

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**3B BİYOBASKILAMA ile DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ:
İSKELET KASI DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK UYGULAMALAR**

Fahriye Şeyda GÖKYER

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Fahriye Şeyda GÖKYER tarafından hazırlanan “3B Biyobaskılama ile Doku İskelelerinin Geliştirilmesi: İskelet Kası Doku Mühendisliğine Yönelik Uygulamalar” adlı tez çalışması 12/03/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

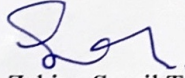
Danışman : Doç. Dr. Ayşe Karakeçili
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı



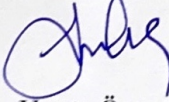
Eş Danışman : Doç. Dr. Pınar Yılğör Huri
Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı



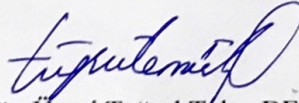
Jüri Üyeleri :



Başkan : Prof. Dr. Zekiye Serpil TAKAÇ
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Urartu Özgür Şafak ŞEKER
Bilkent Üniversitesi Malzeme ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ
Erciyes Üniversitesi Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı

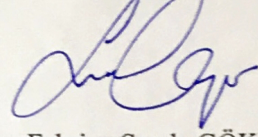
Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

12/03/2020



Fahriye Şeyda GÖKYER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

3B BİYOBASKILAMA ile DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ: İSKELET KASI DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK UYGULAMALAR

Fahriye Şeyda GÖKYER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ
Eş Danışman: Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ

İskelet kası dokusu bir hasar sonrası kendini yenileme potansiyeline sahip olmasına karşın, büyük hacimli kas kayıplarında bu potansiyel sınırlı kalmaktadır. Kas rejenerasyonunu sağlayan etkin bir ilaç tedavisi bulunmadığından ve kullanılabilecek otolog kas fleplerinin miktarı yetersiz olduğundan, büyük hacimli kas kaybı yaşanan vakaların tedavisinde fonksiyonel doku eşleniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Doku mühendisliği, bu eşleniklerin üretiminde önemli bir alternatif yöntemdir. Yöntemde kullanılan en önemli yaklaşımlardan biri, geliştirilecek dokunun üç boyutlu (3B) yapısının taklit edilmesidir. 3B baskılama, doku mühendisliği yöntemiyle iskelet kası dokusu üretiminde, dokunun paralel yönlenmiş fiberlerden oluşan yapısının taklit edilmesi için kullanılabilecek bir teknolojidir.

3B baskılama ile iskelet kası gibi yumuşak ve elastik dokuların üretiminde karşılaşılan en önemli zorluklardan biri, kullanılabilecek biyomalzeme seçeneklerinin kısıtlı olmasıdır. Bu tez çalışması kapsamında, yapısal ve fizyolojik olarak kas mikroçevresinin taklit edilmesi amacıyla özgün sentetik biyomalzemelerin geliştirilmesi ve bunların 3B biyoyazıcıda kullanımı ile iskelet kası dokusu üretimi amaçlanmıştır. Çalışmada, (1) özgün, biyouyumlu ve biyobozunur elastomerik poliüretan ve poliüretan-üre sentezlenmesi ve karakterizasyonu, (2) *in vitro* ortamda kas hücrelerinin 3B baskılanmış doku iskelesi yapısına tutunma, çoğalma ve yönlenmelerinin gösterilmesi, (3) *in vivo* ortamda otolog hücre ekilmiş doku iskelelerinin implant edildikleri defekt bölgesinde kas rejenerasyonuna etkisinin araştırılmasına odaklanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen 3B doku iskelelerinin *in vitro* ve *in vivo* ortamda iskelet kası doku mühendisliğinde kullanıma yönelik önemli potansiyelini ortaya koymuştur. Doku iskeleleri üzerinde çoğalan ve yönlenen kas hücreleri, kas defekti bölgesinde yeni miyoblast oluşumuna katkı sunmuştur.

Mart 2020, 104 sayfa

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği, Biyomalzeme, 3B biyobaskılama, Sentetik biyobozunur polimer, İskelet kası, Poliüretan, *in vitro* çalışma, *in vivo* çalışma.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

3D BIOPRINTING IN TISSUE ENGINEERING: APPLICATIONS FOR SKELETAL MUSCLE TISSUE ENGINEERING

Fahriye Şeyda GÖKYER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ
Co-Supervisor: Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ

Skeletal muscle tissue has self-renewal potential after trauma and loss of structural integrity. However, this potential remains limited in the case of volumetric muscle loss. Since there is no effective drug treatment for skeletal muscle regeneration and autologous muscle flaps are insufficient in quantity; functional skeletal muscle substitutes are needed in the treatment of volumetric of muscle loss. Tissue engineering is a promising approach for the development of these functional substitutes. One of the most important approaches in this principle is to mimic the 3D extracellular matrix structure of the tissue to be developed. 3D printing represents an important advancement to produce engineered functional muscle substitutes with the potential to recapitulate the complex structural organization of skeletal muscle.

In skeletal muscle tissue engineering applications, one of the most important challenges is the availability of suitable elastic, biodegradable and durable materials for scaffold production. The purpose of this thesis study is to develop scaffolds that can structurally and physiologically mimic the skeletal muscle tissue microenvironment by the use of 3D printing technology. In this thesis we focus on, (1) synthesis and characterization of novel, biocompatible and biodegradable, elastomeric polyurethane and polyurethaneurea polymers, (2) demonstrating the the adhesion, proliferation and alignment of muscle cells on 3D printed scaffolds produced using these polymers, and (3) the investigation of the effect of autologous cell-laden scaffolds on the regeneration of muscle defects on a rat tibialis anterior defect model. The results obtained in this study revealed the significant potential of the developed 3D scaffolds for use as skeletal muscle substitutes both in vitro and in vivo. The muscle cells that proliferate and align on the 3D scaffolds have contributed to the formation of new myoblasts in the muscle defect region.

March 2020, 104 pages

Key Words: Tissue engineering, Biomaterial, 3D bioprinting, Synthetic biodegradable polymer, Skeletal muscle, Polyurethane, in vitro, in vivo.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve destek olan değerli danışmanım sayın Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tezim boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan ve sağladığı altyapı imkanları ile laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan eş danışmanım Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ'ye derin teşekkür ve saygılarımı sunarım. Bu süreçte bilimsel becerilerimi geliştirmek için harcadığı zaman, çaba ve sabır için minnettarım.

Tezim boyunca polimer sentezi ile ilgili bilgi, birikim ve altyapı imkanları sağlayan Emel YILGÖR ve Prof. Dr. İskender YILGÖR'e (Koç Üniversitesi) sonsuz minnetlerimi ve saygılarımı sunarım.

Prof. Dr. Çağdaş OTO ve Öğr. Gör. Dr. Yanad ABOU MONSEF'e (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi) bu tezin in vivo kısmını mümkün kıldıkları için teşekkürlerimi sunarım.

İmmun uyumluluk incelenmesi çalışmalarını mümkün kıldıkları için Engin VRANA (Spartha Medical) ve Emine BERBER'e (Strazburg Üniversitesi) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar arkadaşım Emre ERGENE'ye değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaştığı ve tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemediği için teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca dostluğu ve destekleri için Özge TOPRAK'a teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, değerli laboratuvar arkadaşlarım Ebru TALAK, Mervesu GÖKYÜREK, Meriç GÖKER ve Abdullah EYİDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu çalışma ve hayatım boyunca anlayışları, sevgileri ve destekleri için değerli ailem Hacer GÖKYER ve Selçuk GÖKYER'e kalbimin derinliklerinden teşekkür ediyorum. Her zaman desteğini eksik etmeyen, bana yol gösteren ve sonsuz sevgisini eksik etmeyen ablam Seda GÖKYER'e teşekkür ediyorum. Tezimi babam Selcuk Gökyer'e ithaf ediyorum.

Fahriye Şeyda GÖKYER

Ankara, Mart 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 İskelet Kas Dokusunun Yapısı ve Rejenerasyonunda Kullanılan Klinik Yaklaşımlar	3
2.2 Doku Mühendisliği	4
2.3 Doku İskeleleri ve Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler	8
2.3.1 Doğal polimerler	8
2.3.2 Sentetik polimerler	9
2.3.2.1 Poliüretan	9
2.4 Doku İskelesi Üretim Metotları	12
2.4.1 3B biyoyazıcılar	13
2.5 İskelet Kas Dokusu Yenilenmesinde Doku Mühendisliği Yaklaşımları	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1 Materyal	21
3.2 Yöntem	24
3.2.1 Poliüretan ve Poliüretan-Üre sentezi	24
3.2.2 Polimer Karakterizasyonu	25
3.2.2.1 Kimyasal karakterizasyon	25
3.2.2.2 Isıl özelliklerin karakterizasyonu	25
3.2.3 Doku iskelesi üretimi	26
3.2.4 Doku iskelelerinin yapısal karakterizasyonu	29
3.2.4.1 Biyobozunma davranışının incelenmesi	30
3.2.5 Doku iskelelerinin mekanik karakterizasyonu	30
3.2.6 <i>in vitro</i> çalışmalar	32
3.2.6.1 Sitotoksikite testi	32
3.2.6.2 Doku iskelelerinde immün uyumluluk incelenmesi	35
3.2.6.3 C2C12 hücreleri kültürü	36
3.2.6.4 ASC hücrelerinin izolasyonu ve kültürü	36
3.2.6.5 Doku iskeleleri üzerine hücre ekimi	37
3.2.6.6 Alamar Blue testi	39
3.2.6.7 Phalloidin/DAPI boyaması	40
3.2.6.8 Taramalı elektron mikroskopi incelemesi	40
3.2.7 <i>in vivo</i> çalışmalar	41
3.2.7.1 İmplantasyon	41
3.2.7.2 Yürüme testi	43
3.2.7.3 Histopatolojik değerlendirme	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	46

4.1 Poliüretan ve Poliüretan-Üre Sentezi Bulguları	46
4.2 Polimer Karakterizasyon Bulguları	48
4.2.1 Kimyasal karakterizasyon bulguları	48
4.2.2 Isıl özelliklerin karakterizasyon bulguları	52
4.3 Doku İskelesi Üretim Optimizasyonu	55
4.4 Doku İskelelerinin Yapısal Karakterizasyon Bulguları	59
4.4.1 Biyobozunma bulguları	60
4.5 Doku İskelelerinin Mekanik Karakterizasyon Bulguları	64
4.6 <i>in vitro</i> Çalışmalar	67
4.6.1 Sitotoksikite testi sonuçları	67
4.6.2 Doku iskelelerinde immün uyumluluk incelemesi sonuçları	71
4.6.3 Doku iskelelerinin <i>in vitro</i> değerlendirme sonuçları	75
4.7 <i>in vivo</i> Çalışmalar	80
4.7.1 Yürüme testi bulguları	80
4.7.2 Histopatolojik değerlendirme bulguları	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	88
5.1 Tartışma	88
5.1.1 Doku iskelesi üretim sonuçlarının değerlendirilmesi	88
5.1.2 Biyobozunma bulgularının değerlendirilmesi	89
5.1.3 Doku iskelelerinin mekanik karakterizasyon bulgularının değerlendirilmesi	90
5.1.4 <i>in vitro</i> çalışma bulgularının değerlendirilmesi	91
5.1.4.1 Doku iskelelerinin hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi	91
5.1.5 <i>in vivo</i> çalışma bulgularının değerlendirilmesi	92
5.1.5.1 Yürüme testi bulgularının değerlendirilmesi	92
5.1.5.2 Histopatolojik değerlendirme bulgularının değerlendirilmesi	92
5.2 Sonuç	93
KAYNAKLAR	95
EKLER	100
EK 1 Alamar Blue Testi için L929 Hücreleri ile Oluşturulan Kalibrasyon Eğrisi	100
EK 2 Alamar Blue Testi için THP-1 Hücreleri ile Oluşturulan Kalibrasyon Eğrisi	100
EK 3 Alamar Blue Testi için C2C12 Hücreleri ile Oluşturulan Kalibrasyon Eğrisi	101
EK 4 Etik Kurul Onayı	102
ÖZGEÇMİŞ	103

KISALTMALAR DİZİNİ

ASC	Yağ kaynaklı kök hücre (Adipose-derived stem cell)
BSA	Sığır serum albümini (Bovine serum albumin)
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
EIT	Hayvanın ikinci-dördüncü ayak parmakları arası ayak izi mesafesi
EPL	Hayvanın topuk-üçüncü ayak parmağı arası ayak izi mesafesi
ETS	Hayvanın birinci-beşinci ayak parmakları arası ayak izi mesafesi
FBS	Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
FTIR	Fourier dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektroskopi
HDI	1,6-heksametilen diizosiyanat
IPA	İzopropil alkol
NIT	Hayvanın sabit koşulda ikinci-dördüncü ayak parmakları arası ayak izi mesafesi
NPL	Hayvanın sabit koşulda topuk-üçüncü ayak parmakları arası ayak izi mesafesi
NTS	Hayvanın sabit koşulda birinci-beşinci ayak parmakları arası ayak izi mesafesi
P/S	Penisilin/Streptomisin
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCL	Poli(ε-kaprolakton)
PEO	Polietilenoksit
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-etansülfonik asit)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TCP	Hücre kültürü plastiği (Tissue culture plastic)
TGA	Termogravimetrik analiz
THF	Tetrahidrofur
TPU	Termoplastik poliüretan
TPUU	Termoplastik poliüretan-üre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İskelet kası yapısının şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2 (a-b) Atala vd. tarafından geliştirilen idrar kesesi. a) laboratuvar ortamında geliştirilen idrar kesesi, b) geliştirilen idrar kesesi fibrin yapıştırıcı ve omentum ile kaplanmıştır (Atala vd. 2006). (c-d) Macchiarini vd. tarafından geliştirilmiştir (Macchiarini vd. 2008)	6
Şekil 2.3 Doku mühendisliği yönteminin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.4 a) Reçine tabanlı 3B yazıcılar (Lorenzo ve Burdick 2018, Provaggi ve Kalaskar 2017), b) Toz tabanlı 3B yazıcılar (Lorenzo ve Burdick 2018, Provaggi ve Kalaskar 2017), c) Ekstrüzyon tabanlı 3B yazıcılar (Lorenzo ve Burdick 2018, Temple vd. 2014), d) Damlacık tabanlı 3B yazıcılar (Lorenzo ve Burdick 2018, Gurkan vd. 2019).....	14
Şekil 2.5 3B modellenen insan airiküler kıkırdak modelinin 3B baskısı (Kang vd. 2016)	15
Şekil 2.6 Miyoblast enjekte edilmiş kas hasarının Hematoksilen/Eozin ile boyanmış görüntüleri. a) Enjeksiyonu takiben ilk gün miyoblastların boşlukları tamamen kapladığı gözlenmesine rağmen, b) 24 saat sonunda miktarın azaldığı ve c) 7. gün sonunda çok az hücrenin ortamda kaldığı gözlemlenmiştir (Fan vd. 1996).....	17
Şekil 3.1 3B doku iskelelerinin üretiminde kullanılan 3B biyoyazıcı ekipmanı ve bileşenleri.....	27
Şekil 3.2 Doku iskelesi üretimi. a) ilk katman üretimi, b) paralel hizalanmış fiberlerden oluşan tasarım c) 2 katman üretilmiş, paralel hizalanmış doku iskelesi.....	28
Şekil 3.3 Çekme çeneleri arasında a) Film b) 3B baskılanmış doku iskelesi örneklerinin görüntüsü.	31
Şekil 3.4 THP-1 monosit farklılaşma deney grupları	35
Şekil 3.5 Doku iskelelerine C2C12 hücre ekiminin şematik gösterimi.	37
Şekil 3.6 Doku iskelelerine ASC hücre ekimi	38
Şekil 3.7 ASC hücreli 3B doku iskelelerine miyojenik indüksiyon ortamının uygulanma zaman çizelgesi	39
Şekil 3.8 a) kas hasarının oluşturulması b) kas hasarı c) doku iskelesi ve çıkarılan kas kütlesi d) 3B doku iskelesinin hasarlı bölgeye implante edilmesi e-f) yara bölgesinin kapatılması.	43
Şekil 3.9 Ayak izi arasındaki uzaklık ilişkileri	44

