hidrofilik yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

5.2.5 Reoloji çalışmaları

%5 deri ECM, %5 deri ECM/ %0.5 kollajen (hücreleştirilmiş tendon), %5 deri ECM/ %1 kollajen (hücreleştirilmiş tendon) ve %5 deri ECM/ %1.5 kollajen (hücreleştirilmiş tendon) hidrojellerinin viskozite özelliklerinin belirlenmesi için reoloji analizi yapılmış ve artan kesme hızlarına karşı viskozite grafikleri çizilmiştir.



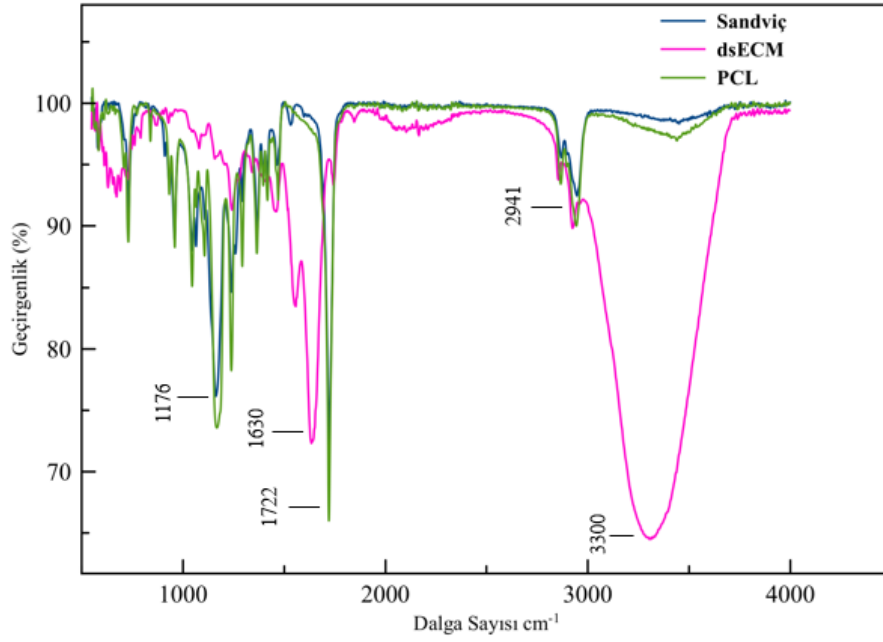
Şekil 5.17 %5 deri ECM, %5 deri ECM/ %0.5 kollajen (hücreleştirilmiş tendon), %5 deri ECM/ %1 kollajen (hücreleştirilmiş tendon) ve %5 deri ECM/ %1.5 kollajen (hücreleştirilmiş tendon) hidrojellerin viskozitelerinin kayma hızı ile değişimi



Şekil 5.18 %5 deri ECM, %5 deri ECM/ %0.5 kollajen (hücreleştirilmiş tendon), %5 deri ECM/ %1 kollajen (hücreleştirilmiş tendon) ve %5 deri ECM/ %1.5 kollajen (hücreleştirilmiş tendon) hidrojenlerin viskozitelerinin kayma hızı ile değişimi (devam)

5.2.6 Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Hücreleştirilmiş deri ECM hidrojenli ile modifiye edilen ve düz PCL doku iskelelerinin kimyasal yapısının incelenmesi ve fonksiyonel grupların belirlenmesi için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir.



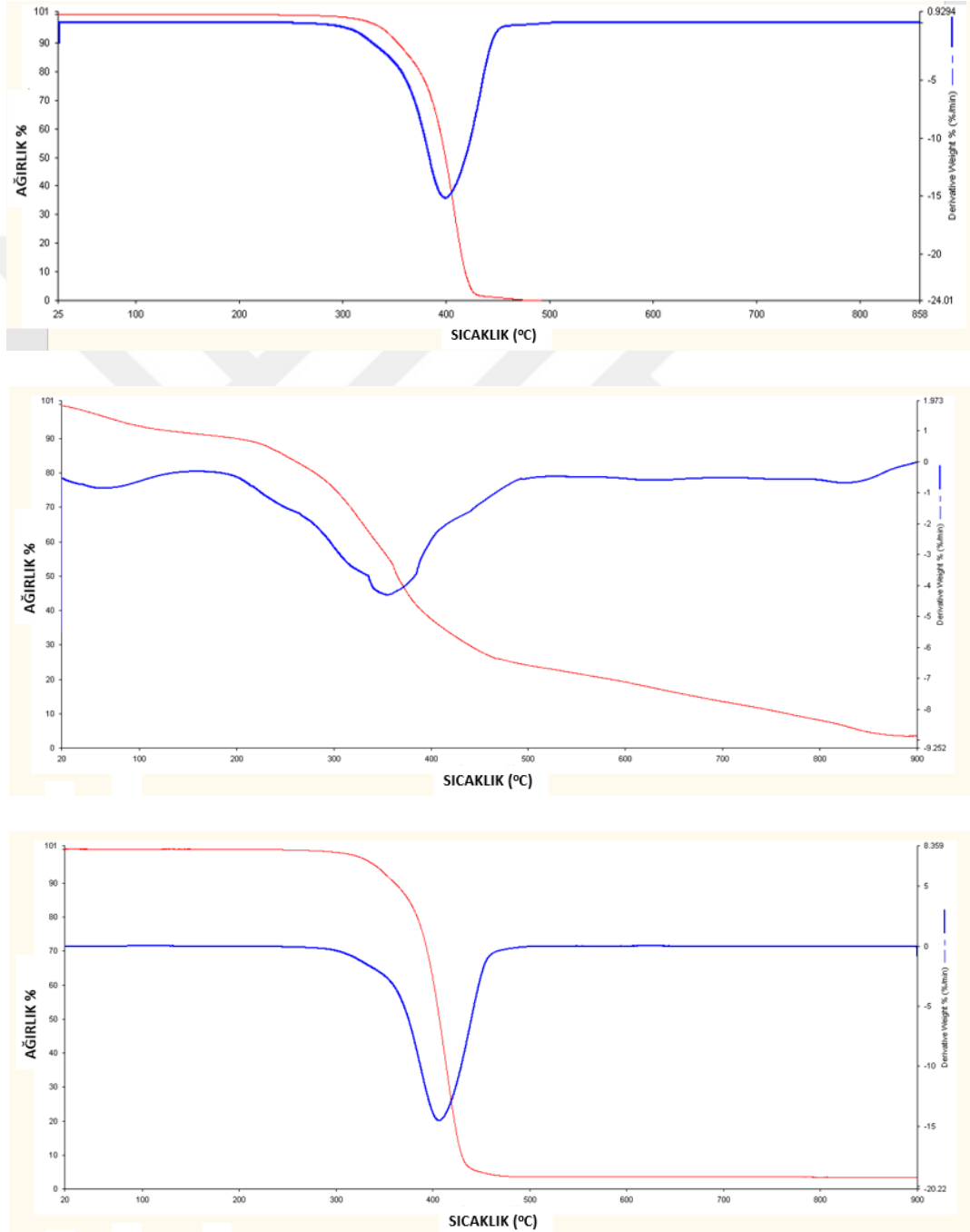
Şekil 5.19 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin FTIR spektrumları

Sonuçlar incelendiğinde, 1176 cm^{-1} dalga boyundaki absorpsiyon bantları PCL polimerinin simetrik C-O-C bantlarına özgüdür. 1722 cm^{-1} dalga boyunda görülen keskin absorbans piki, PCL polimerinin esterleşmesi ile ilişkili oluşan C=O ester bağlarına özgü piklerdir. PCL ve dsECM’de 2941 cm^{-1} dalga boyunda görülen pikler, alifatik yan zincirleri temsil eden C-H absorpsiyon pikleridir. 1630 cm^{-1} dalga boyundaki absorbans pikleri, dsECM (hücreleştirilmiş deri ECM)’deki protein yapısının karakteristik amid I bandının, C=O gerilmesini göstermektedir (Xing vd. 2015).