Şekil 4.1 TPU-1 polimerine ait polikondenzasyon reaksiyonu ve koşulları.....	47
Şekil 4.2 TPUU-2 polimerine ait polikondenzasyon reaksiyonu ve koşulları.....	47
Şekil 4.3 TPUU-3 poimerine ait polikondenzasyon reaksiyonu ve koşulları.....	48
Şekil 4.4 TPUU-3 sentezi sırasında alınan ilk karışım (PCL2k/HDI) (mavi spektrum) ve ön polimer (kırmızı spektrum) örneklerinin FTIR spektrumları	49
Şekil 4.5 TPUU-3 (PCL2k/PEO600/HDI) kopolimerinin FTIR spektrumu	50
Şekil 4.6 TPUU-2 kopolimerinin FTIR spektrumu	51
Şekil 4.7 TPU-1 (PCL2k/HDI) kopolimerinin FTIR spektrumu.....	52
Şekil 4.8 TPU-1, TPUU-2,3 DSC termogramı	53
Şekil 4.9 DCM, THF, THF:IPA kullanılarak alınan paralel hizalanmış yapıların mikroskop görüntüleri (ölçek:200 µm).....	55
Şekil 4.10 Farklı konsantrasyonlarda alınan baskı örneklerinin ışık mikroskop görüntüleri	57
Şekil 4.11 TPU-1, TPUU-2-3 ve PCL 3B baskı görüntüleri	57
Şekil 4.12 a) Film ve b) 3B doku iskelelerinin SEM görüntüleri	59
Şekil 4.13 Hücre ekim çalışmalarında kullanılan doku iskelelerinin SEM görüntüleri .	60
Şekil 4.14 Polimerlerin hücre kültürü ortamında biyobozunma (kütle kaybı) profili	61
Şekil 4.15 Doku iskelelerinin hücre kültürü ortamında biyobozunma sırasında SEM ile morfolojik incelemesi	62
Şekil 4.16 Polimerlerin enzimatik ortamda biyobozunma profili.....	63
Şekil 4.17 Enzimatik biyobozunma ortamında 42. ve 56. günlerde doku iskeleleri yapısal bütünlüklerini kaybetmiştir.....	63
Şekil 4.18 Doku iskelelerinin hücre kültürü ortamında biyobozunma incelemesi SEM görüntüleri.....	64
Şekil 4.19 TPU-1, TPUU3 ve PCL baskı doku iskelelerinin mühendislik gerilmesi-gerinmesi grafiği.....	66
Şekil 4.20 TPU-1, TPUU3 ve film örneklerin mühendislik gerilmesi-gerinmesi grafiği	66

Şekil 4.21 Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden sonra deneysel gruplara göre 24, 48 ve 72 saatte hücre tabakası yayılımının değişimi. 10x	68
Şekil 4.22 Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden sonra deneysel gruplara göre 24, 48 ve 72 saatte hücre morfolojisinin değişimi. 40x.....	69
Şekil 4.23 Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 72 saat sonra deneysel gruplara göre (a) Canlı hücre sayısının değişimi; sonuçlar negatif kontrol grubuna göre normalize edilmiştir, (b) % hücre büyümesi inhibisyonu; sonuçlar pozitif kontrol grubuna bağlı olarak verilmiştir.....	70
Şekil 4.24 TPU-1 ve TPUU-3 örneklerde THP-1 monosit hücre davranışlarının incelenmesi (1. Gün).....	72
Şekil 4.25 TPU-1 ve TPUU-3 örneklerde THP-1 monosit ve makrofaj hücrelerin 1., Gün Alamar Blue test sonuçları.....	72
Şekil 4.26 TPU-1-TPUU-3 doku iskelelerinin THP-1 makrofaj hücre davranışlarının incelenmesi (1., 3. gün).....	73
Şekil 4.27 Doku iskelelerinin üzerinde PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerin 1., 3. Gün Alamar Blue test sonuçları.....	73
Şekil 4.28 TPU-1 ve TPUU-3 doku iskelelerinin THP-1 makrofaj hücre davranışlarının DAPI/Phalloidin incelenmesi (1., 3. Gün) (ölçek:100µm)	74
Şekil 4.29 TPU-1 ve TPUU-3 doku iskelelerinin THP-1 makrofaj hücre davranışlarının SEM ile incelenmesi (1., 3. Gün).....	74
Şekil 4.30 C2C12 hücreleri ekilen 3B doku iskelelerinin 7.gün Phalloidin/DAPI boyaması. Yeşil boyamalar Phalloidin, mavi boyamalar DAPI ifade etmektedir	75
Şekil 4.31 C2C12 hücreleri ile ekilen 3B doku iskelelerine hücrelerinin yayılımı.	76
Şekil 4.32 C2C12 hücreleri ile ekilen film örneklerin 7.gün Phalloidin/DAPI boyaması. Yeşil boyamalar Phalloidin, mavi boyamalar DAPI ifade etmektedir	77
Şekil 4.33 Doku iskeleleri üzerinde Alamar Blue yöntemiyle canlı hücre sayısı belirlenmesi. Mavi barlar TPUU-3 3B doku iskelesini, turuncu barlar TPUU-3 film örnekler, gri barlar TPU-1 3B doku iskelesini, sarı TPU-1 film örnek göstermektedir .	78
Şekil 4.34 C2C12 hücreleri ekilen 3B doku iskelelerinin 7.gün SEM görüntüleri	79
Şekil 4.35 C2C12 hücreleri ekilen film örneklerin 7.gün SEM görüntüleri.....	79
Şekil 4.36 Hematoksilen-Eozin a) Tedavi edilmemiş grubunda defekt alanında kas atrofisi ile birlikte bağ doku (Asteriks) ve adipoz (ok) hücreler gözlenmektedir.	

b)Hücresiz implant grubunda bağ doku çoğalması ve kısıtlı kas rejenerasyon (ok) gözlenmektedir. c) Hücreli implant grubunda kas volümün homojen bir şekilde geri kazanıldığı ve yoğun kas rejenerasyonu (oklar) gözlenmektedir 82

Şekil 4.37 Tedavi edilmemiş deney grubunun a, c) Hematoksilen-Eozin ve b, d) Masson'un Trikrom boyama görüntüleri a, b) Geniş defekt alanları yıldız ile gösterilmektedir. c, d) Ok ile kasların yerini doldurmaya çalışan kollagen demetler göstermektedir. (Masson'un Trikrom boyasıyla mavi boyanan bölgeler kollagen demetleri ifade etmektedir.)..... 83

Şekil 4.38 Hematoksilen-Eozin boyaması ile, a)hücresiz doku iskelesine ait kalıntılar (yıldız), fibröz bağ doku proliferasyon (ok başı) ve porların altında az sayıda rejenere olan (yenilenen) kas lifleleri (ok) b) Rejenere olan kas lifleri. Sıra şeklinde dizilmiş veziküler çekirdeklere sahip miyoblast hücreleri gözlenmektedir 84

Şekil 4.39 a) Hematoksilen- Eozin boyaması ile bağ doku proliferasyonu (yıldız) ve çoğalan miyoblastlar (ok), b) Masson'un Trikrom boyasıyla boyanmış kesiti. Bağ doku hücrelerin mavi renkte boyanması (yıldız) ve çoğalan miyoblastların kırmızı renkte boyası (beyaz ok) göstermektedir 84

Şekil 4.40 Hematoksilen-Eozin boyaması ile yoğun miyoblastlar ile hücreli doku iskelesinin porları (yıldızlar). Porların altında sıra şeklinde nükleer dizilim gösteren rejenere kas lifleri (ok) ve aralarında yangısal hücre infiltrasyonu (ok başı) göstermektedir 85

Şekil 4.41 Hematoksilen-Eozin boyaması ile doku iskelesi porların (yıldız) çevresinde sentral nükleer yerleşim gösteren ve çok çekirdekli rejenere kas hücreler (oklar) gösterilmektedir 85

Şekil 4.42 a, c) Hematoksilen-Eozin, b, d) Masson'un Trikrom boyası. b) Masson'un trikrom boyasıyla kırmızı boyanan miyoblastlarıyla (ok başı) beraber yoğun yangısal hücre infiltrasyonu. c)Yakın görünümde yeni şekillenen küçük miyotüpleri (ok) ve aralarında yangı hücrelerin eşlik ettiği d) Masson'un trikrom boyamasıyla mavi boyanan bağ doku hücreler (yıldız) gösterilmektedir..... 86

Şekil 4.43 Sütür materyali (ok) ve implant alanında kollagen iplikleri (yıldız), Masson'un Trikrom boyası..... 87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Poliüretan kullanılan doku mühendisliği çalışmalarına örnekler.	11
Çizelge 2.2 3B biyoyazıcı ile üretilen doku iskelesi çalışmalarından örnekler.	16
Çizelge 2.3 İskelet kası rejenerasyonunda kullanılan doku iskeleleri ve üretim metodlarından örnekler.	19
Çizelge 3.1 Kullanılan malzemeler, temin edildikleri yerler ve kullanım amaçları.	21
Çizelge 3.2 TPU-1, TPUU-2 ve TPUU-3 sentezinde kullanılan reaktanların kimyasal yapıları	23
Çizelge 3.3 Sentezlenen polimerlerin kimyasal bileşimleri.....	25
Çizelge 3.4 3B baskı parametreleri, 3B model ve 3B baskıda kullanılan modelin mimarisi	29
Çizelge 3.5 Sitotoksikite testi değerlendirme kriterleri.....	33
Çizelge 3.6 Sitotoksik cevap indeksi ve sitotoksikite değerlendirmesi.	34
Çizelge 3.7 TPUU-3 doku iskelelerinin <i>in vivo</i> değerlendirme deney grupları.....	41
Çizelge 3.8 TPUU-3 doku iskelelerinin implantasyonu	42
Çizelge 4.1 Polimerlerin DSC verisi.....	54
Çizelge 4.2 Organik çözeltilerin kaynama noktaları	56
Çizelge 4.3 3B baskı parametreleri ve TPUU-3 ile üretilmiş 3B yapıların örnek görüntüleri.....	58
Çizelge 4.4 Doku iskelelerinin çekme testi sonuçları.....	67
Çizelge 4.5 Biyouyumluluk testi değerlendirme kriterleri sonuçları.....	70
Çizelge 4.6 TPU-1 ve TPUU-3 için biyouyumluluk değerlendirme sonuçları.....	71
Çizelge 4.7 Hücresiz doku iskelesi implante edilen hayvanların siyatik fonksiyon indeksi ve tibial fonksiyon indeksi.....	80

1. GİRİŞ

İskelet kası, insan vücut ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturan bir dokudur ve spor aktiviteleri, travma gibi nedenlerle sıklıkla hasar görmektedir. Hasar sonrası, iskelet kası sahip olduğu normalde uyku halinde bulunan uydu hücrelerin aktivasyonu sonucu rejenere olabilmektedir. Uydu hücreler aktive olarak çoğalıp, farklılaşır ve birbiriyle birleşerek çok çekirdekli miyofiberleri oluşturur. Oluşan miyofiberlerin hasarlı bölgenin çevresindeki sağlıklı miyofiberlerle entegrasyonu ile hasarlı iskelet kası dokusu kendini yenileyebilir. Ancak, kas iyileşmesi büyük hacimli kas kaybı yaşanan vakalarda tam olarak gerçekleşmemektedir. Bu gibi durumlarda klinikte sıklıkla otolog greftler kullanılmaktadır ancak bu uygulamada da yeterli miktarda doku bulunmaması ve greft bölgesinde yaşanan sorunlar kullanımı kısıtlamaktadır (Äärimaa vd. 2004, Maclean vd. 2012, Quintero vd. 2009, Turner ve Badylak 2012, Yılgör vd. 2012).

Doku mühendisliği, hücreler, doku iskeleleri ve indüktif ajanlar kullanılarak laboratuvar ortamında fonksiyonel doku ve organ geliştirilmesini hedefleyen bir araştırma alanıdır (Butler vd. 2000). Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımlarıyla büyük hacimli kas kayıplarında kullanıma yönelik bir çözüm üretebilmek amacıyla çeşitli çalışmalar yürütülmektedir (Merceron vd. 2012, Wang vd. 2016). Bu yöntemle geliştirilecek fonksiyonel doku eşlenikleri, büyük hacimli kas kayıpları başta olmak üzere kas yenilenmesi problemlerine alternatif bir çözüm getirme potansiyeline sahiptir (Wang vd. 2016).

Fonksiyonel doku ve organ geliştirilmesinde kullanılan en önemli yaklaşımlardan biri, geliştirilecek dokunun hücre dışı matrisinin taklit edilmesidir. Üretilen doku iskelelerinin hücre dışı matrisi taklit edebilmesi için gözenekli ve üç boyutlu (3B) bir yapıya sahip olması gerekmektedir. 3B baskılama yöntemi, uygulama alanları gün geçtikçe gelişen ve doku-organ üretiminde kullanımı giderek hız kazanan günümüzün önemli üretim teknolojilerinden biridir. Son yıllardan yapılan çalışmalar, 3B baskılama yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin doku yapısını başarılı bir şekilde taklit edebildiğini göstermektedir. İskelet kası birbirine paralel yönlenmiş miyotüplerden oluşan dinamik bir dokudur. İskelet kasının gelişim ve rejenerasyon süreçlerine bakıldığında, miyositlerin paralel yönlenmesinin hücre birleşmesi ve miyotüplere farklılaşmanın ilk basamağı

olduğu gör÷l÷r. Dolayısıyla, iskelet kası için doku iskelesi geliştirme çalışmalarında amaçlardan biri paralel yönlenmiş fiber yapıların taklit edilebilmesidir. 3B baskılama, laboratuvar ortamında iskelet kası üretimine yönelik olarak, paralel yönlenmiş fiber yapıların üretimi için kullanılabilecek alternatif bir teknolojidir (Murphy ve Atala 2014, Derby vd. 2012, Pfister vd. 2003, Ong vd. 2017, Turner ve Badylak 2012, Duan vd. 2013). Bununla birlikte, iskelet kasının kompleks damar-sinir ağı yapısı da 3B baskılama yöntemi ile üretilebilir ve bu şekilde işlevsel kas eşleniğı oluşturulmasına yönelik çalışmaların yapılmasına olanak sağlama potansiyeli bulunmaktadır.

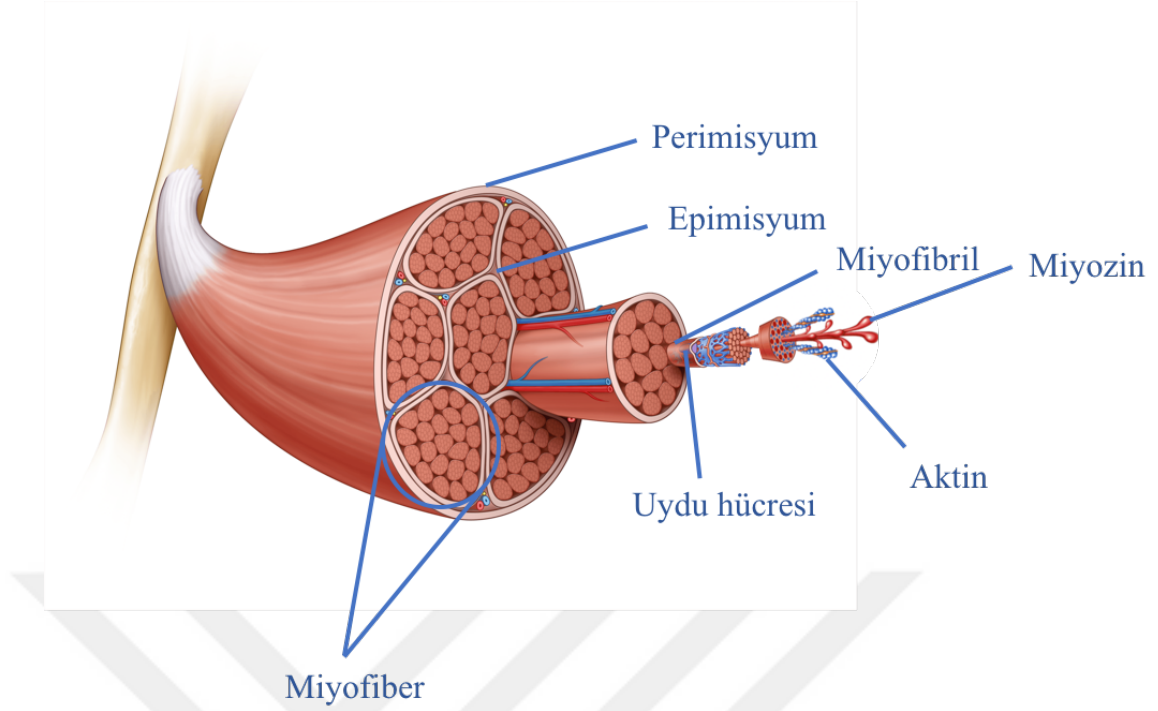


2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 İskelet Kas Dokusunun Yapısı ve Rejenerasyonunda Kullanılan Klinik Yaklaşımlar

İnsan vücut ağırlığının yaklaşık yarısının oluşturan iskelet kası, kemik ve bağ dokular ile birlikte vücudun hareket kabiliyetini sağlarken, iç organları da darbelerden korur. İskelet kası, paralel hizalanmış miyofiber demetlerinden oluşmaktadır. **Şekil 2.1**'de gösterildiği gibi miyofiber demetleri perimisyum ve epimisyum bağ dokuları içinde bir arada bulunmaktadır. Miyofiberler bir dizi kümelenmiş çok çekirdekli, tek hücreli miyofibrillerden oluşmaktadır. Miyofibriller, kasılma sürecinden sorumlu proteinleri içeren, kalın (miyozin proteinini içeren) ve ince (aktin proteinini içeren) organize filamentler olan sarkomerlerden oluşur. Miyofibriller uyku halinde bulunan uydu hücreleri içeren bazal tabakayla çevrilidir. Kas rejenerasyonu, uydu hücrelerin aktivasyonu ile gerçekleşir. Uydu hücreler kas rejenerasyonu sırasında aktive olarak çoğalır, miyoblastlara farklılaşır ve hasarlı dokunun çevresindeki sağlıklı miyofiberler ile entegre olarak doku rejenerasyonunu sağlar. Miyofiber demetleri, perimisyum içinde besin maddeleri ve uyarımları sağlamak için gerekli olan kan damarı ve sinir ağı ile çevrilidir. Tendonlar kasları kemiklere bağlarken, aponevrozlar kasları diğer kaslara ya da tendonlara bağlayan bağ dokudur (Scime vd. 2009, Shier vd. 2010)

İskelet kası hasarlarına, spor aktivitelerinde bilinçsiz fazla çalıştırma, Duchenne Musküler Distrofi gibi doğuştan, ya da sonradan edinilmiş hastalıklarda, travma sonucunda ve tümör çıkarılması operasyonlarından sonra sıklıkla rastlanmaktadır. Örneğin, ABD'de her yıl klinik olarak 1 milyondan fazla kas yırtığı vakası ile karşılaşmaktadır. Bu gibi durumlarda, etken madde enjeksiyonu ve hücresel tedaviler uygulanmakta olsa da etkinlikleri sınırlı kalabilmektedir. Özellikle, büyük hacimli kas kayıplarının tedavisinde önemli kısıtlamalarla karşılaşmaktadır. Altın standart olarak kullanılan otolog greftlerin miktarı yetersizdir ve bu vakaların tedavisi için ABD'de yıllık 5-6 milyar dolar seviyesinde bir sağlık harcaması yapılmakta olduğu rapor edilmiştir (Äärimaa vd. 2004, Maclean vd. 2012, Quintero vd. 2009, Turner ve Badylak 2012, Yılğör vd. 2012).



Şekil 2.1 İskelet kası yapısının şematik gösterimi

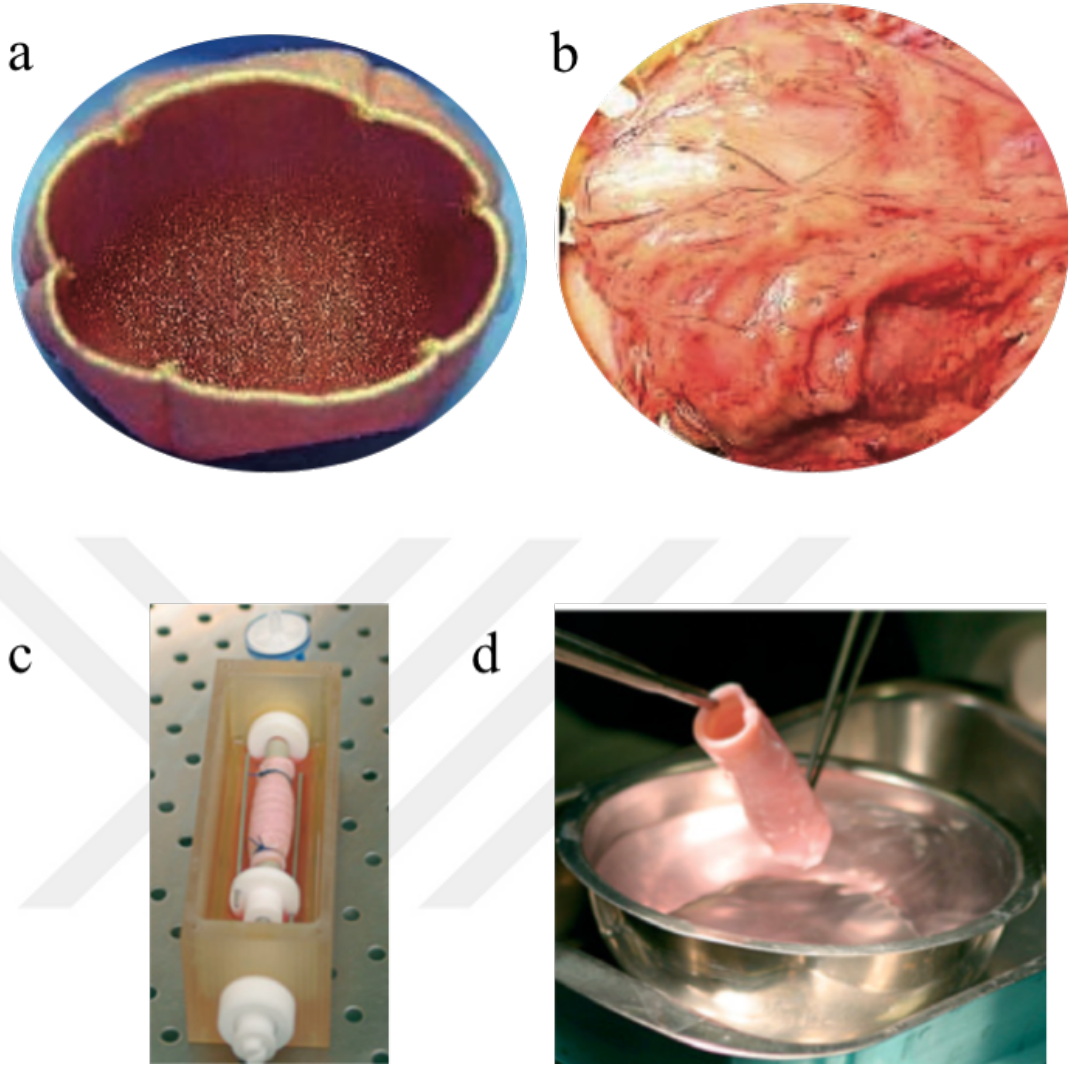
Dolayısıyla, iskelet kas dokusu rejenerasyonunda alternatif etkin tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımlarıyla büyük hacimli kas kayıplarına bir çözüm üretebilmek amacıyla çeşitli çalışmalar yürütülmektedir (Merceron vd. 2012, Wang vd. 2016).

2.2 Doku Mühendisliği

Hasarlı ve işlev görmeyen doku ve organların sağlıklı eşleniklerle değiştirilmesi sıklıkla uygulanan yöntemlerdendir. Verici olarak hastanın kendisinden alınan doku (otogreftleme), başka bir kişiden alınan doku (allogreftleme), hayvan kaynaklı doku (zenogreftleme) kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerde greftin alındığı bölgede yaşanan komplikasyonlar, miktar yetersizliği, immün uyumsuzluk, kişiler ve türler arasında hastalık taşınması gibi sorunlar mevcuttur. Tüm bunlar göz önüne alındığında nakledilmeye uygun sağlıklı doku ve organların laboratuvar ortamında üretilmesini amaçlayan doku mühendisliğinin önemi ortaya çıkmaktadır.

Doku mühendisliği, mühendislik, tıp ve yaşam bilimlerinin prensiplerini kullanarak, doku ve organların fonksiyonlarını yerine getirmek veya destek olmak, ya da tamamen yerini almak üzere tasarlanan biyolojik sistemler geliştiren disiplinler arası çalışma alanıdır. Doku mühendisliği yöntemi ile araştırmacılar organ nakli için bekleme listelerini ortadan kaldırmayı, hastalar için uygun doku ve organın laboratuvar ortamında hastanın kendi kök ve primer hücrelerinden üretilmesini hedeflemektedir (Langer ve Vacanti 1993, Khademhosseini ve Langer 2016).

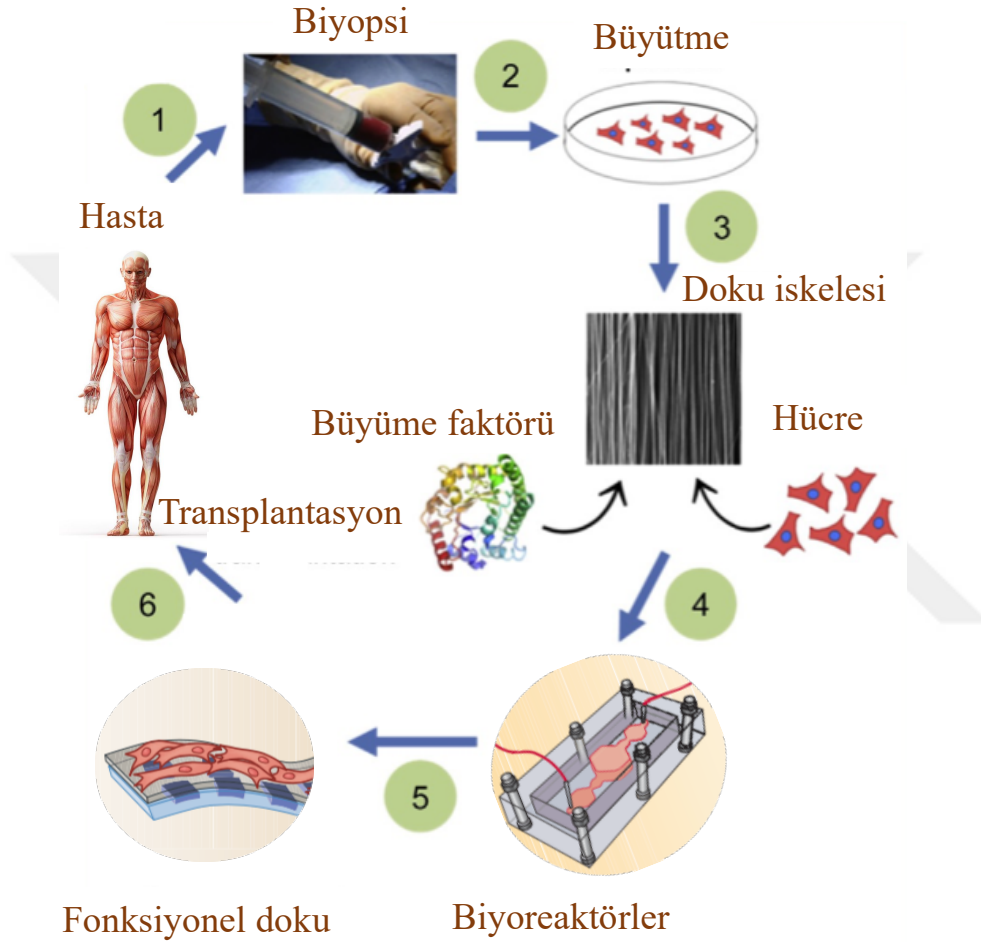
2006 yılında Wake Forest Üniversitesinde Anthony Atala vd., doku mühendisliği prensibi ile laboratuvar ortamında 4-19 yaş aralığındaki 3 erkek ve 4 kız çocuk hastadan alınan hücreler ile kollajen ve poliglolikolik asit (PGA) matrise sahip biyomalzemeden oluşan idrar kesesi geliştirmiş ve geliştirilen idrar keselerinin implantasyonunu gerçekleştirmişlerdir (**Şekil 2.2 a-b**). Bütün hastalarda nakil başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve 7-8 hafta sonunda mesanenin uyum sağlamaya başladığı ve böbrek fonksiyonlarının stabil kaldığı rapor edilmiştir (Atala vd. 2006). 2008 yılında Brighton Üniversitesi'nde Macchiarini vd. tarafından, bir kadın hastaya doku mühendisliği prensibi ile geliştirilmiş soluk borusu nakli yapılmıştır (**Şekil 2.2 c-d**). Kadavradan alınan soluk borusu laboratuvar ortamında hücresizleştirilmiş ve ardından nakil gerçekleştirilecek hastadan alınan hücrelerle kültürlenmiş ve nakledilmiştir. Nakil sonrası hastaya immün baskılayıcı tedavisi verilmemiş olduğu halde, hasta doku mühendisliği prensibi ile geliştirilmiş olan bu nakil materyaline karşı antikor geliştirilmemiştir. Hastaya operasyondan iki ay sonra yapılan akciğer fonksiyon testinde normal aralıkta solunum gerçekleştirdiği gözlenmiştir (Macchiarini vd. 2008).