5.2.7 Termogravimetrik analiz (TGA)

PCL, hücreleştirilmiş deri ECM hidrojel ve sandviç modelli (dsECM-PCL) doku iskelelerinin TGA analizi $25\text{--}800^{\circ}\text{C}$ aralığında ve $10^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ ısıtma hızında, azot ortamında gerçekleştirilmiştir. dsECM hidrojelinde 200°C ’de gözlemlenen kütle kaybı suyun buharlaşması sonucu gerçekleşmiştir. 200°C ile 500°C arasındaki kütle kaybı, dsECM’nin içerdiği kollajen moleküllerin ayrılarak yapının bozunması ile ilişkilendirilmiştir. Son olarak 500°C ve 900°C arasındaki kütle kaybı organik bileşiklerin yanmasını gösterir ve bu sonuçlar genel bir hidrojel termogramına uygun üç fazlı kütle kaybını göstermekle birlikte son durumda kalan dsECM kütlesi $\sim\%2\text{--}3$

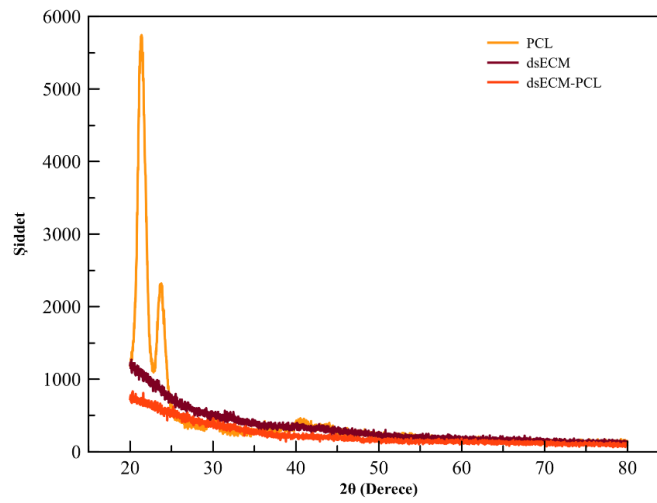
aralığında gözlenmiştir. PCL polimerinde, 390°C-450°C arasında gerçekleşen kütle kaybı PCL'nin bozunmaya uğradığı ile ilişkilendirilmektedir. 496°C de PCL tamamen ayrılmıştır ve bu değerler literatür ile uyumludur (Khan vd. 2009). Ayrıca sandviç modellenli doku iskelesi incelendiğinde, 500°C'de PCL tamamen ayrılmış olup, dsECM'in son durumdaki kütlesi ~%2-3 olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.20 Sırası ile PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin termogram grafikleri

5.2.8 X-ışını kırınım analizi (XRD)

PCL, dsECM ve sandviç modeli (dsECM-PCL) doku iskeleleri, 20-80° tarama aralığı ve 2°/dk tarama hızında olup Şekil XRD’de XRD diyagramı gösterilmektedir. PCL’nin yapısına özgü, 2θ; 21.3 ve 23.7°’deki karakteristik tepe noktaları literatütle desteklenen belirgin kristal fazları gösterirken, dsECM’nin 2θ= 20° görülen tepe noktası, ECM’nin amorf yapısını göstermektedir.



Şekil 5.21 PCL, dsECM ve dsECM-PCL’nin XRD grafiği

5.3 Hücre Kültür Çalışmaları

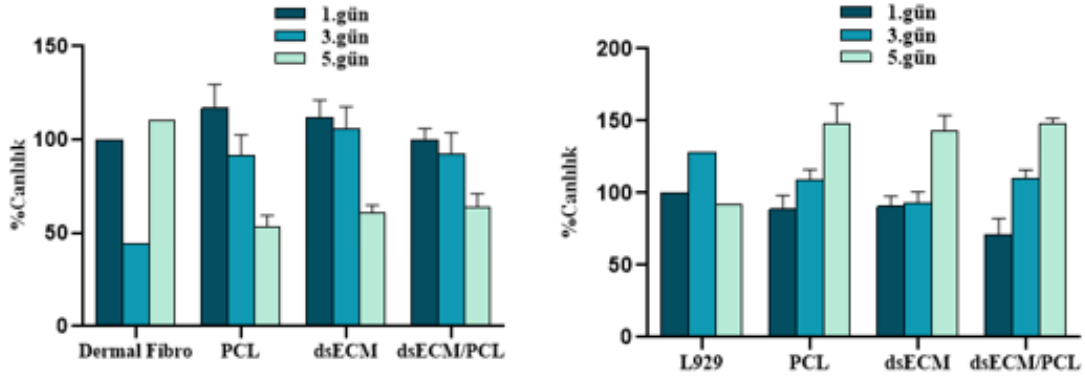
5.3.1 Sitotoksosite testleri

PCL, 3B dsECM ve sandviç modeli (dsECM-PCL) doku iskelelerinin sitotoksosite testleri, insan dermal fibroblast ve L929 fibroblast hücrelerinin kullanımıyla, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile 1,3 ve 5.günlerde, LDH (Laktat dehidrogenaz) testi ile 24 ve 48. saatlerde değerlendirilmiştir.

5.3.1.1 MTT testi

Hüresizleştirme işleminde uygulanan enzimatik ve kimyasal çözeltilerin, dokudan tam anlamıyla uzaklaştırılamaması, hücrelerde toksik etkiye neden olabilmektedir.

MTT sitotoksosite testi için, insan dermal fibroblast ve fare fibroblast (L929) hücre hatları kullanılmış ve 5 gün süren bu testte örnekler, kontrol grubu ile birlikte n=3 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışma kapsamında, MTT elüsyon yöntemi ile malzemedeki toksik bileşenler, inkübe olduğu solusyona geçmiş ve hücreler bu solüsyon ile kültür edilmiştir. Malzemenin biyouyumluluğu şekil 5.14'te gösterilmiş yüzde değerleri, üç tekrarlı grubun ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

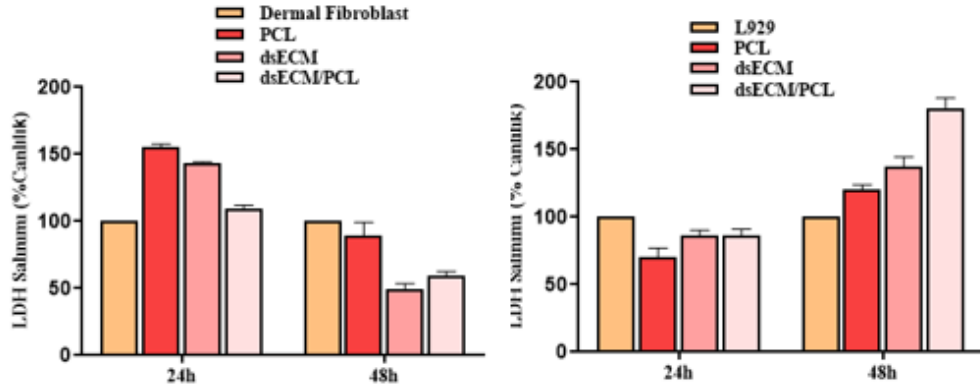


Şekil 5.22 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin insan dermal fibroblast ve L929 hücreleri üzerinde % hücre canlılığı gösteren sütun grafikleri

Dermal fibroblast hücrelerinin canlılıklarını değerlendirmek için 1.günün sonunda yapılan MTT sonuçlarına göre, kontrole kıyasla PCL, dsECM ve dsECM-PCL varlığında hücre canlılığı artışı gözlenirken, 3. ve 5. günlerde yapılan MTT sonuçlarında, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. L929 hücrelerinin tüm doku iskelelerindeki canlılığı değerlendirildiğinde ise, 1., 3., ve 5.günde hücre canlılığının giderek arttığı gözlenmiştir.

5.3.1.2 LDH salınım testi

PCL, dsECM ve dsECM-PCL doku iskelelerinin, 24 ve 48.saatin sonunda ko-kültüre olan sitotoksiteleri, LDH salınım testi yapılarak, kontrol grupları dahil tüm örneklerin n=3 tekrarlı sonuçları incelenmiştir. LDH salınım testi hem insan dermal fibroblast hem de L929 hücreleri ile gerçekleştirilmiştir.

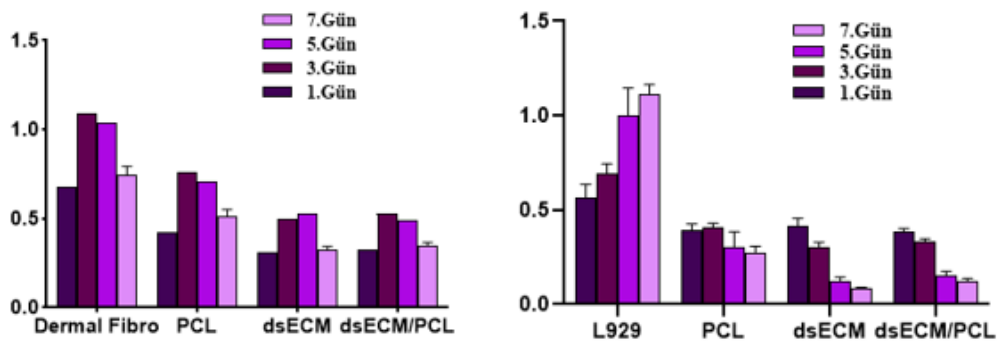


Şekil 5.23 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin insan dermal fibroblast ve L929 hücreleri üzerinde LDH testi ile hücre canlılığı gösteren sütun grafikleri

İnsan dermal fibroblastların LDH salınımı incelendiğinde, tüm örneklerin 24 saatin sonunda iyi bir biyoyumluluğa sahip olduğu görülürken, 48 saatin sonunda hücre canlılıklarında önemli bir düşüş gerçekleşmiştir. L929 fibroblast hücrelerin LDH salınımı incelendiğinde ise, 24 saatin sonunda kontrole kıyasla hücre canlılığı az olsa da 48 saatin sonunda canlılığın etkili bir şekilde arttığı ve doku iskelelerinin hücreler üzerinde, tıpkı MTT sonuçlarında da görüldü gibi, dolaylı olarak bir sitotoksik etki yaratmadığı, biyoyumlu olduğu değerlendirilmiştir.

5.3.2 Hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışları

İnsan dermal fibroblast ve L929 hücrelerinin, n=2 tekrarlı PCL, dsECM ve dsECM-PCL doku iskeleleri üzerinde çoğalma kapasiteleri MTT testi uygulanarak belirli günlerde incelenmiştir.

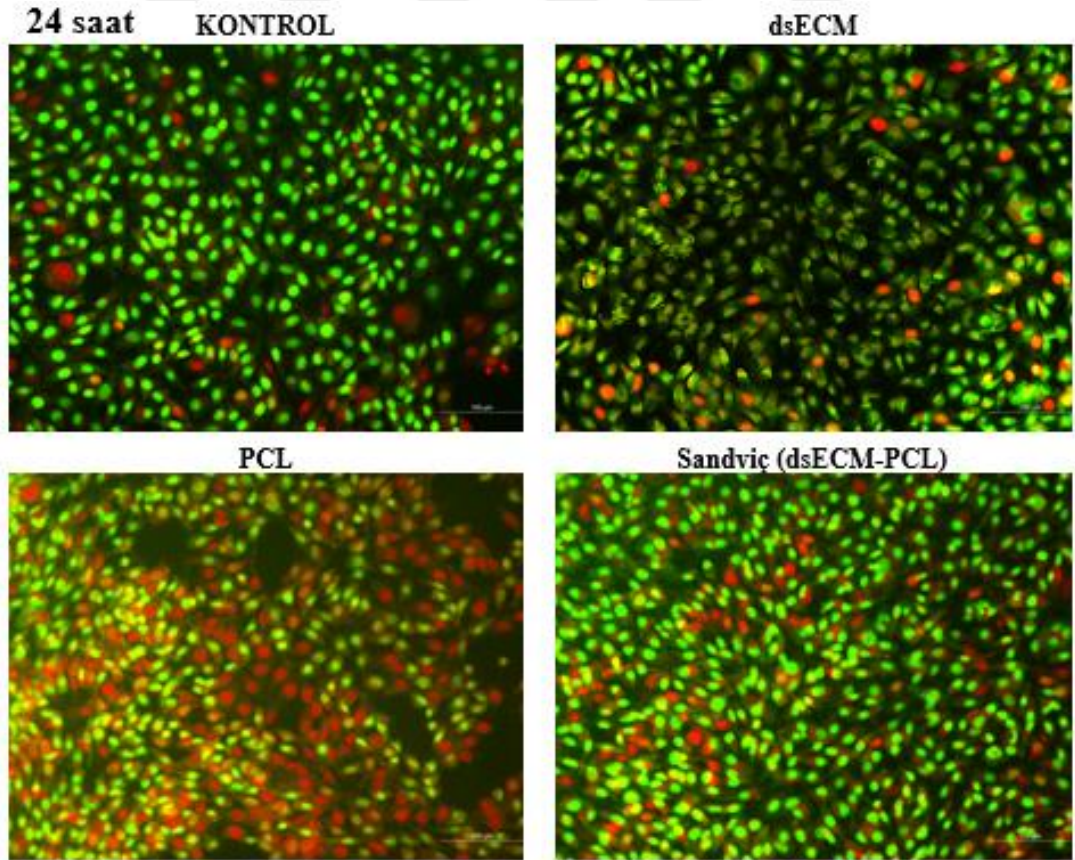


Şekil 5.24 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerin üzerine ekimi yapılan insan dermal fibroblast ve L929 hücrelerin belirli günlerde MTT yöntemi ile belirlenen hücre canlılık oranları

Elde edilen sonuçlara göre, insan dermal fibroblast hücrelerinin 3.güne kadar tüm doku iskeleleri üzerinde çoğaldığı, ancak 7.gün sonunda hücre proliferasyonunda azalma gerçekleştiği gözlenmiştir. Aynı şekilde L929 hücrelerinin, yalnızca PCL doku iskelesi üzerinde 3.güne kadar çoğaldığı, diğer günlerde ise hücre proliferasyonunun tüm doku iskelelerinde azalmaya gittiği gözlenmiştir.

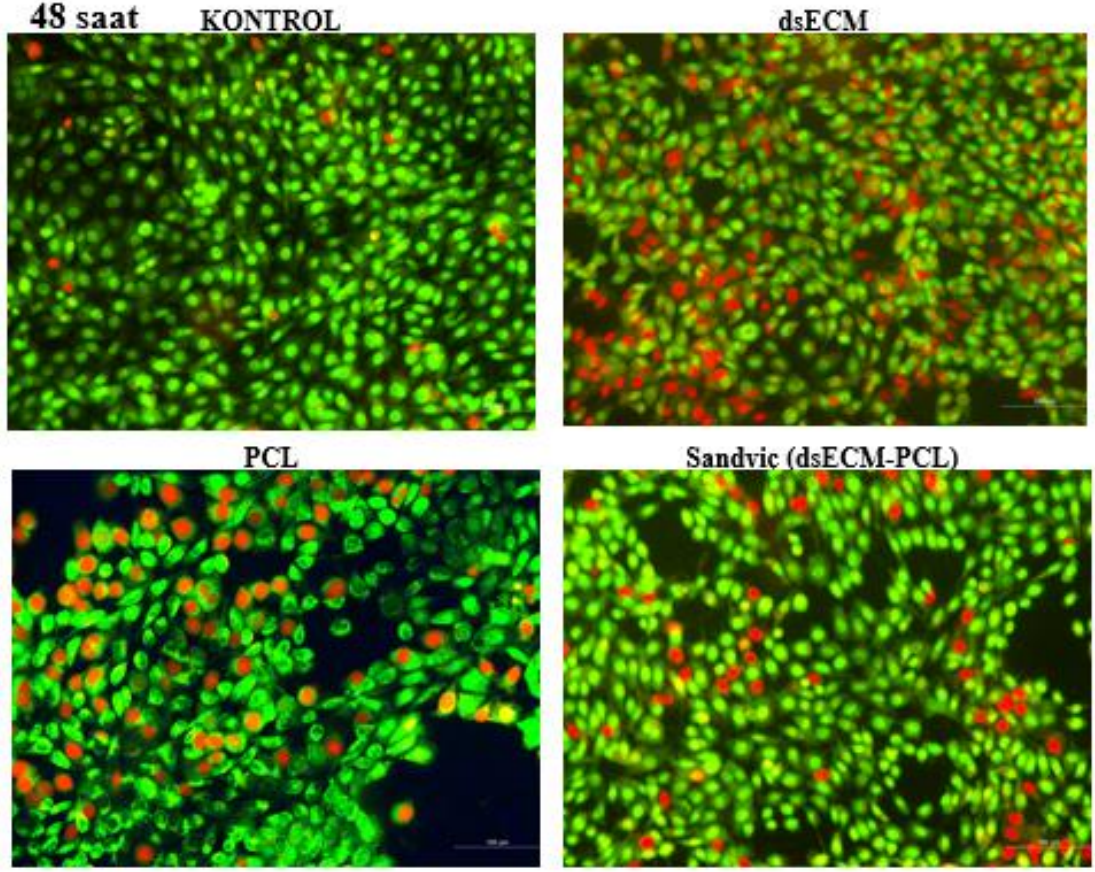
5.3.3 Akridin oranj/propidyum iyodür (AO/PI) ikili boyaması