Şekil 2.2 (a-b) Atala vd. tarafından geliştirilen idrar kesesi. a) laboratuvar ortamında geliştirilen idrar kesesi, b) geliştirilen idrar kesesi fibrin yapıştırıcı ve omentum ile kaplanmıştır (Atala vd. 2006) (c-d) Macchiarini vd. tarafından geliştirilmiştir (Macchiarini vd. 2008)

Bu çalışmalar göstermektedir ki doku mühendisliği yöntemi, her hasta için uygun doku ve organın laboratuvar ortamında hastanın kendi hücrelerinden üretilmesini vaat etmektedir. Bu örneklerle ek olarak, doku mühendisliği prensibi ile geliştirilmiş kıkırdak (matriks destekli otolog kondrosit implantasyonu, MACI) ve deri gibi eşleniklerin başarılı klinik uygulamaları da mevcuttur.

Doku mühendisliği yaklaşımında **Şekil 2.3**'de şematik olarak gösterildiği gibi; hastadan biyopsi veya ameliyat yoluyla alınan dokulardan (1) hücreler izole edilip *in vitro* ortamda çoğaltılır (2), ardından çeşitli yöntemlerle üretilmiş doku iskelesinin üzerine ekilir (3). Biyoreaktörlerin kullanımı ve biyoaktif moleküllerin yardımı ile fonksiyonel hale getirilmiş doku (4-5), hastanın hasarlı bölgesine nakledilir (6).



Şekil 2.3 Doku mühendisliği yönteminin şematik gösterimi.

Doku mühendisliği uygulamalarında hücre kaynağının seçimi çok önemlidir ve hedef dokunun sağlıklı bölgesinden izole edilen primer hücrelerin kullanılması ideal yaklaşımdır. Ancak, primer hücrelerinin izolasyonu ve çoğaltılması konularında sorunlar yaşanmaktadır. Hücre kaynağı olarak kök hücre kullanımı ise çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Kök hücreler, kendini yenileyebilme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir (Khademhosseini ve Langer 2016).

Doku mühendisliği yaklaşımının bir diğer bileşeni de doku iskeleleridir. Hücrelerin organize bir şekilde hedef doku oluşumunu sağlaması için uygun şekilde üretilmiş/desenlenmiş doku iskelelerine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3 Doku İskeleleri ve Doku İskelelerinde Kullanılan Biyomalzemeler

Fonksiyonel dokunun doku iskelesi üzerinde büyüüp gelişmesi için doku iskeleleri bazı özelliklere sahip olmalıdır. Doku iskelesi,

- Biyouyumlu olmalı,
- Hedef dokunun iyileştiği hızla orantılı olarak biyobozunur olmalı,
- Mekanik özellikleri hedef bölgeye uygun olmalı.
- Yapısal olarak hedef dokunun hücre dışı matrisini taklit edilebilmelidir. Bunun için, gözenekli ve 3B yapıya sahip olmalıdır.

Doku iskelesi üretiminde genellikle doğal polimer ve sentetik polimerler kullanılmaktadır (Khademhosseini ve Langer 2016, Pati vd 2015). Doğal polimerler dokular ile biyolojik ve kimyasal benzerliklere sahip olduğu için avantajlıdır. Bununla birlikte, sentetik polimerlerin bozunma hızlarının, yapısal bütünlüklerinin ve mekanik özelliklerinin kontrol edilebilmesi, istenen 3B şekilde üretime uygun olmaları gibi özellikleri ön plana çıkmaktadır.

2.3.1 Doğal polimerler

Doğal polimerler doğal ve biyolojik kaynaklardan elde edilen polimerlerdir. Doğal polimerler, doku özelliklerinin taklit edilebilmesi açısından avantajlı olsa da, dezavantajları arasında farklı kaynaklardan elde edildikleri için immün reaksiyon geliştirme riski, saflaştırma işlemlerinde ve bozunma hızlarının kontrol edilmesinde yaşanan zorluklar sayılabilir (Karakeçilli vd. 2014).

Kollajen ve fibrin doğal dokularda en çok bulunan proteinlerdir. Kollajen, fibroblastlar ve kondrositler gibi birçok hücre tipinin fenotipinin ve aktivitesinin korunmasında rol almaktadır (Chattopadhyay ve Raines 2014). Deniz yosunundan elde edilen bir polisakkarit olan aljinat, doğal polimerler arasında mekanik ve yapısal özelliklerinden dolayı tercih edilen bir diğer polimer tipidir (Wang vd. 2003).

2.3.2 Sentetik polimerler

Sentetik polimerler doğal polimerlere kıyasla kolaylıkla ve büyük ölçekte üretebilmeleri, kaynak sorunu olmaması ve genellikle düşük maliyetli olmaları sebebiyle çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Bunların yanı sıra, sentetik polimerlerin doku mühendisliği çalışmalarındaki en önemli avantajları, hedeflenen dokunun yapısal ve mekanik özelliklerini taklit edebilecek ve biyobozunma karakteristikleri bakımından da doğal doku özellikleri ile özdeş doku iskelesi üretimine olanak sağlamalarıdır. Ayrıca, polimer zincirine çeşitli biyomoleküler eklenerek doku iskeleleri üzerindeki hücre davranışları kontrollü bir şekilde değiştirilebilmektedir (Hodges ve Atala, 2007).

Doku iskelesi üretiminde yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler arasında poli(kaprolakton) (PCL), poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi polyesterler ve bunların karışımları ya da blok kopolimerleri kullanılmaktadır. Ancak, polyesterlerin çoğunlukla sert yapıda olmaları ve kısıtlı bir esneme kapasiteleri göstermeleri, bu polimerlerin yumuşak ve elastik dokuların üretiminde kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, iskelet kası, tendon ve kardiyovasküler dokular gibi uygulamalarda biyobozunur elastomerik malzemeler tercih nedenidir (Hodges ve Atala 2007).

2.3.2.1 Poliüretan

Poliüretanlar (PU) ticari olarak üretilen çok sayıda monomerin bulunması nedeniyle çok çeşitli kimyasal yapı, kompozisyon ve mekanik özellikte sentezlenebilmektedir (Yılğör vd. 2015). Elastomer PU'lar mekanik özelliklerinden dolayı kan damarları (Punnakitikashem vd. 2014), iskelet kas dokusu (Zhoa vd. 2017), kardiyovasküler uygulamalar (Guan vd. 2005) gibi yumuşak doku mühendisliği araştırmalarında tercih

edilmektedir. PU'lar genellikle organik çözücüler ile çözülerek ya da termoplastik özelliklere sahip olan PU'lar eritilerek kolayca işlenebilir.

PU kopolimerleri yumuşak ve sert segmentlerin ardışık olarak birbirlerine kimyasal bağlarla bağlanması sonucu oluşurlar. Yumuşak kısımlar genellikle camsı geçiş sıcaklığı oda sıcaklığının çok altında olan polieter veya alifatik polyester oligomerleri, sert kısımlar ise diizosiyanat ve zincir uzatıcıların reaksiyonu sonucu oluşan ve camsı geçiş sıcaklıkları veya erime noktaları oldukça yüksek üretilen ve üretilen gruplarıdır. Yumuşak ve sert kısımların kimyasal yapıları, molekül ağırlıkları ve polimer içerisindeki yumuşak/sert kısım oranları PU'nun fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirler (Yılgör vd. 2015, Kang vd. 2009, Lamba vd.1998). Biyobozunur PU'ların sentezinde yaygın olarak yumuşak segment olarak poli(propilen glikol), poli(etilen glikol), PCL ve glikolik asit gibi polioller kullanılmaktadır. Sert segment olarak ise alifatik, aromatik, polisiklik veya sikloalifatik diizosiyanatlar sıklıkla kullanılır. Alifatik diizosiyanatlar iyi oksidatif özellikler ve daha az sert özellikte termoplastik PU (TPU) sentezlenmesine sebep olur. Biyobozunur TPU sentezinde yaygın olarak diizosiyanatlar, izoforon diizosiyanat (IPDI), 1,4-butilen diizosiyanat (BDI) ve 1,6-heksametilen diizosiyanat (HDI) kullanılmaktadır (Barrioni vd. 2015, Tatai vd. 2007, Yılgör vd. 2016, Wang vd. 2012). Barrioni ve arkadaşlarının yürüttüğü biyobozunur PU sentezi çalışmasında sert segment olarak HDI ve yumuşak segment olarak PCL triol kullanılmıştır. Sentezlenen PU'lar elastik özellikler sergilemiştir ve toksik bir etki gözlenmemiştir (Barrioni vd. 2015). PU'lar biyobozunma süresinin uzun olmasında dolayı bozunma süresi uzun doku iskelesine ihtiyaç duyulan doku mühendisliği uygulamaları için önerilmektedir. Literatürde doku iskelesi üretiminde PU kullanılan çalışmalarının bazıları **Çizelge 2.1'**de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 Poliüretan kullanılan doku mühendisliği çalışmalarına örnekler.

Doku iskelesi olarak kullanılan poliüretan malzemeler	Hedeflenen doku	Sonuç	Kaynak
Lizin-bazlı poli(ester-üretan) (PEU) PCL diol ve lizin diizosiyanat (LDI) reaktanların ile sentezlenmiştir.	Kemik doku mühendisliği	3B biyoyazıcı ile üretilen doku iskelelerinde gözenekliliğin hücre tutunmasına etkisi incelenmiştir. Yüksek gözenekliliğe sahip doku iskelelerinde hücre tutunmasının arttığı gözlenmiştir.	Kizilay vd. 2015
Elastik poli(ester-üretan) (PEU) ticari olarak temin edilmiştir.	Kıkırdak doku mühendisliği	3B biyoyazıcı ile üretilen doku iskeleleri üzerinde ATDC5 kondrojenik hücre hattı kültür edilmiş. 200 μ m gözeneklilikte hücre tutunması ve farklılaşmasının az olduğu, 500 μ m gözeneklilikte hücre tutunmasının ve farklılaşmasının daha fazla olduğu gözlenmiştir.	Espinosa vd. 2019
Elektroaktif poliüretan elastomer PCL diol, sitrik asiti dopamin (DA) ve elektroaktif anilin heksamer (AH) kullanılarak sentezlenmiştir.	İskelet kası doku mühendisliği	İletken doku iskeleleriyle 18 gün süreyle alkalın çözeltisi içerisinde yürütülen biyobozunma çalışmalarında % 50-80 oranında kütle kaybı izlenmiştir. İletken doku iskelelerinin C2C12 hücrelerinin yapışmasını, proliferasyonunu ve miyojenik farklılaşmasını artırıcı etkisinin olduğu gözlenmiştir.	Zhao vd. 2017

2.4 Doku İskelesi Üretim Metotları

Doku iskelesinin mimarisi, hücrelerin yapışmalarını, yayılmalarını ve yönlenmesini belirler. Bu nedenle, hücre dışı matriksin taklit edilebilmesi için 3B gözenekli doku iskelesi üretimi hücre davranışlarının kontrolünde büyük önem taşımaktadır. Dondurarak kurutma, çözücü döküm/parçacık uzaklaştırma ve gaz köpükleştirme yöntemleri 3B gözenekli doku iskelesi üretiminde sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir (Karakeçilli vd. 2014).

Dondurarak kurutma yönteminin temelinde hazırlanan polimer çözeltisinin hızlı bir şekilde dondurma işlemi uygulandıktan sonra yüksek vakum altında dondurarak kurutma işlemi yapılması vardır. Bu yöntemle üretilen doku iskelelerinde gözenek boyutu genellikle 500 μm 'nin altında düşmemektedir ve homojen gözeneklilik elde edilmesi zordur (Karakeçilli vd. 2014).

Çözücü döküm/parçacık uzaklaştırma yönteminde ise, belirli boyutlara sahip gözenekleştirici parçacık ile polimer çözeltisi karıştırılır. Parçacıklar seçici çözücü içine daldırılarak uzaklaştırılır ve gözenekli yapı oluşturulur. Bu yöntemde genellikle yaklaşık 500 μm boyutunda gözenekliliğe sahip 3B yapılar elde edilmektedir (Karakeçilli vd. 2014, Murphy ve Mikos 2014).

Gaz köpükleştirme yönteminde, polimer çözeltisi içerisine yayılan gaz kabarcıkları gözenekli yapı oluşturmak için kullanılmaktadır. 200-500 μm aralığında gözenekliliğe sahip yapı üretildiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Karakeçilli vd. 2014, Murphy ve Mikos 2014).

Islak-eğirme ve elektro-eğirme yöntemleri, 3B fiber yapıda doku iskelesi üretiminde kullanılan yöntemler arasındadır. Elektro-eğirme yönteminde polimer çözeltisinden, kapiler tüpü çıkışında elektrik alan oluşturularak fiber yapıların toplanması ile 3B fiber yapıda doku iskeleleri üretilir. 10^{-6} m ve 10^{-9} m aralığında fiber kalınlığına sahip doku iskeleleri üretilebilir. Islak-eğirme yönteminde ise polimer çözeltisinden kapiler tüpü çıkışında çöktürme banyosunda fiber yapılar toplanması ile 3B fiber yapıda doku iskeleleri üretilir. Islak-eğirme ve elektro-eğirme ile üretilen fiberler taşıyıcılar üzerlerine sarılarak da toplanabilir (Karakeçilli vd. 2014, Huang vd 2003, Murphy ve Mikos 2014).

Ancak bu yöntemlerle 3B doku iskelelerinin iç ve dış yapısını tam olarak kontrol edebilmek mümkün olmamaktadır. 3B baskı teknolojisi, diğer yöntemlere kıyasla, tasarlanabilir ve kontrol edilebilir anatomik yapıya sahip 3B doku iskelesi üretiminde önemli avantajlar sağlamaktadır. 3B yazıcılar ile hücre dışı matriks yapısını başarılı bir şekilde taklit etmek mümkündür.