Akridin oranj/Propidyum iyodür ikili boyaması, apoptozun neden olduğu morfolojik değişimleri göstermek için yapılmıştır. L929 hücreleri 24 ve 48 saat PCL, dsECM ve dsECM-PCL doku iskelelerinin bulunduğu besiyerleri ile muamele edilmiştir. Görüntüler üzerinde yeşil renkli hücreler canlı, kırmızı/turuncu renge sahip hücreler apoptotik ve normal çekirdeğe sahip kırmızı ya da turuncu renkteki hücreler nekroz olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 5.25 L929 hücrelerinin 24 saat kültürden sonra AO/PI boyamasının floresan mikroskop görüntüleri

24 saatlik sonuçlar incelendiğinde, PCL doku iskelesinin hücreler üzerine toksik etki yarattığı ve nekroza uğradığı görülürken, dsECM modifiyeli PCL iskelelerinde PCL'ye nazaran çok daha fazla canlı hücre içerdiği gözlenmiştir. Bu sonuç MTT ve LDH testlerini doğrulamamaktadır.

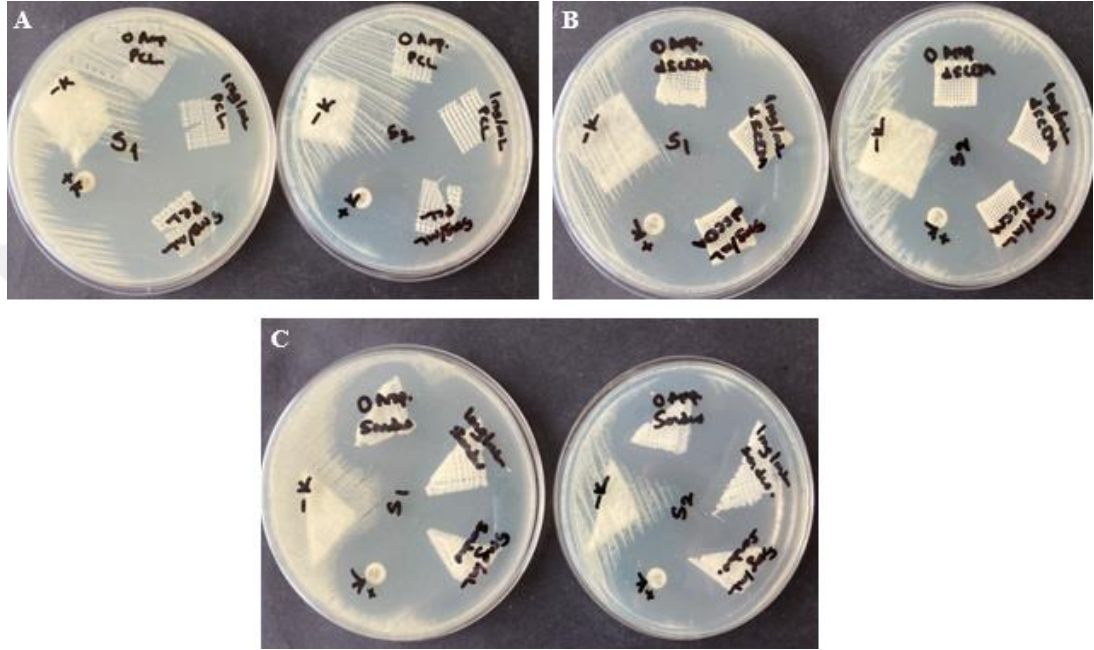


Şekil 5.26 L929 hücrelerinin 48 saat kültürden sonra AO/PI boyamasının floresan mikroskop görüntüleri

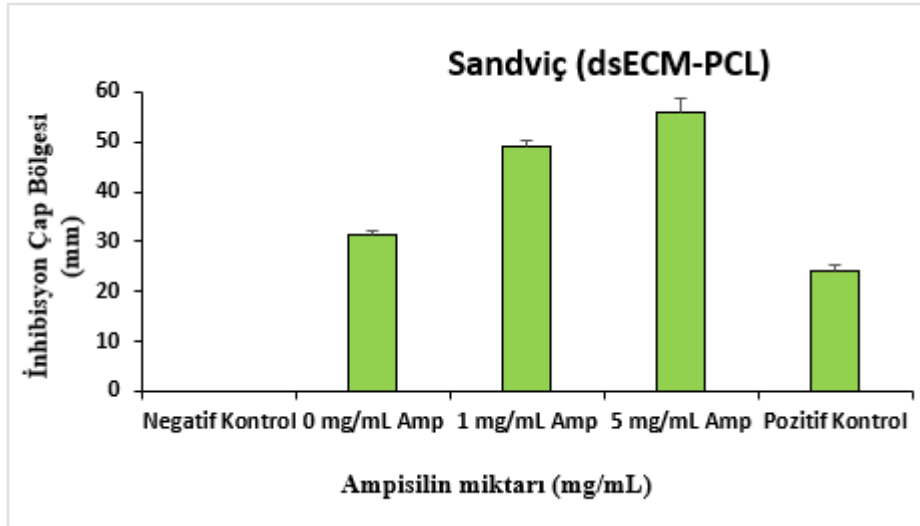
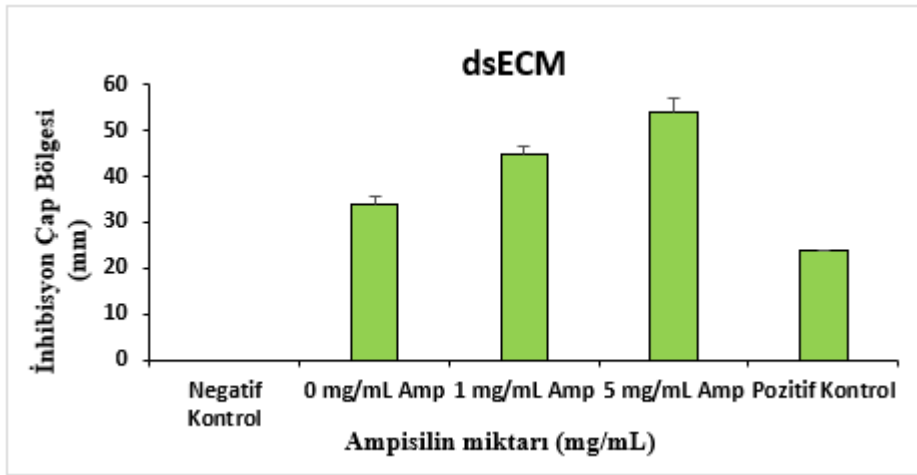
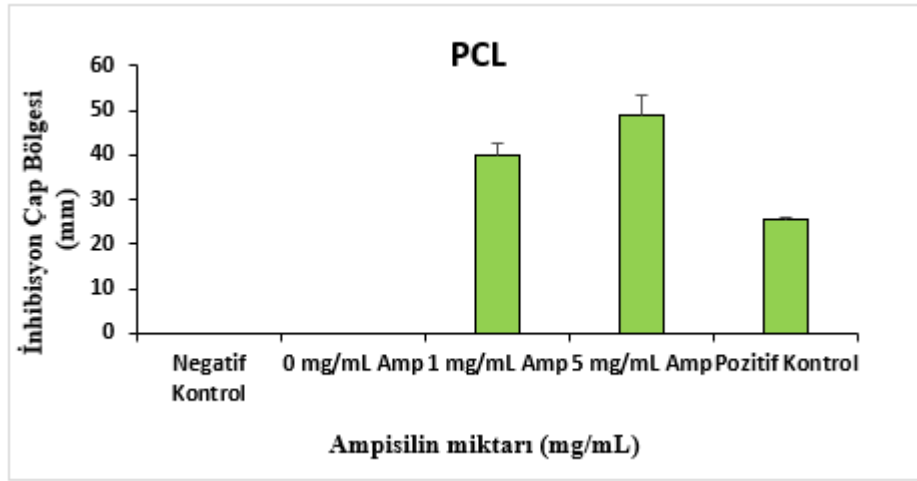
48 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde, hücre canlılığında olumsuz yönde önemli bir değişiklik içermediği, ayrıca hücrelerin aşırı hızlı çoğaldığı ve boyama sırasında yüzeyden kalktığı gözlenmiştir. 48 saatlik sonuçlar nispeten MTT ve LDH test sonuçlarını da desteklemektedir.

5.4 Anti-mikrobiyal Etkinlik Testi Sonuçları

Doku iskelelerinin antimikrobiyal test sonuçları incelenmiş ve şekil 5.19’da gösterilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda, ampisilinin dozunun artmasıyla doku iskelelerinin *S. Epidermidis* türüne karşı antimikrobiyal etkilerinde de artma olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5.27 İlaç yüklü doku iskelelerinin görüntüsü A) PCL, B) dsECM C) Sandviç doku iskelesi



Şekil 5.28 PCL, dsECM ve Sandviç doku iskelelerinin anti-mikrobiyal etkinlik grafikleri

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, 3B yazıcıda basılan hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojel, eriyik elektroyazım tekniği kullanılarak 3B yazdırılmış PCL iskeleleri ile modifiye edilmiş ve deri doku mühendisliğindeki kullanım potansiyeli incelenmiştir.

Deri doku mühendisliğinde, tasarlanan doku iskelelerinin, doku onarımı, hücre büyümesi ve çoğalmasına olan etkisi oldukça önemlidir. Üç boyutlu yazıcılar son dönemlerde doku mühendisliği alanında, kullanımı basit, modellenabilir ve ekonomik olduğu için oldukça alternatif bir olanak sağlamaktadır. Burada elde edilen ideal iskele, uygun gözenek boyutu ve hacmi ve iskelenin mekanik dayanımı ile ilgilidir. Literatürde deri doku mühendisliğinde eriyik elektroyazım (MEW) tekniği kullanarak doku rejenerasyonunu sağlamayı amaçlayan az sayıda çalışma mevcuttur. MEW tekniği ile yazdırılan nano fiber PCL doku iskelelerinin, biyouyumlu, biyobozunur ve esnek yapıya sahip özellikleri nedeniyle deri doku mühendisliğinde kullanım potansiyelinin artabileceğini göstermektedir.

PCL nanofiberlerinin MEW tekniği ile yazdırılması için optimum parametreler, 100°C sıcaklık, 4 kV gerilim, 0.9 bar basınç, 6mm kollektör mesafesi ve 0.20 mm enjektör ucu olarak belirlenmiştir. Uygulanan parametreler dışında, daha düşük sıcaklıkta polimerin erimesi, daha düşük gerilimde yüksek kollektör mesafesinde, jet başlangıcının gerçekleşmemesi ve polimerin enjektör ucundan akması, daha yüksek gerilim ve düşük kollektör mesafesinde ark oluşumu gözlenerek akımın kesilmesi ve böylelikle basımın gerçekleşmediği gözlenmiştir.

Sıçan deri dokuları üzerine, dokudaki hücresel materyallerin uzaklaştırılması ve hücre dışı matris bileşenine mümkün olduğunca az hasar verilmesi amaçlanarak, hücresizleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Deri dokuları parçalara ayrılmamış dokuya kıyasla, ince uzun kesitler haline getirilip hücresizleştirildiğinde, yüzey alanları azaldığı için enzimatik (Trypsin-EDTA) ve kimyasal (Triton x-100) ajanlar dokuya daha fazla işlemiştir. Bu nedenle Triton x-100'ün uzaklaştırılması için yıkama işlemleri 2 gün boyunca distile su sık sık değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. Hücresizleştirmenin etkinliğini görmek amacıyla DNA, GAG ve kollajen miktar analizleri incelenmiştir. Hücresizleştirilmiş deri dokunun DNA miktar analizinin

sonucunda işlem görmemiş dokuya kıyasla DNA miktarında %78.3 kadar azalma meydana gelmiştir. Hücresizleştirilmiş deri dokudaki GAG miktarı kantitatif olarak belirlenmiştir. İşlem görmemiş dokudaki GAG miktarı 0.531 mg /10 mg kuru doku olarak hesaplanırken, hücresizleştirilmiş dokuda bu değer 0,360 mg'dır. Bu sonuçlara göre hücresizleştirilmiş dokudaki GAG miktarının %68 korunduğu belirlenmiştir. Hücresizleştirilmiş dokunun kollajen miktarı (0,7866 mg) incelendiğinde, işlem görmemiş dokuya (0,4877 mg) kıyasla daha fazla kollajen içerdiği görülmüştür. Bu durum, hücresizleştirme sırasında dokudaki kollajen matrisinin zarar görmemesi ve diğer hücresel proteinlerin uzaklaştırılmasından dolayı kollajen miktarının kuru ağırlığın yüzdesi olarak artma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Hücresizleştirilmiş dokudaki DNA kaybı ve kollajen içeriği histoloji çalışmaları ile de desteklenmektedir.

Hücresizleştirilmiş deri dokuların hücre dışı matris yapıları H&E ve Masson Trikrom histolojik boyamaları ile incelenmiş ve işlem görmemiş deri doku ile karşılaştırılmıştır. H&E boyaması değerlendirildiğinde, kullanılan kimyasal ajanların, hücresizleştirilmiş dokunun hücre dışı matrisine neredeyse zarar vermediği ve hücresel materyallerin dokudan uzaklaştırıldığı gözlemlenmiştir. Masson Trikrom boyamasında ise, hücresizleştirilmiş dokunun kollajen içeriğinin, işlem görmemiş doku ile kıyaslandığında neredeyse hiç zarar görmediği belirlenmiş, ayrıca kollajen miktar analizi sonuçlarını da desteklemiştir.

Hücresizleştirilmiş deri ECM'si, hücresizleştirilmiş sıçan kuyruk tendonu içeren asetik asitte jelleştirilmiştir. Jel denemeleri için deri ECM tozu %5 olacak şekilde tartılmış ve üzerine hücresizleştirilmiş tendonlar sırasıyla %0.5, %1 ve %1.5 olacak şekilde eklenmiştir. Hazırlanan çözeltiler (%5 deri ECM, %5 deri ECM/ %0.5 hücresizleştirilmiş tendon, %5 deri ECM/ %1 hücresizleştirilmiş tendon ve %5 deri ECM/ %1.5 hücresizleştirilmiş tendon jelleştikten sonra NaOH ile nötralize edilmiş ve 3B basımı denenmiştir. 3B basım için en uygun hidrojel %5 deri ECM / %1.5 kollajen (hücresizleştirilmiş tendon) olacak şekilde optimize edilmiştir. Sadece deri ECM tozu içeren çözelti nötralizasyon aşamasında aşırı derece akışkan olduğu için basımı alınamamıştır.