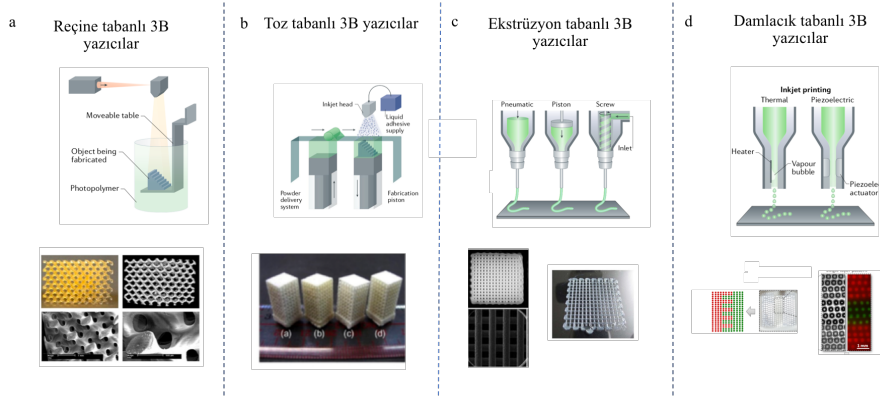
2.4.1 3B biyoyazıcılar

Günümüzde çoğunlukla endüstriyel alanda prototip üretiminde kullanılan 3B yazıcılar, Dünyayı etkileyen büyük inovasyonlardan birine dönüşmektedir. Bugün araçların gövdeleri, bisiklet parçaları, insansız hava araçları, ayakkabılar, takılar ve benzeri yapılar 3B yazıcılar ile üretilmektedir. 3B baskılama, bir katmanlı üretim teknolojisi olup, malzeme katmanlarının üst üste biriktirilmesi prensibi kullanılarak gerçekleşen bir üretim metodudur. 3B baskılama teknolojisinin sağlık alanında uygulamaları ise, hastaya özel olarak tasarlanan ve üretilen tıbbi cihaz ve malzemelerin kullanımına olanak vermesi nedeniyle yeni gelişmelere imkân sağlamaktadır.

3B biyoyazıcılar; hücreler, biyomalzemeler ve biyomoleküllerin eklemeli imalatı ile kompleks biyolojik yapıların üretiminde kullanılan teknolojidir. 3B biyoyazıcılar ile doku ve organların birebir taklit edilerek üretilmesi mümkündür. Günümüzde, üretilen bu yapıların fonksiyonel olması yönündeki kısıtlar henüz aşılamamış olsa da, gelecekte bu yöntemle üretilen doku ve organların Dünya genelinde organ yetmezliğinden kaynaklı ölümlerin önüne geçme potansiyeli bulunmaktadır. 3B biyoyazıcılar organ ve doku iskelesi üretimi dışında, sağlık alanında farklı amaçlarla da kullanılmaktadır. Örneğin, 3B biyoyazıcılar ile 3B kanser dokusu taklit edilerek bu modeller üzerinde tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. 3B yazıcıların eczacılık alanında da kullanımları vardır. 3B biyoyazıcılar ile hassas doz ayarlaması ve aynı kapsül içine farklı ilaçların yüklenmesiyle kompleks formülasyonların geliştirilmesi mümkündür. Bunun yanında, 3B yazıcılar cerrahi kılavuz üretiminde de kullanılır. Tümör çıkarılması operasyonlarından önce kanserli doku ve çevre dokunun 3B modellemesi yapılarak üretilen 3B baskılanmış modelde inceleme yapılması, ayrıca ortopedik cerrahide implantların doğru acı ile sabitlenmesi için operasyon öncesi planlama yapılması gibi konularda cerraha önemli kolaylıklar

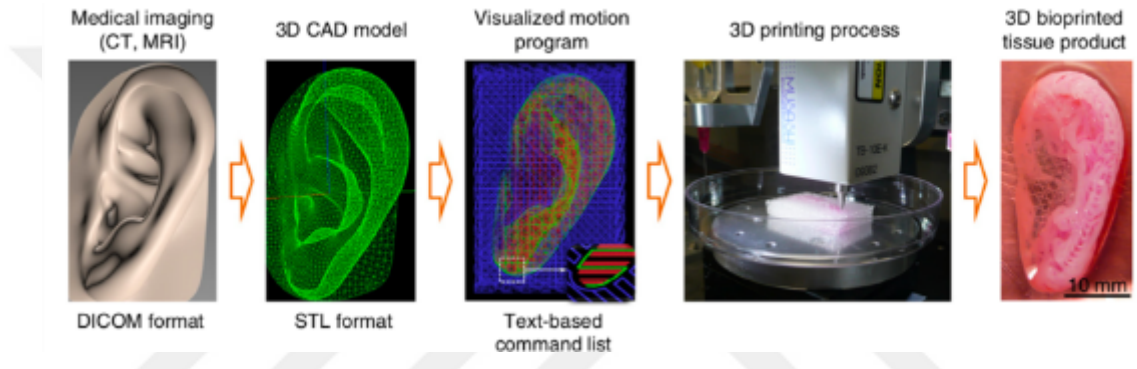
sağlamaktadır. 3B yazıcı teknolojisi ile kişiye özel implant üretimi de mümkündür (Lorenzo ve Burdick 2018, Murphy ve Atala 2014).

3B yazıcılar üretim yöntemine göre dört sınıfta incelenebilir. (1) Reçine tabanlı 3B yazıcılar, ışık ile işlenebilen (fotokür edilebilen) reçine bazlı sıvı banyolar kullanılarak 3B model oluşturma prensibine dayalı 3B yazıcılarıdır. (2) Toz tabanlı 3B yazıcılar ise, serilmiş olan tozu lazerin bir CAD dosyasında verilen dijital verilere dayanarak belirli alanlarda sinterlemesine dayalı 3B yazıcılarıdır (**Şekil 2.4a**). Toz Bazlı 3B yazıcılar yüksek yatırım maliyeti gerektirmektedir. Son yıllarda kullanımı giderek yaygınlaşan (3) Ekstrüzyon tabanlı 3B biyoyazıcılar, diğer katı serbest biçimli imalat tekniklerine kıyasla mekanik olarak basit ve düşük maliyetli süreçlerdir (**Şekil 2.4b**). Bu yöntemde, farklı ekstrüzyon metotları kullanılabilir ve 3B baskılanacak malzeme, piston ve basınç kullanılarak, sadece hava ile ya da bir vida yardımıyla biriktirilebilir (**Şekil 2.4c**). (4) Damlacık tabanlı 3B biyoyazıcılar, doku ve organ biyofabrikasyonu alanında kullanılan en eski baskı yöntemlerinden biridir. Bu yaklaşım, damlacık içine kapsüllenmiş hücrelerin ve canlı olmayan malzemelerin bir substrat üzerinde katman-katman şekilde basıldığı ve desenlendirildiği temassız bir strateji kullanır. Damlacık tabanlı 3B yazıcılar, damlacıkları üretmek için kullanılan mekanizmalara göre termal ve piezoelektrik olmak üzere ikiye ayrılır (**Şekil 2.4d**) (Lorenzo ve Burdick 2018, Murphy ve Atala 2014, Woodfield vd 2017).



Şekil 2.4 a) Reçine tabanlı 3B yazıcılar (Lorenzo ve Burdick 2018, Provaggi ve Kalaskar 2017), b) Toz tabanlı 3B yazıcılar (Lorenzo ve Burdick 2018, Provaggi ve Kalaskar 2017), c) Ekstrüzyon tabanlı 3B yazıcılar (Lorenzo ve Burdick 2018, Temple vd. 2014), d) Damlacık tabanlı 3B yazıcılar (Lorenzo ve Burdick 2018, Gurkan vd. 2019)

Kang ve arkadaşları Wake Forest Üniversitesinde geliştirilen doku-organ yazıcı (integrated tissue-organ printer, ITOP) cihazı kullanımıyla bilgisayarlı tomografiden alınan veriler ile 3B modeli oluşturulan kulak modelinin birebir 3B baskılamasını gerçekleştirmiştir (Şekil 2.5). Araştırmacılar 3B kulak modeline sağlamlık kazandırmak için PCL polimerini kullanmış, 2 farklı hücre hattının baskılamasını gerçekleştirmek için doğal polimerlerden oluşan bir biyo-kartuş (gelatin, fibrinojen ve hiyalüronik asit) kullanmıştır (Kang vd. 2016). Bu çalışmalara ek olarak literatürde yer alan 3B biyoyazıcılar ile üretilen doku iskelesi çalışmalarının bir özeti Çizelge 2.2’de sunulmuştur.



Şekil 2.5 3B modellenen insan airiküler kıkırdak modelinin 3B baskısı (Kang vd. 2016)

Çizelge 2.2 3B biyoyazıcı ile üretilen doku iskelesi çalışmalarından örnekler.

Malzeme	3B biyoyazıcı türü	Doku iskelesinin Kullanım Amacı	Hücre Hattı	Kaynak
Polikaprolakton (PCL)	Ekstrüzyona dayalı 3B biyoyazıcı	Kemik doku mühendisliği	Yağ kaynaklı kök hücre kullanılmış.	Temple vd. 2014
Poliüretan	Ekstrüzyona dayalı 3B biyoyazıcı	Merkezi sinir sistemi onarımı	Sinir kök hücreleri	Hsieh vd. 2015
Jelatin, Aljinat, Kollajen	Ekstrüzyona dayalı 3B biyoyazıcı		İnsan kornea epitel hücreleri (HCEC'ler)	Wu vd. 2016
Kitosan, Agaro, Aljinat	Ekstrüzyona dayalı 3B biyoyazıcı	Merkezi sinir sistemi onarımı	Sinir kök hücreleri	Gu vd.2016
Polikaprolakton (PCL) , Aljinat	Ekstrüzyona dayalı 3B biyoyazıcı	Kıkırdak doku onarımı	Birincil nazal septal kıkırdak kondrositi	Kundu vd. 2015

2.5 İskelet Kas Dokusu Yenilenmesinde Doku Mühendisliği Yaklaşımları

İskelet kası dokusu rejenerasyonu için doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında yapılan çalışmalar, primer ve/veya kök hücre tabanlı hücresel tedaviler ve doku iskelesi kullanımı ile yeni doku geliştirilmesi olarak iki başlık altında incelenebilir.

Örneğin, dokunun primer hücresi olan miyoblastların izole edilip laboratuvar ortamında çoğaltılarak hasarlı bölgeye enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu yöntemin özellikle büyük hacimli kas kayıplarının rejenerasyonunda yetersiz kaldığı gözlenmiştir (Maclean vd. 2011, Qazi vd. 2014, Turner ve Badylak 2011). Fan ve arkadaşları miyoblast hücresi ile gerçekleştirdikleri çalışmada, hücrelerin enjeksiyonunu takiben birinci günden itibaren ölmeye başladığını rapor etmiştir (Fan vd. 1996) (Şekil2.6).



Şekil 2.6 Miyoblast enjekte edilmiş kas hasarının Hematoksilen/Eozin ile boyanmış görüntüleri. a) Enjeksiyonu takiben ilk gün miyoblastların boşlukları tamamen kapladığı gözlenmesine rağmen, b) 24 saat sonunda miktarın azaldığı ve c) 7. gün sonunda çok az hücrenin ortamda kaldığı gözlemlenmiştir (Fan vd. 1996).

Primer hücrelere ek olarak, kas kaynaklı kök hücreler (Carr vd. 2007) ve kemik iliği-kökenli mezenkimal kök hücrelerin de (Brazelton vd. 2003) kas defektlerine enjeksiyonu ile tedavi uygulanmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak, tüm bu çalışmalarda, özellikle büyük hacimli kas kayıpları için hücrelerin herhangi bir taşıyıcı sistem olmaksızın defekte uygulanmasının fonksiyonel rejenerasyon için yetersiz kaldığı gösterilmiştir. Bu nedenle, hücreleri hasarlı kas bölgesinde lokalize tutmak ve fonksiyonel rejenerasyonu sağlamalarını mümkün kılmak için doku iskelesi kullanımının gerekli olduğu görülmektedir.

İskelet kası doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak doku iskelelerinin doğal kas dokusunu taklit etmek için;

- Mekanik özellikleri (elastikiyet ve yorulma dayanımı) uygun olmalıdır,
- 3B hücre dışı matrisin taklit edilmesi için paralel hizalanmış 3B yapıda üretilmelidir.

- Hedef dokunun iyileştiği hızla orantılı olarak biyobozunur olmalıdır. Literatürde hasarlı kas dokusunun %55 oranında rejenerasyonunun 8 haftada gerçekleştiği rapor edilmiştir (Winkler vd. 2011).

Ku vd. (2012) tarafında yapılan bir çalışmada elektroğirme yöntemi ile PCL ve polianilinden üretilen iletken doku iskeleleri üzerinde C2C12 hücrelerinin miyojenik farklılaşma potansiyeli araştırılmıştır. Paralel hizalanmış ve rastgele dağılıma sahip doku iskelelerinin C2C12 hücrelerinin miyojenik farklılaşmasına etkisi incelendiğinde, paralel hizalanmış doku iskeleleri üzerinde miyotüp oluşumun arttığı gözlenmiştir (Ku vd. 2012). Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise 3B biyoyazıcı ile fibrinojen, gelatin ve hiyalüronik asit içeren biyomürekkep kullanılarak üretilen 3B doku iskelelerinin insan kas progenitör hücrelerinin (hMPC) canlılığına ve miyotübül oluşumuna etkisi ve ayrıca *in vivo* ortamda kas rejenerasyonuna etkisi incelenmiştir. 3B biyoyazıcı kullanılarak üretilen doku iskelelerinde hücre canlılığın 5. günde daha fazla olduğu ve miyotübüllerin arttığı kas spesifik immünfloresan boyama ile gösterilmiştir. Bu çalışmalara ek olarak, literatürde yer alan iskelet kası doku mühendisliğine yönelik doku iskelesi çalışmalarının bir kısmı **Çizelge 2.3**'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3 İskelet kası rejenerasyonunda kullanılan doku iskeleleri ve üretim metodlarından örnekler.

Doku iskelesi malzemesi	Doku iskelesi üretim metodu	Sonuç	Kaynak
Sentetik elektroaktif poliüretan	Kalıba dökme	İletken, dopamin yüklü doku iskelelerinde hücre canlılığının ve miyotüp oluşumunun arttığı gözlenmiştir.	Zhao vd. 2017
Sentetik poliüretan	Kalıba dökme	Polimerizasyon sırasında yapıya eklenen fibrinojenin hücre tutunması ve canlılığını arttırdığı ve dinamik kültür altında PU-Fib doku iskeleleri üzerine C2C12 hücrelerinin kas spesifik protein sentezinin arttığı gözlenmiştir.	Ergene vd. 2019
Sodyum aljinat ve fibrinojen	Elektroeğirme	Hücre kaynağı olarak yağ kaynaklı kök hücre kullanılan bu çalışmada, <i>in vivo</i> değerlendirme sonucunda miyojenik indüksiyon uygulanan ve uygulanmayan doku iskeleleri arasında kas rejenerasyonu etkinliği bakımından önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir.	Honick vd. 2018
Tendom kısmı için; PCL Kas kısmı için; TPU Biyomürekkep olarak; Hyaluronik asit, Jelatin ve Fibrinojen	3B Biyoyazıcı (ITOP)	3B kas-tendon yapısının 7 gün kültürün ardından NIH/3T3 hücre hattı ile C2C12 hücre hattının entegre olduğu gözlenmiştir. Kas kısmında C2C12 hücrelerin miyotübül oluşturmaya başladığı gözlenmiştir.	Merceron vd. 2015

Yukarıda özetlenen literatür bilgisi ışığında, bu tez çalışmasında biyobozunur, biyouyumlu, mekanik ve biyobozunma özellikleri bakımından doğal dokuyu taklit edebilecek nitelikte özgün termoplastik poliüretan (TPU) ve termoplastik poliüretan-üre (TPUU) polimerlerinin 3B biyoyazıcı kullanılarak paralel hizalanmış 3B doku iskelesi üretiminde kullanımları hedeflenmiştir. Sitotoksikite ve immun reaktivite özellikleri incelenen polimerler daha sonra *in vitro* ve *in vivo* ortamda etkinlik değerlendirmesine tabi tutulmuştur. *In vitro* ortamda, C2C12 miyoblast hücrelerinin 3B doku iskelelerinin üzerinde yayılımları, çoğalmaları ve miyotüp oluşturma etkinlikleri incelenmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise, 3B doku iskelelerinin büyük hacimli kas kaybı modelinde kas rejenerasyonuna etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasının özgün değeri;

- Mekanik (elastikiyet ve yorulma dayanımı) ve biyobozunma özellikleri doğal kas dokusuna benzetilmiş kas-spesifik yapıda özgün, elastik, TPU/TPUU-temelli biyomalzemelerin sentezlenmesi ve kas doku mühendisliğinde kullanımlarının gösterilmesi,
- 3B biyoyazıcı ile kas-spesifik mimaride 3B doku iskelesi üretilmesi ve etkinliklerinin gösterilmesi olarak sıralanabilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan malzemeler, temin edildikleri yerler ve kullanım amaçları **Çizelge 3.1**'de sunulmuştur. **Çizelge 3.2**'de TPU-1, TPUU-2 ve TPUU-3 sentezinde kullanılan reaktanların kimyasal yapıları verilmektedir.

Çizelge 3.1 Kullanılan malzemeler, temin edildikleri yerler ve kullanım amaçları.

Materyal	Marka/Firma	Kullanım Amacı
Polimer sentezi		
Poli(kaprolakton) (PCL) oligomeri ($M_a=2000$ g/mol)	Sigma Aldrich	Reaktan
Hekzametilen-1,6-diizosiyanat (HDI)	Perstorp	Reaktan
Amin uçlu poli(etilen oksit) (PEO) oligomeri ($M_a=600$ ve 2000 g/mol)	Jeffamine ED, Huntsman Ch	Reaktan
Dibutiltindilarat (T-12) (THF içerisinde %1, w/v)	Air Products	Katalizör
Tetrahidrofuran (THF)	Merck	Reaktif
İzopropil alkol (IPA)	Merck	Reaktif
Doku iskelesi üretimi		
Diklorometan (DCM)	Sigma-Aldrich	Çözücü
Tetrahidrofuran (THF)	Merck	Çözücü
Biyobozunma çalışmaları		
Lipaz (<i>Pseudomonas fluorescens</i> , >20,000 U/g)	Sigma-Aldrich	Enzimatik biyobozunma

Çizelge 3.1 Kullanılan malzemeler, temin edildikleri yerler ve kullanım amaçları (devamı)

<i>in vitro</i> çalışmalar		
<u>Hücre</u>		
L929 fare fibroblast hücre hattı	ATCC	Sitotoksosite testi
İnsan monositik lösemi THP-1 hücre hattı	ATCC	İmmün reaktivite testi
C2C12 fare miyoblast hücre hattı	ATCC	Hücre-malzeme etkileşimi çalışmaları
Yağ kaynaklı kök hücre (adipose-derived stem cells, ASCs)	Sıçan karın içi yağdan otolog izolasyon	in vivo çalışmalar
<u>Kültür ortamı (Medium)</u>		
Yüksek glukoz DMEM	Biological Ind.	C2C12 kültür ortamı
Fetal sığır serum (FBS)	Biological Ind.	C2C12 kültür ortamı
Penisilin/streptomisin	Biological Ind.	C2C12 kültür ortamı
RPMI-1640	Dutscher	THP-1 kültür ortamı
β -merkaptotanol	Life Cell Tech	THP-1 kültür ortamı
Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)	Sigma-Aldrich	THP-1 farklılaşma ortamı
Fibroblast büyüme faktörü (bFGF)	Sigma-Aldrich	ASC kültür ortamı
5-azasitidin	Sigma-Aldrich	ASC farklılaşma ortamı
Düşük glikoz DMEM	Biological Ind.	ASC farklılaşma ortamı
At serumu	Biological Ind.	ASC farklılaşma ortamı

Çizelge 3.1 Kullanılan malzemeler, temin edildikleri yerler ve kullanım amaçları
(devamı)

Trypsin	Biological Ind.	Hücre pasajlama
<u>Değerlendirme</u>		
Alamar Blue	Thermo Fisher	Hücre canlılığı analizi
Alexa Fluor 488 Phalloidin, DAPI	Thermo Fisher	Morfolojik incelemeler
Sığır serum albümini	Sigma-Aldrich	İmmunfloresan boyama
Triton X100	Merck	İmmunfloresan boyama
Paraformaldehit	Merck	Hücre fiksasyonu
Hemotoksilen & Eozin	Sigma-Aldrich	Histopatolojik değerlendirme
Masson's Trichrome	Sigma-Aldrich	Histopatolojik değerlendirme

Çizelge 3.2 TPU-1, TPUU-2 ve TPUU-3 sentezinde kullanılan reaktanların kimyasal yapıları

Reaktan	Kimyasal yapıları
HDI	$O=C=N-(CH_2)_6-N=C=O$
PCL2k	$HO-[-(CH_2)_5-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-]_x-(CH_2)_5-OH$
PEO	$H_2N-R-(CH_2-CH_2-O)_y-R-NH_2$

3.2 Yöntem

3.2.1 Poliüretan ve Poliüretan-Üre sentezi

Termoplastik poliüretan (TPU-1) ve termoplastik poliüretan-üre (TPUU-2 ve TPUU-3) sentezleri, Koç Üniversitesi Kimya Bölümü Polimer Araştırma Laboratuvarında Prof. Dr. İskender Yılğör ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Polimer sentezleri 150 mL hacminde 3 boyunlu, yuvarlak dipli Pyrex kaplar içerisinde ve iki basamaklı “ön-polimer” polimerizasyon yöntemi izlenerek gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta **Çizelge 3.3**'de verilen oranlarda PCL ve HDI reaktöre eklenmiş ve ağırlıkça %30'luk bir çözelti elde etmek için reaktanlar THF içerisinde çözülerek polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 70°C'de 150 ppm dibütilkalaydilatör'ün (T-12) (%1'lik THF çözeltisinde) katalitik etkisi altında gerçekleştirilmiştir. Sentezin ikinci basamağı olan “zincir uzaması” adımı, birinci basamakta elde edilen çözelti oda sıcaklığına getirilmiş ve IPA kullanılarak seyreltilmiştir. Çizelge 3.3'de verilen oranlara göre PEO-600 ve PEO-2000 reaktanları THF içerisinde çözülerek reaksiyon kabının üzerinden ekleme hunisi yardımı ile damla damla birinci basamakta elde edilen çözeltiye eklenmiştir. TPU-1 kodlu polimer stokiometrik miktarlarda PCL2k ve HDI kullanılarak tek basamakta gerçekleştirilmiş, zincir uzatıcı kullanılmamıştır. Polimerizasyonun ilerlemesi ve tamamlaması FTIR spektroskopisi ile izlenmiştir.

Polimerlerin sentezi tamamladıktan sonra, polimer solüsyonları Teflon kalıplara dökülmüş ve 24 saat süreyle çözücünün kontrollü buharlaşmasını sağlamak için oda sıcaklığında tutulmuştur. Bunu takiben, sabit ağırlık elde edilene kadar 60°C'de vakum fırınında kurutulmuştur. Elde edilen polimer film örnekleri, kapalı polietilen torbalarda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3 Sentezlenen polimerlerin kimyasal bileşimleri

Polimer kodları	PCL (wt%)	PEO (wt%) Mn(g/mol)	HDI (wt%)
TPU-1 (PCL2k/HDI)	91.6	--	8.4
TPUU-2 (PCL2k/PEO2k/HDI)	68.6	22.9 (2000)	8.5
TPUU-3 (PCL2k/PEO600/HDI)	61.8	26.0 (600)	12.2

3.2.2 Polimer Karakterizasyonu

3.2.2.1 Kimyasal karakterizasyon

FTIR spektrumları 4 cm^{-1} çözünürlükle 32 tarama yapılarak kaydedilmiştir (Thermo Scientific Nicolet Impact 400D Spektrometre). FTIR analizinde kullanılan ince polimer filmleri, polimer çözeltilerinin KBr diskler üzerine sürülüp çözücünün uzaklaştırılması ile hazırlanmıştır.

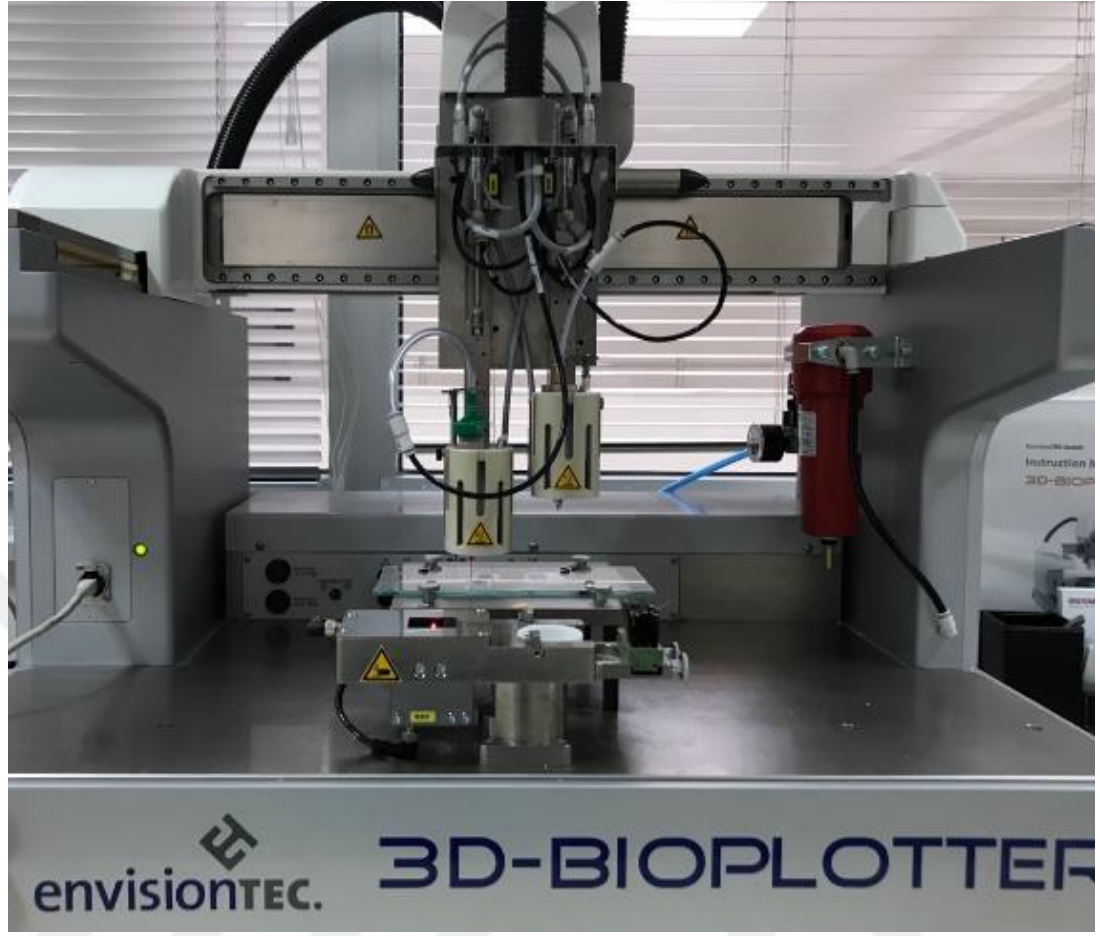
3.2.2.2 Isıl özelliklerin karakterizasyonu

TPU ve TPUU polimerlerinin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve kristalin erime sıcaklığı (T_m) Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC, TA Instruments Q100, ABD) ile azot atmosferinde, $10^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızında -150°C ile 200°C sıcaklık aralığında analiz edilmiştir.

3.2.3 Doku iskelesi üretimi

İskelet kası doku mühendisliği uygulamasında kullanılmak üzere hazırlanan doku iskeleleri, doğal kas yapısının taklit edilebilmesi amacıyla paralel hizalanmış fiber tasarımıyla 3B biyoyazıcı kullanılarak üretilmiştir. 3B baskılama ile üretilen doku iskelesinin hücre tutunmasına ve kas hücrelerinin morfolojisine etkisinin incelenmesi için karşılaştırma grubu olarak herhangi bir desene sahip olmayan filmler üretilmiştir.

3B biyoyazıcı ile doku iskelesi üretiminde baskı kalitesini etkileyen özelliklerin başında katılma süresi ve malzemelerin baskı anındaki reolojik özellikleri gelmektedir. Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen polimerler çözücüsünde çözülerek (ısıtıl işlem olmaksızın) 3B baskıda kullanılmıştır. Organik çözücü ile gerçekleştirilen 3B baskıda polimerlerin katılması çözücü uzaklaşma hızına bağlıdır. Bu nedenle, katılma süresini çözücü seçimi etkilemektedir. 3B doku iskelelerin üretiminde uygun çözücünün belirlenmesi için, sentez polimerlerinden TPUU-3, %70 (w/v) konsantrasyonda sırasıyla DCM, THF ve THF:IPA (1.5:1) ile çözülmüştür. Çözeltiler Envisiontec 3D Bioplotter Starter Series 3B biyoyazıcının düşük sıcaklık baskı kafaları kullanılarak paralel hizalanmış fiber tasarımıyla baskılanmıştır. Baskı, 37°C’de 1 bar basınçta ve 4 mm/s hızda gerçekleştirilmiştir (**Şekil 3.1**). Uygun çözücünün belirlenmesi için elde edilen 3B yapılar Zeiss marka ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

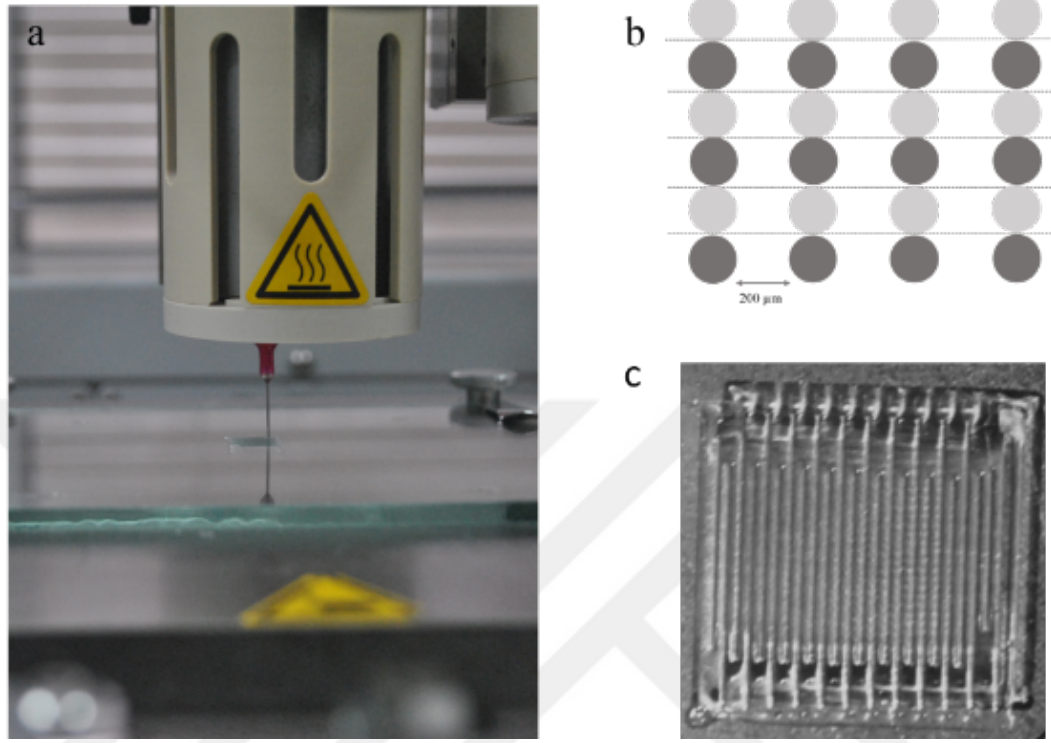


Şekil 3.1 3B doku iskelelerinin üretiminde kullanılan 3B biyoyazıcı ekipmanı ve bileşenleri.