3B baskısı alınacak hidrojel için en uygun basım parametreleri, x,y,z boyutu 0,6mm, basınç 37 psi ve enjektör ucu 21G olacak şekilde optimize edilmiştir. 3B baskısı alınan hidrojellerin, çapraz bağlama işlemi EDC/NHS ile gerçekleştirilmiştir. Baskısı alınan hidrojellerin üzeri kaplanana kadar EDC/NHS çözeltisi eklenmiş ve karanlıkta 30dk, 2 saat ve 24 saat bekletilerek çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Belirlenen sürelerde hidrojellerin hepsi çapraz bağlanmış fakat dayanıklılığı açısından çapraz bağlama süresi 24 saat olarak optimize edilmiştir.

Çapraz bağlı 3B deri ECM hidrojel gözenekler arası boşluk olmayacak şekilde %100 baskısı alınmış ve temas açısı ölçümü yapılmıştır. Hidrojin yüzeyine damlatılan suyun temas açısı farklı noktalarda 22,5-36,5° arasında değişmiş ve bu sonuç hidrojin yapısının hidrofilik olduğunu göstermiştir.

Tez kapsamında kullanımı tasarlanan sandviç modellenli doku iskeleleri MEW tekniği ile yazdırılan PCL ve 3B baskısı alınan deri ECM doku iskeleleri ile elde edilmiştir. İki PCL doku iskelesinin arasına daha küçük boyutta baskılanmış 3B deri ECM doku iskelesi koyulmuş ve eritilmiş PCL yardımı ile PCL iskeleler birbirine yapıştırılmıştır.

Sandviç modellenli doku iskelesi ve çapraz bağlı 3B deri ECM doku iskelelerine şişme testi yapılmış ve hidrojin zamana bağlı olarak şişme derecesinin arttığı, sandviç modelinin ise hidrojele kıyasla daha çok su tutma ve şişme kabiliyetine sahip olduğu belirlenmiştir. Doku iskelelerinin su tutma ve şişme kabiliyetleri, vücut sıvılarının emilimi, hücresel yapışma ve besin kaynaklarının taşınması için önemli bir parametredir.

Sandviç modellenli doku iskelesi ve bu doku iskelesini oluşturan PCL ve 3B deri ECM doku iskelelerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Doku iskelelerinin atomik ve moleküler yapılarını incelemek için XRD analizi yapılmış ve PCL'nin yapısındaki kristal fazları gösteren tepe noktaları ve ECM'de görülen tepe noktası piki amorf yapıda olduğunu göstermiş ve bu sonuçlar literatür çalışmaları ile desteklenmiştir. Sıcaklığa bağlı kütle değişimlerinin incelenmesi için TGA analizi gerçekleştirilmiştir. PCL doku iskelesi literatürdeki sonuçları destekleyecek şekilde 500°C'de maksimum bozunma göstermiş, hücresizleştirilmiş deri ECM hidrojinde 200-500°C arasındaki kütle kaybının içerdiği kollajen moleküllerinin ayrılarak yapının bozunmasıyla ilişkilendirilmiştir. Hidrojin TGA analiz sonuçları, literatürdeki genel bir hidrojel

termogramına uygun olup son durumdaki kütlesi ~ %2-3 aralığındadır. Ayrıca sandviç modelli doku iskelesi incelendiğinde, 500°C’de PCL tamamen ayrıışmış olup, dsECM’in son durumdaki kütlesinin ~%2-3 olarak korunduğı belirlenmiştir.

Tez çalışmasının diğr bölümünde, 3B PCL, 3B deri ECM hidrojel ve sandviç modelli doku iskelelerinin iki hücre hattında (insan dermal fibroblast ve fare fibroblast-L929) hücre kültür çalışmaları yapılmış, ilk olarak hücreler üzerindeki sitotoksiteleri MTT ve LDH salınım testi ile incelenmiştir. MTT testi için kontrol grubu dahil tüm örnekler n=3 tekrarlı olacak şekilde 1,3 ve 5.günlerde çalışılmıştır. İnsan dermal fibroblast hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmada tüm doku iskelelerinin dolaylı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermekle birlikte hücrelerin doğrudan çoğalmasına yapısından dolayı izin vermediğı, L929 hücre hattında 5 günün sonunda canlılığın önemli ölçüde artması ile birlikte doku iskelelerinin biyoyumlu olduğı sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda LDH testine bakılacak olursa, insan dermal fibroblast hücrelerinin 24 saatin sonunda hücre canlılığının kontrole kıyasla daha fazla olduğı görülürken, 48 saatin sonunda hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. L929 hücreleri üzerindeki LDH testine bakılacak olursa, 24 saatin sonunda hücre canlılığı kontrole kıyasla daha düşük olsada 48 saatin sonunda yine kontrole kıyasla artan hücre canlılığı gösterdiği ve malzemelerin biyoyumlu olduğı değerlendirilmiştir. Sitotoksikite testlerine genel olarak bakılacak olursa; birbirini desteklemeyen bu sonuçların insan dermal fibroblast hücrelerinin primer yapısından dolayı hücre dayanımının az olduğı bu nedenle malzemelerin hücre canlılığında olumsuz etki gösterebileceğı değerlendirilmektedir.

Hücrelerin doğrudan malzeme üzerindeki etkisinin incelenmesi için 1,3,5 ve 7 gündeki çoğalma davranışları değerlendirilmiştir. Hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra malzeme üzerindeki yapışma davranışı mikroskop altında incelenmiş ve hücrelerin doku iskelesi üzerinde tutunduğı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre, insan dermal fibroblast hücrelerinin 3.güne kadar tüm doku iskeleleri üzerinde çoğalma davranışı sergilemiş fakat, 7.gün sonunda hücre proliferasyonunda azalma gerçekleşmiştir. Benzer şekilde L929 hücrelerinin yalnızca PCL doku iskelesi üzerinde 3.güne kadar çoğaldığı, diğr günlerde ise hücre proliferasyonunun tüm doku iskelelerinde azalmaya gittiğı gözlenmiştir. Hücre kültür çalışmaları için genel bir sonuç çıkarılacak olursa, doku iskelelerinin hücre kültüründe kullanımı öncesinde etkili bir sterilizasyon yöntemi

geliştirilirse, hem sitotoksosite hem de çoğalma davranışlarında olumlu sonuçlar elde edilebilecektir.

Tez çalışmasının son bölümünde, doku iskelelerinin olası antimikrobiyal etkileri temel antimikrobiyal testlerden olan inhibisyon alan incelemesi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Staphylococcus epidermidis* deri florası tarafından önemli bir mikroorganizmadır. Doğrudan potajen olmasa da, bağışık sistemi yetersiz bireylerde ciddi riskler oluşturabilmektedir. Çalışmada doku iskelelerine yüklenmiş amfisilin dozu arttıkça, inhibisyon zonu arttığı gözlemlenmiştir. Sandviç modellenli doku iskelelerinin en çok inhibisyon zonuna yol açtığı değerlendirilmiştir. Ek olarak 3B deri ECM hidrojel ve sandviç doku iskelelerine herhangi bir ilaç yüklenmeden de *Staphylococcus epidermidis* türüne karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgu örneklerin çalışma öncesinde UV-Etil alkol-Penisilin/Streptomisin üçlü sterilizasyonuna tabi tutulduğu dikkate alındığında, dECM yapısının bünyesinde bir ilaç ya da etken maddeyi tutabilmesinin Penisilin/Streptomisin maruziyetinden kaynaklı olduğu, PCL'nin ise dECM gibi Penisilin/Streptomisin'i tutamadığını göstermesi bakımından önemli bir bulgudur. Aynı zamanda dECM yapısının bir ilaç ya da etken maddenin salımına izin verebilmesi, gelecekteki potansiyel çalışmalar açısından önemli bir özelliktir.

Tez kapsamında elde edilen bulgularla geliştirilen 3B deri ECM/PCL iskeleleri ile oluşturulan sandviç modellenli doku iskeleleri, hücre tutunmasına doğrudan katkı sağlamasa da, yara bölgesinde hücrelerin yara ortamına yönelmesini sağlayacak ECM biyosinyalleri içermesi nedeniyle, deri doku mühendisliği için yara örtü malzemesi seçiminde değerlendirilebileceği, bir ilaç ya da etken maddenin salımını destekleyebileceği, bu nedenlerden doğrultusunda kullanım potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adachi, E., Hopkinson, I., Hayashi, T. 1997. Basement-membrane stromal relationships: interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *International Review of Cytology*, 173; 73-156.
- Agarwala, S. 2016. A Perspective on 3D Bioprinting Technology: Present and Future. *American Journal of Engineering and Applied Sciences*, 9(4); 985-990.
- Ahn, Y.C., Par, S.K., Kim, G.T., Hwang, Y.J., Lee, C.G., Shin, H.S., Lee, J.K. 2006. Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers. *Current Applied Physics*, 6; 1030–1035.
- Amaral, M., Lopes, M.A., Silva, R.F., Santos, J.D. 2002. Densification route and mechanical properties of Si₃N₄-bioglass biocomposites. *Biomaterials*, 23(3); 857-862.
- Asthana, A., Tamburrini, R., Chaimov, D., Gazia, C., Walker, S.J., Van Dyke, M., Tomei, A., Lablanche, S., Robertson, J., Opara, E.C., Soker, S., Orlando, G. 2021. Comprehensive characterization of the human pancreatic proteome for bioengineering applications. *Biomaterials*, 270; 120613.
- Bader, A., Schilling, T., Teebken, O.E., Brandes, G., Herden, T. 1998. Tissue engineering of heart valves—human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 14; 279–84.
- Badylak, S. F. 2004. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunol*, 12; 367–77.
- Badylak, S. F., Taylor, D., Uygun, K. 2011. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 13; 27–53.
- Badylak, S.F. 2007. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28; 3587–3593.
- Badylak, S.F., Lantz, G.C., Coffey, A., Geddes, L.A. 1989. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J. Surg. Res.*, 47; 74–80.
- Badylak, S.F., Tullius, R., Kokini, K., Shelbourne, K.D., Klootwyk, T., Voytik, S.L., Kraine, M. R., Simmons, C. 1995. The Use of Xenogeneic Small Intestinal Submucosa as a Biomaterial for Achilles Tendon Repair in a Dog Model. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29; 977–985.
- Barrere, F., Mahmood, T.A., de Groot, K., van Blitterswijk, C.A. 2008. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 59(1); 38-71.
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., Yarmush, M. L. 2011. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *The Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2; 403–30.
- Brown, T. D., Edin, F., Detta, N., Skelton, A. D., Hutmacher, D. W., Dalton, P. D. 2014. Melt electrospinning of poly(ε-caprolactone) scaffolds:

- Phenomenological observations associated with collection and direct writing. *Materials Science and Engineering: C*, 45; 698.
- Castilho, M., Feyen, D., Flandes-Iparraguirre, M., Hochleitner, G., Groll, J., Doevendans, P. A. F., Vermonden, T., Ito, K., Sluijter, J. P. G., Malda, J. 2017. Melt Electrospinning Writing of Poly-Hydroxymethylglycolide-co- ϵ -Caprolactone-Based Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 6(18).
- Catoira, M.C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., Boccafroschi, F. 2019. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science Materials of Medicine*, 30(10); 115.
- Chapekar, M. S. 2000. Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53; 617–620.
- Chen, F.M. ve Liu, X.H. 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 53; 86–168.
- Chen, R.N., Ho, H.O., Tsai, Y.T., Sheu, M.T. 2004. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*, 25; 2679–86.
- Conklin, B.S., Richter, E.R., Kreutziger, K.L., Zhong, D.S., Chen, C. 2002. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med. Eng. Phys.*, 24; 173–83.
- Cui, X., Boland, T., D'Lima, D. D., Lotz, M. K. 2012. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 6(2); 149-155.
- Dahl, S.L., Koh, J., Prabhakar, V., Niklason, L.E. 2003. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*, 12; 659–66.
- Dalton, P. 2017. Melt electrowriting with additive manufacturing principles. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2; 49–57.
- Dalton, P. D., Luxenhofer, R., Florczak, S., Lorson, T., Zheng, T., Mrlik, M., Hutmacher, D. W., Higgins, M. J. 2019. Melt electrowriting of electroactive poly(vinylidene difluoride) fibers. *Polymer International*, 68(4); 735-745.
- Dalton, P., Kade, J.C. 2021. Polymers for Melt Electrowriting. *Advanced Healthcare Mater*, 10.
- Dehghani, F. ve Annabi, N. 2011. Engineering porous scaffolds using gas-based techniques. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(5); 661-666.
- Faulk, D.M. ve Badylak, S.F. 2014. Natural biomaterials for regenerative medicine applications. *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*, 101-112.
- Freyman, T. 2005. Decellularized bone marrow extracellular matrix. US7326571B2.
- Freytes, D.O., Badylak, S.F., Webster, T.J., Geddes, L.A., Rundell, A.E. 2004. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, 25; 2353–61.

- Gamba, P.G., Conconi, M.T., Piccolo, R. Lo., Zara, G., Spinazzi, R., Parnigotto, P.P. 2002. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatr Surg Int*, 18; 327–31.
- Gilbert, T. W. 2012. Strategies for Tissue and Organ Decellularization. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113; 2217–2222.
- Gilbert, T.W., Stolz, D.B., Biancaniello, F., Simmons-Byrd, A., Badylak, S.F. 2005. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26; 1431–35.
- Grauss, R.W., Hazekamp, M.G., Oppenhuizen, F., Van Munsteren, C.J., Gittenberger-de Groot, A.C., DeRuiter, M.C. 2005. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*, 27; 566–71.
- Groll, J., Hochleitner, G., Hümmer, J. F., Luxenhofer, R. 2014. High definition fibrous poly(2-ethyl-2-oxazoline) scaffolds through melt electrospinning writing. *Polymer*, 55(20); 5017-5023.
- Gulati, A.K. 1988. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg*, 68; 117–23.
- Han, T., Reneke, D. H., Yarin, A. L. 2007. Buckling of jets in electrospinning. *Polymer*, 48; 6064.
- Henkel, J., Schantz, J. T., Hutmacher, D. W. 2013. Computer aided design of scaffolds for bone tissue engineering. *Osteologie*, 22; 180.
- Hewitt, E., Mros, S., McConnell, M., D Cabral, J., Ali, A. 2019. Melt-electrowriting with novel milk protein/PCL biomaterials for skin regeneration. *Biomedical Materials*. 14(5); 055013.
- Hinderer, S., Layland, S.L., Schenke-Layland, K. 2016. ECM and ECM-like materials - Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97; 260–269.
- Hoshiba, T., Lu, H., Kawazoe, N., Chen, G. 2010. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(12); 1717-28.
- Hudson, T.W., Liu, S.Y., Schmidt, C.E. 2004. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng*, 10; 1346–58.
- Hutmacher, D. W., Ivanovski, S., Bartnikowski, M., Dargaville, T. R. 2019. Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment. *Progress in Polymer Science*, 96; 1-20.
- Jackson, D.W., Grood, E.S., Arnoczky, S.P., Butler, D.L., Simon, T.M. 1987. Cruciate reconstruction using freeze dried anterior cruciate ligament allograft and a ligament augmentation device (LAD). An experimental study in a goat model. *Am J Sports Med*, 15; 528–38.
- Johnson, T., Bahrapourian, R., Patel, A., Mequanint, K. 2010. Fabrication of highly porous tissue-engineering scaffolds using selective spherical porogens. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 20(2); 107-118.
- Jorgensen, A. M., Chou, Z., Gillispie, G., Lee, S. J., J Yoo, J., Soker, S., Atala, A. 2020. Decellularized Skin Extracellular Matrix (dsECM) Improves the