Uygun çözücüye karar verildikten sonra, baskı kalitesini etkileyen diğer etmen olan malzemelerin reolojik özelliklerinin incelenmesi için farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış ve baskı kalitesine etkisi incelenmiştir. Polimerler %70 (w/v) konsantrasyonda DCM içerisinde çözülerek 3B baskılanmıştır. 3B baskıda kullanılan tasarım ve ölçü Şekil 3.2’de ve Çizelge 3.4’de sunulmuştur. 3B baskı 37°C’de 1 bar basınçta ve 4 mm/s hızda gerçekleştirilmiştir.

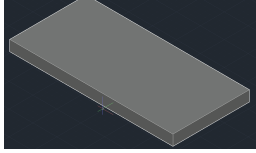
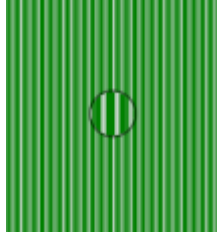
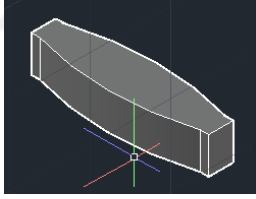
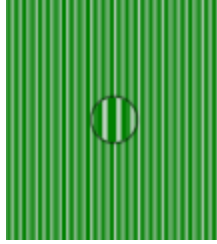
Tez çalışması kapsamında karşılaştırma grubu olarak kullanılan desensiz filmler, TPU-1, TPUU-2-3 ile PCL kullanılarak üretilmiştir. Bunun için, polimerler %10 (w/v) konsantrasyonda DCM içerisinde çözülmüş ve ardından cam petri kaplara dökülmüştür. Düzgün yüzey morfolojisi elde etmek için gerekli homojen ve yavaş çözücü uzaklaşması 24 saat süreyle oda sıcaklığında tutulma ile sağlanmıştır. Elde edilen polimer filmler

mekanik özelliklerinin incelenmesi ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere kullanıma kadar vakum desikatöründe saklanmıştır.



Şekil 3.2 Doku iskelesi üretimi. a) ilk katman üretimi, b) paralel hizalanmış fiberlerden oluşan tasarım c) 2 katman üretilmiş, paralel hizalanmış doku iskelesi

Çizelge 3.4 3B baskı parametreleri, 3B model ve 3B baskıda kullanılan modelin mimarisi

3B baskı parametreleri	3B model	3B baskıda kullanılan modelin mimarisi	3B doku iskelelerinin kullanıldığı çalışmalar
<u>3B model:</u> Üst üste biriktirilen paralel fiberler <u>Fiberler arası uzaklık:</u> 0.4 mm <u>Örnek eni:</u> 5 mm <u>Örnek boyu:</u> 10 mm			Doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin karakterizasyonu Doku iskelelerinde immün uyumluluk incelenmesi Doku iskeleleri üzerine hücre ekimi çalışmalarında
<u>3B model:</u> Mekik <u>Fiberler arası uzaklık:</u> 0.4 mm <u>Örnek boyu:</u> 16,5 mm			<i>in vivo</i> çalışma

3.2.4 Doku iskelelerinin yapısal karakterizasyonu

Doku iskelelerin yapısal özellikleri ODTÜ Merkez Laboratuvarında bulunan QUANTA 400F Field Emission (SEM) taramalı elektron mikroskop ile incelenmiştir. Doku iskeleleri vakum ortamında altın-paladyum tabakası ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri alınmıştır.

3.2.4.1 Biyobozunma davranışının incelenmesi

Doku iskelelerinin hidrolitik ve enzimatik biyobozunma davranışları incelenmiştir (n=3). Hidrolitik biyobozunma hücre kültürü ortamında (yüksek glikozlu DMEM içerisinde %10 FBS ve %1 P/S), enzimatik biyobozunma ise 1 mg/mL lipaz içeren PBS çözeltisi içerisinde 37°C’de gerçekleştirilmiştir. Her iki koşulda çözeltiler haftada bir tazelenmiştir. Biyobozunma davranışı % ağırlık kaybı hesaplanarak ve yüzey morfolojisindeki değişimler SEM ile gözlenerek incelenmiştir.

$$\% \text{ Ağırlık Kaybı} = \frac{M_o - M_i}{M_o} * 100 \quad (3.1)$$

M_o : Doku iskelelerinin ilk tartımı (mg).

M_i : Doku iskelelerinden çeşitli zaman aralıklarında kurutulup alınan tartımlar (mg).

3.2.5 Doku iskelelerinin mekanik karakterizasyonu

Doku iskelelerinin mekanik özellikleri, çekme testi uygulanarak incelenmiştir (**Şekil 3.3**). Çekme testi Shimadzu marka AGS-X model elektromekanik test cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 3B baskılanan ve film olarak hazırlanan doku iskelelerinin mekanik özellikleri karşılaştırılmıştır. Çekme testi 5 kN yük altında, 10 mm/dk hızla, oda sıcaklığında uygulanmıştır. Çekme testi sonucunda örneklerle uygulanan çekme yükü ve örneklerde meydana gelen uzama miktarı zamana bağlı olarak kaydedilmiştir.

Elde edilen verilerden yararlanarak mühendislik gerilmesi-mühendislik gerinmesi eğrisi (σ - ϵ) elde edilmiştir. Mühendislik gerilmesi;

$$\sigma = \frac{F}{A_o} \quad (3.2)$$

F uygulanan yükü ifade etmektedir, A_o doku iskelesinin kesit alanını ifade etmektedir. Mühendislik gerinmesi;

$$\epsilon = \frac{l_i - l_o}{l_o} \quad (3.3)$$

l_i doku iskelelerin ilk uzunlukları , l_o uzama sonucunda ki uzunluğunu ifade etmektedir.

Doku iskelelerin esneklik (Young) modülü mühendislik gerilmesi ve mühendislik gerinmesi eğrisi yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\sigma = E \epsilon \quad (3.4)$$

E esneklik modülü ifade etmektedir.

Doku iskelelerin yüzde kopma uzaması (KU%) doku iskelelerinin boyunda meydana gelen en yüksek yüzde plastik uzama oranı ile hesaplanmıştır.

$$\Delta l = l_k - l_o \quad (3.5)$$

Doku iskelelerinin; l_o ilk uzunluklarını, l_k kırılma anındaki uzunluklarını ifade etmektedir.

$$KU (\%) = \frac{\Delta l}{l_o} \times 100 \quad (3.6)$$



Şekil 3.3 Çekme çeneleri arasında a) Film b) 3B baskılanmış doku iskelesi örneklerinin görüntüsü.

3.2.6 *in vitro* alışmalar

3.2.6.1 Sitotoksisite testi

Üretilen doku iskelelerinin biyoyumluluğunun, yani biyolojik olarak zararlı olabilecek ekstraktlar salıp salmadığının belirlenebilmesi için ilk aşama olarak indirekt sitotoksisite testi uygulaması yapılmıştır. Polimerlerin biyoyumluluğu ISO 10993/EN 30993 ile belirlenmiş MEM-ekstraksiyon testi uyarınca değerlendirilmiştir. Deneyde kullanılan 4 grup sırasıyla, TPU-1, TPUU-3, pozitif kontrol (UHMWPE) ve negatif kontrol (lateks) olarak belirlenmiştir. Örnekler 1 cm x 1 cm boyutlarında şekillendirilerek steril falcon tüpler içerisine yerleştirilmiştir. Sterilizasyon 20 dakika süreyle %70 (v/v) etil alkol ile muamele ardından 30 dk süreyle UV ışması ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler daha sonra 24 saat süreyle PBS ile yıkamıştır. Ekstraksiyon sıvısı olarak standart hücre kültür ortamı kullanılmıştır. Kullanılan ortamın bileşimi şu şekildedir: yüksek glukozlu DMEM içerisinde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin. Örnekler 10'ar mL ekstraksiyon sıvısı içine alınmış ve 37°C'de 24 saat süreyle 60 rpm'de sürekli çalkalama altında tutulmuştur. 24 saat sonunda ekstraksiyon sıvısı 0.2 µm membran filtreden geçirilerek steril 50 mL falcon tüpler içine toplanmıştır.

Sitotoksisite testinde L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Pasaj 19 L929 hücreleri çözülerek standart hücre kültür ortamı içerisinde T175 flasklara alınmıştır. 24 saat boyunca standart kültür şartlarında (37°C, %5 CO₂ ve nem) inkübatör içerisinde kültür edilen hücreler daha sonra tripsin uygulaması ile flasktan kaldırılmış ve 10.000 hücre/cm² konsantrasyonunda (24 kuyucuklu kabın için 20.000 hücre) ve her bir grup için 3 tekrar olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. 24 saat süreyle standart kültür şartlarında kültür edilen hücreler yaklaşık %70 konfluent duruma gelince mikroskop ile morfolojik değerlendirmeleri yapılmış ve ardından ekstraksiyon sıvıları 500 µL/kuyucuk olacak şekilde hücre tabakalarının üzerine eklenmiştir. Ekstraksiyon sıvılarının eklenmesinden 24, 48 ve 72 saat sonra hücre tabakasının yayılımı (confluency), ölü hücre miktarı ve hücre morfolojisindeki değişimler mikroskopik inceleme ile değerlendirilmiştir. 72 saatin sonunda kuyucuklarda bulunan canlı hücre

sayısı AlamarBlue® yöntemi ile belirlenmiştir (Alamar Blue testi Bölüm 3.2.6.6’da açıklanmıştır.).

Mikroskopik inceleme ve hücre sayımından elde edilen veriler negatif kontrol grubuna göre düzeltilmiş ve **Çizelge 3.5**'de verilen değerlendirme kriterlerine göre notlandırılmıştır. İlk üç kriterden (hücre tabakasının yayılımı, ölü hücre miktarı ve hücre morfolojisindeki değişim) elde edilen notların ortalaması alınmıştır. Bu ortalama not, son kriterden (hücre büyümesi inhibisyonu) alınan not ile toplanarak 0-8 arasında değişen son sitotoksik cevap indeks değerinin elde edilmesinde kullanılmıştır (**Çizelge 3.6**). Elde edilen bu değer üretilen malzemenin sitotoksik olup olmadığının değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.5 Sitotoksikite testi değerlendirme kriterleri

	Değerlendirme kriteri	Not
Hücre tabakası yayılımı (confluency)	%100	0
	%90-100	1
	%60-90	2
	%30-60	3
	%0-30	4
Ölü hücre miktarı (yüzen hücreler)	Hiç görülmedi	0
	%0-5	1
	%5-10	2
	%10-20	3
	≥ %20	4

Çizelge 3.6 Sitotoksisite testi değerlendirme kriterleri (devamı)

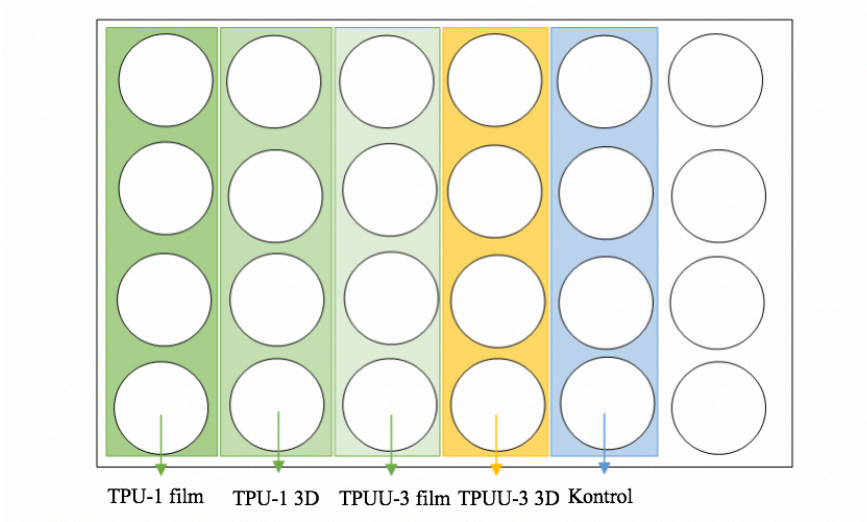
Hücre morfolojisindeki değişim	Değişim gözlenmedi	0
	Az değişim var, az sayıda hücre etkilendi	1
	Orta seviyede değişim var, bazı hücrelerin morfolojisinde değişim gözlendi	2
	Orta seviyede değişim var, birçok hücrenin morfolojisinde değişim gözlendi	3
	Yüksek seviyede değişim var, tüm hücrelerin morfolojisinde değişim gözlendi	4
Hücre büyümesi inhibisyonu	%0-10	0
	%10-30	1
	%30-50	2
	%50-70	3
	%70-100	4

Çizelge 3.6 Sitotoksik cevap indeksi ve sitotoksisite değerlendirmesi

Sitotoksik cevap indeksi	Reaktivite	"Malzeme Sitotoksiktir"
0-1	Yok	Hayır
1-3	Az	Hayır
3-5	Orta	Yeniden değerlendirilmeli
5-7	Fazla	Evet
7-8	Çok	Evet

3.2.6.2 Doku iskelelerinde immun uyumluluk incelenmesi

Film ve 3B baskılanmış doku iskelelerinin THP-1 monosit farklılaşmasına ve makrofaj yapışmasına etkileri incelenmiştir. Bunun için, donmuş durumda sıvı azot tankında saklanan THP-1 hücreleri çözülerek %10 FBS, %1 P/S içeren RPMI-1640 içerisinde T175 flasklara alınmıştır ve hücreler %70 konfluent duruma gelinceye kadar kültürlenmiştir. Hücreler 50.000 hücre/doku iskelesi konsantrasyonunda 50 µL hücre süspansiyonu halinde 3 tekrar olacak şekilde steril doku iskelelerine ekilmiştir. Doku iskelelerinin sterilizasyonu Bölüm 3.2.6.1’de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan 5 grup sırasıyla; TPU-1 film, TPU-1 3B doku iskelesi, TPUU-3 film, TPUU-3 3B doku iskelesi ve kontrol grubu (TCP) olarak uygulanmıştır (**Şekil 3.4**). 24 saat süreyle kültürlen hücrelerin, deney süresi sonunda faz kontrast mikroskopi ile görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 THP-1 monosit farklılaşma deney grupları

Hücre canlılığının incelenmesi için Alamar Blue testi uygulanmıştır (Alamar Blue testi Bölüm 3.2.6.6’da açıklanmıştır.). Sonrasında doku iskeleleri SEM incelemesi için %4 konsantrasyonda (v/v) formaldehit ile fikse edilmiştir.