- Physical and Biological Properties of Fibrinogen Hydrogel for Skin Bioprinting Applications. *Nanomaterials*, 10(8); 1484.
- Kamalvand, M., Biazar, E., Joupari, M. D., Montazer, F., Tavirani, M. R., Keshel, S. H. 2021. Design of a decellularized fish skin as a biological scaffold for skin tissue regeneration. *Tissue and Cell* 71; 101509.
- Khan, R. A., Parsons, A.J., Jones, I.A., Walker, G.S., Rudd, C.D. 2009. Preparation and Characterization of Phosphate Glass Fibers and Fabrication of Poly(caprolactone) Matrix Resorbable Composites. *J. Reinf. Plast. Compos.*, 29,12.
- Khoshnood, N. ve Zamanian, A. 2020. Decellularized extracellular matrix bioinks and their application in skin tissue engineering. *Bioprinting*, 20.
- Kim, B. S., Kwon, Y. W., Kong, J. S., Park, G. T., Gao, G., Han, W., Kim, M. B., Lee, H., Kim, J. H., Cho, D. W. 2018. 3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: A step towards advanced skin tissue engineering. *Biomaterials*, 168; 38-53.
- Kim, B.S., Kwon, Y.W., Kong, J.S., Park, G.T., Gao, G., Han, W., Kim, M.B., Lee, H., Kim, J.H., Cho, D.W. 2018. 3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: a step towards advanced skin tissue engineering. *Biomaterials*, 168; 38–53.
- Kim, K., Yeatts, A., Dean, D., Fisher, J. P. 2010. Stereolithographic bone scaffold design parameters: osteogenic differentiation and signal expression. *Tissue Engineering Part B Review*, 16(5); 523-39.
- Koch, L., Gruene, M., Unger, C., Chichkov, B. 2013. Laser Assisted Cell Printing. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(1); 91-97.
- Koç, B., Afghah, F., Iyison, N. B., Nadernezhad, A., Midi, A., Sen, O., Okan, B. S., Culha, M. 2022. 3D Fiber Reinforced Hydrogel Scaffolds by Melt Electrowriting and Gel Casting as a Hybrid Design for Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, 11(11); 2102068.
- Li, J., Chen, M., Fan, X., Zhou, H. 2016. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. *Journal of Translational Medicine*, 14; 271.
- Lian, H. ve Meng, Z. 2017. Meltelectrospinning vs. solution electrospinning: A comparative study of drug-loaded poly(ϵ -caprolactone) fibres. *Materials Science and Engineering: C*, 74; 117-123.
- Lloyd, A.W. 2001. Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. *Medical device Technology*, 13(1); 18-21.
- Loh, Q.L. ve Choong, C. 2013. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 19(6); 485-502.
- Luxenhofer, R., Dalton, P. D., Nahm, D., Weigl, F., Schaefer, N., Sancho, A., Frank, A., Groll, J., Villmann, C., Schmidt, H.W. 2020. A versatile biomaterial ink platform for the melt electrowriting of chemically-crosslinked hydrogels. *Materials Horizons*, 7; 928.

- MacNeil, S. 2007. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445; 874–880.
- Mishra, N. C. ve Gupta, S. K. 2017. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. *Methods in Molecular Biology book series, (MIMB, volume 1577)*.
- Nelson, C.M. ve Bissell, M.J. 2006. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: Tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22; 287–309.
- O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V., Gibson, L.J. 2005. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 26(4); 433–441.
- Ott, H.C., Clippinger, B., Conrad, C., Schuetz, C., Pomerantseva, I., Ikonomidou, L., Kotton, D., Vacanti, J.P. 2010. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nature Medicine*, 16; 927–933.
- Ott, H.C., Matthiesen, T.S., Goh, S. K., Black, L.D., Kren, S.M., Netoff, T.I., Taylor, D. A. 2008. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 14; 213–221.
- Ozbolat, I.T. ve Hospodiuk, M. 2016. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, 76; 321–343.
- Pati, F., Bera, A. K., Sriya, Y. 2022. Formulation of Dermal Tissue Matrix Bioink by a Facile Decellularization Method and Process Optimization for 3D Bioprinting toward Translation Research. *Macromolecular Bioscience*, 22(8); 2200109.
- Pati, F., Jang, J., Ha, D.H., Won Kim, S., Rhie, J.W., Shim, J.H., Kim, D.H., Cho, D.W. 2014. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nature Communications*, 5; 3935.
- Pereira dos Santos, E., Nicácio, P. H. M., Barbosa, F. C., Nunes da Silva, H., Andrade, A. L. S., Fook, M. V. L., Maria de Lima Silva, S., Leite, I. F. 2019. Chitosan/Essential Oils Formulations for Potential Use as Wound Dressing: Physical and Antimicrobial Properties. *Materials*, 12(14); 2223.
- Pereira, R.F., Sousa, A., Barrias, C.C., Bayat, A., Granja, P.L., Bartolo, P.J. 2017. Advances in bioprinted cell-laden hydrogels for skin tissue engineering. *Biomanufacturing*, Rev 2.
- Ponec, M. 2002. Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 54; (Suppl 1) S19–S30.
- Ramaswamy, A.K., Vorp, D.A., Weinbaum, J.S. 2019. Functional Vascular Tissue Engineering Inspired by Matricellular Proteins. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6; 74.
- Roberts, T.S., Drez, Jr. D., McCarthy, W., Paine, R. 1991. Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone–patellar tendon–bone allografts. Two year results in thirty-six patients. *Am J Sports Med*, 19; 35–41.
- Saunders, R.E. ve Derby, B. 2014. Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: bioprinting. *International Materials Reviews*, 59; 430–448.

- Schenke-Layland, K., Vasilevski, O., Opitz, F., Konig, K., Riemann, I., Halbhuber, K.J., Wahlers, Th., Stocka, U.A. 2003. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *Journal of Structural Biology*, 143; 201–208.
- Seddon, A.M., Curnow, P., Booth, P.J. 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 1666; 105–17.
- Sobhanian, P., Khorram, M., Hashemi, S.S., Mohammadi, A. 2019. Development of nanofibrous collagen-grafted poly (vinyl alcohol)/gelatin/alginate scaffolds as potential skin substitute, *Int. J. Biol. Macromol*, 130; 977–987.
- Song, J.J. ve Ott, H.C. 2011. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Molecular Medicine*, 17; 424–432.
- Song, J.J., Guyette, J.P., Gilpin, S.E., Gonzalez, G., Vacanti, J.P., Ott, H.C. 2013. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nature Medicine*, 19; 646–651.
- Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., Li, B., Shu, W. 2018. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 3; 278-314.
- Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M.L., Guzzardi, M.A., Shulman, C., Milwid, J., Kobayashi, N., Tilles, A., Berthiaume, F., Hertl, M., Nahmias, Y., Yarmush, M. L., Uygun, K. 2010. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature Medicine*, 16; 814–820.
- Wainwright, D.J. 1995. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns*, 21; 243–8.
- Whang, K., Thomas, C.H., Healy, K.E., Nuber, G. 1995. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer*, 36(4); 837-842.
- Williams, J. M., Adewunmi, A., Schek, R. M., Flanagan, C. L., Krebsbach, P. H., Feinberg, S.E., Hollister, S. J., Das, S. 2005. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, 26(23); 4817-4827.
- Woods, T. Ve Gratzner, P.F. 2005. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament– bone graft. *Biomaterials*, 26; 7339–49.
- Xia, Y., Zhou, P., Cheng, X., Xie, Y., Liang, C., Li, C., Xu, S. 2013. Selective laser sintering fabrication of nano-hydroxyapatite/ poly-ε-caprolactone scaffolds for bone tissue engineering applications. *International Journal of Nanomed*, 8; 4197-4213.
- Xing, Q., Zhang, L., Redman, T., Qi, S., Zhao, F. 2015. Nitric oxide regulates cell behavior on an interactive cell-derived extracellular matrix scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part: A*, 103(12); 3807–3814.
- Yoo, J.J., Meng, J., Oberpenning, F., Atala, A. 1998. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology*, 51; 221–5.

Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C., Teoh, S. H. 2002. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(4); 1169-1185.

Zhang, X., Chen, X., Hong, H., Hu, R., Liu, J., Liu, C. 2022. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioactive Materials*, 10; 15–31.

2009