3B doku iskelelerinin makrofaj yapışmasına etkisinin incelenmesi için THP-1 makrofajların örneklerle ekimi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, THP-1 hücreleri 50 ng/mL

PMA içeren RPMI içerisinde 24 saat süreyle kültürlenerek makrofaj benzeri davranış sergilemeleri sağlanmıştır ve TCP yüzeyine tutunmuştur. 24 saatin sonunda yüzeye tutunan hücreler tripsinizasyon ile toplanarak 50.000 hücre/doku iskelesi konsantrasyonunda ve 50 µL hücre süspansiyonu halinde 3 tekrar olacak şekilde doku iskelelerine ekilmiştir. Kültürün 1. ve 3. günlerinde doku iskelelerinin faz kontrast mikroskopi ile görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığının belirlenmesi için Alamar Blue testi uygulanmıştır. 3. günün sonunda doku iskeleleri SEM incelemesi için %4 konsantrasyonda (v/v) formaldehit ile fikse edilmiştir.

3.2.6.3 C2C12 hücreleri kültürü

Bu tez çalışmasında, sentezlenen polimerlerin *in vitro* kas doku mühendisliğine yönelik incelemeleri C2C12 fare miyoblast hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıvı azot tankında bulunan C2C12 hücreleri çözülerek standart hücre kültür ortamı içerisinde T175 hücre kültürü kaplarına alınmıştır. 24-48 saat sonra flasttaki ortam yenisi ile değiştirilmiş, ve hücreler %80-90 konfluent duruma gelene kadar her iki günde bir ortam değişimi tekrarlanarak kültür edilmiştir. Hücreler %10 DMSO, %50 DMEM ve %40 FBS içeren dondurma çözeltisi içerisinde sıvı azot tankında kullanıma kadar saklanmış ve depolanmıştır.

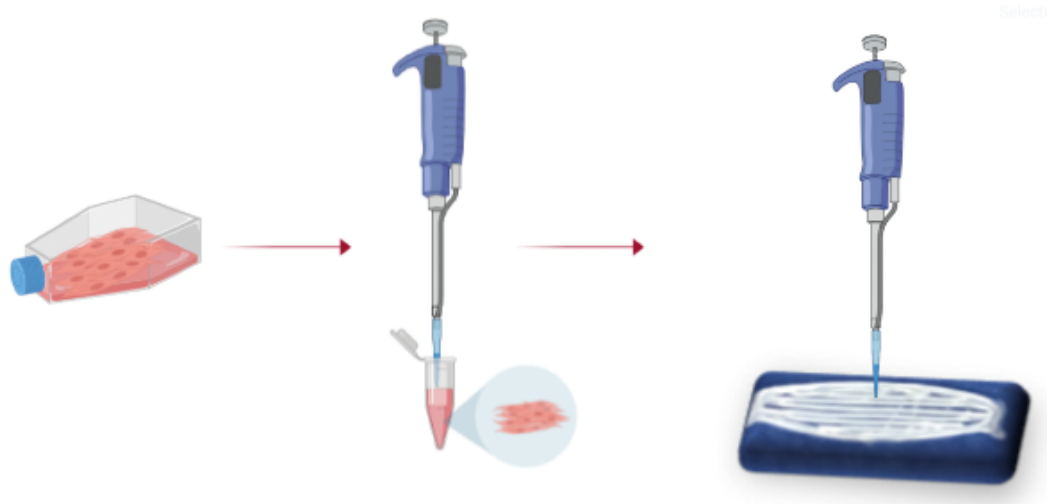
3.2.6.4 ASC hücrelerinin izolasyonu ve kültürü

in vivo çalışmada kullanılan yağ kaynaklı kök hücreler (ASC) sıçanların karın içi yağ kitlelerinden izole edilmiştir. Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun izni uyarınca sıçanların karın içinden toplanan yağ dokuları PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra bisturi yardımıyla mekanik olarak parçalanmıştır. Takiben, dokunun enzimatik parçalanması için kollajenaz çözeltisi (PBS içerisinde 0.1% kollajenaz tip I, 1% bovine serum albümin, 2 mM CaCl₂) eklenerek 2 saat süreyle 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. 2 saat sonunda alınan tüpler 300 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemlerinin ardından serolojik pipet yardımı ile üst katmanlarda biriken yağ ve PBS ile orta katmanda biriken kollajenaz atılmıştır. Santrifüj işlemi sonucu oluşan hücre pelleti PBS içerisinde tekrar dağıtılmıştır. Hücre süspansiyonu 100 µm

boyutlu steril hücre eleğinden geçirilerek temiz 50 mL falkon tüpler içerisine toplanmıştır. 300 g'de 5 dakika santrifüjün ardından tekrar beliren yağ ve sulu tabakalar atılmıştır. Bu işlem iki kere tekrarlanmıştır. Devamında hücre pelleti kültür ortamı içerisinde dağıtılıp T175 hücre kültürü kaplarına aktarılmıştır. ASC hücreleri için kullanılan çoğalma kültür ortamı şu şekilde hazırlanmıştır: Yüksek glikozlu DMEM içerisinde %10 FBS (BI, İsrail), %1 penisilin/streptomisin (P/S) (Lonza, ABD) 1 ng/mL FGF-2 (Sigma, ABD). ASC hücreleri %80-90 konfluent duruma gelene kadar her iki günde bir ortam değişimi tekrarlanarak kültür edilmiştir. Hücreler %10 DMSO, %50 DMEM ve %40 FBS içeren dondurma çözeltisi içerisinde sıvı azot tankında kullanıma kadar saklanmış ve depolanmıştır.

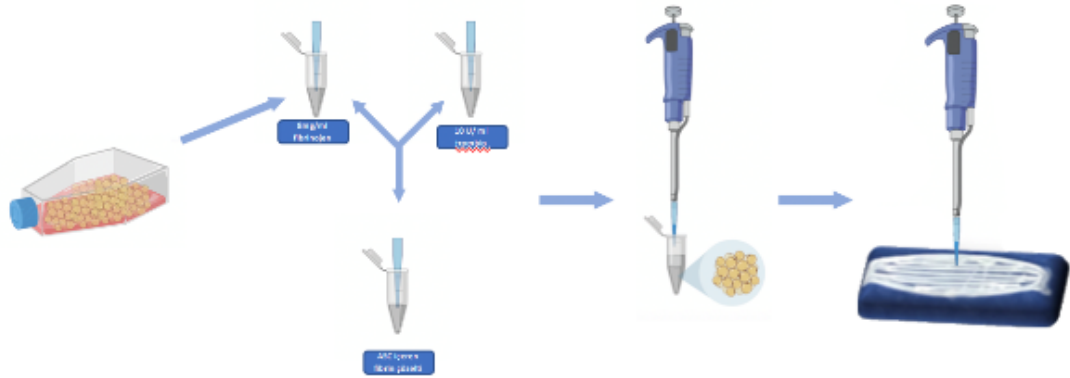
3.2.6.5 Doku iskeleleri üzerine hücre ekimi

Bölüm 3.2.6.1’de açıklandığı şekilde steril edilen doku iskelelerine *in vitro* inceleme için 100.000 hücre/örnek konsantrasyonda hücre ekimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Hücre kültürü standart kültür ortamında sürdürülmüştür. Doku iskeleleri üzerinde kültür süresince canlı hücre sayısı Alamar Blue testi ile belirlenmiş, hücrelerin morfolojik değerlendirmesi için phalloidin/DAPI boyaması ve SEM incelemesi yapılmıştır (ilgili yöntemler 3.2.6.7 ve 3.2.6.8’de açıklanmaktadır).

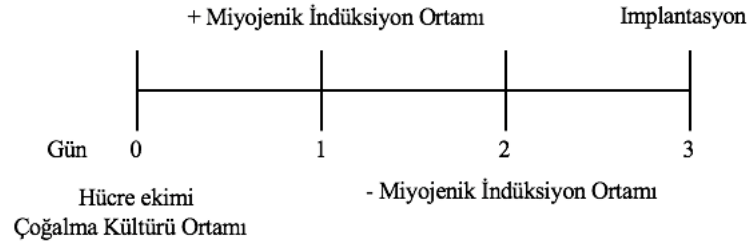


Şekil 3.5 Doku iskelelerine C2C12 hücre ekiminin şematik gösterimi.

Primer kas hücrelerinin izolasyon ve kültüründe yaşanan zorluklar nedeniyle, bu çalışma kapsamında primer kas hücreleri in vivo çalışmada tercih edilmemiştir. Buna alternatif olarak, vücutta görece çok miktarda bulunan yağ dokusundan yüksek verimle izole edilen ve dinamik kültürü neticesinde miyojenik farklılaşma potansiyelleri önceki çalışmalarımızda gösterilen yağ kaynaklı kök hücreler tercih edilmiştir. Hücre izolasyonu Bölüm 3.2.6.4 açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. İzolasyonun ardından pasaj 3 ASC hücreleri 106 hücre/örnek konsantrasyonda 3B doku iskelelerine ekilmiştir. Ekim için, fibrinojen 8 mg/mL derişiminde PBS ile çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan fibrinojen çözeltisi ile hücre peleti karıştırıldıktan sonra 10 U/mL trombin ile fibrinojen çözeltisinin çapraz bağlanması sağlanarak 60µl'lik fibrin çözeltilerinin 3B doku iskelelerine hücre ekim işlemi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 3.6**). Hücre ekilen doku iskeleleri 24 saat çoğalma kültürü ortamında kültürlenmiştir. Daha sonra kültür miyojenik indüksiyon ortamında (düşük glikozlu DMEM içerisinde %1 FBS, %5 at serumu %1 penisilin/streptomisin ve 10µM 5-azasitidin) 24 saat süreyle tutulmuştur. Hücre ekimini takip eden 3. günde doku iskeleleri sıçanların sol tibialis anterior kaslarında oluşturulan defekte implante edilmiştir (**Şekil 3.7**). Hücreli doku iskelesinin implantasyonu Bölüm 3.2.7.1'de açıklanmaktadır.



Şekil 3.6 Doku iskelelerine ASC hücre ekimi



Şekil 3.7 ASC hücreli 3B doku iskelelerine miyojenik indüksiyon ortamının uygulanma zaman çizelgesi

3.2.6.6 Alamar Blue testi

Alamar Blue testinin amacı hücre canlılığı ve metabolizmasına etki etmeden metabolik aktivitenin belirlenebilmesidir. Sitotoksite testinde, immün uyumluluk testinde ve kültür süresince doku iskeleleri üzerinde bulunan canlı (metabolik olarak aktif) hücre sayısı Alamar Blue testi ile belirlenmiştir. Kısaca, kuyucuklar içerisindeki ortam uzaklaştırılıp steril PBS ile yıkamanın ardından renksiz DMEM içerisinde %10 derişimde hazırlanmış olan Alamar Blue çözeltisi kuyucuklara eklenmiştir. 1 saat süreyle 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübatör içerisinde ve ışıktan koruyarak inkübasyon yapılmıştır. 1 saatin sonunda her kuyucuktan 200 µL test örneği alınarak 96 kuyucuklu mikropalakalara aktarılmıştır. 570 nm ve 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri mikropalaka okuyucusu ile belirlenmiştir. Tüm işlemler steril koşullarda gerçekleştirilmiş ve her okuma en az üç kuyucuktan yapılmıştır. Alamar Blue boyasının absorbans değerleri üzerinden belirlenen redüksiyon miktarı bir kalibrasyon eğrisi (EK 1-2-3) yardımıyla canlı hücre sayısına çevrilmiştir. Redüksiyon miktarı Eşitlik 3.7 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Redüksiyon (\%)} = \frac{(\epsilon_{ox})_{\lambda_2} \cdot A_{\lambda_1} - (\epsilon_{ox})_{\lambda_1} \cdot A_{\lambda_2}}{(\epsilon_{RED})_{\lambda_1} \cdot A'_{\lambda_2} - (\epsilon_{RED})_{\lambda_1} \cdot A'_{\lambda_1}} \quad (3.7)$$

ϵ_{ox} = okside edilmiş formda (mavi) molar sönme katsayısı

ϵ_{RED} = indirgenmiş formda (kırmızı) molar sönme katsayısı

A = Örneklerin absorbans değeri

A' = Negatif kontrol kuyularının absorbans değeri

λ_1 = 570 nm

λ_2 = 595 nm

% redüksiyonu canlı hücre sayısı ile ilişkilendirmek için, bilinen hücre sayıları ile % redüksiyon ilişkisini veren bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (EK 1,2,3).

3.2.6.7 Phalloidin/DAPI boyaması

Doku iskeleleri üzerinde hücrelerin yayılımının ve morfolojilerinin incelenmesi için Phalloidin/DAPI boyaması yapılmıştır. Kültürün 3. ve 7. günlerinde hücreli doku iskeleleri %3.7 (w/v) derişimde formaldehit çözeltisi kullanılarak 30 dakika boyunca oda sıcaklığında fikslenmiştir. Fikslenen örnekler 2 kez PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra Triton X içerisinde 5 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Boyama sırasında spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için Triton X ile muamele edilen doku iskeleleri 30 dakika %1 BSA içerisinde 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübatörde tutulmuştur. BSA ile muamele edilen doku iskelelerinin üzerine Phalloidin boyası eklenip 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda 2 kez PBS ile yıkanan doku iskelelerin üzerine DAPI eklenip 5 dk oda sıcaklığında beklemenin ardından lazer taramalı konfokal mikroskop (Leica) ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.8 Taramalı elektron mikroskopi incelemesi

Doku iskeleleri kültür ortamından çıkarıldıktan sonra 2 kez 2 mL PIPES tamponu ile yıkandıktan sonra %3,7 (w/v) derişimde formaldehit çözeltisi kullanılarak 30 dk boyunca oda sıcaklığında fikslenmiştir. Fikse edilen örnekler 2 kez 2 mL PIPES tampon kullanılarak yıkanmıştır. PIPES tampon içerisinde SEM incelemesine kadar +4°C’de saklanmışlardır. SEM incelemesi öncesi suyun uzaklaştırılması için örnekler sırasıyla 20’şer dakika boyunca %30, %50, %70, %90 ve %100 (v/v) derişimde etanol çözeltisinden geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. SEM incelemesi ODTÜ Merkez Laboratuvarda örnekler Au/Pt ile kaplandıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 *in vivo* çalışmalar

Bu tez kapsamında, mekanik özellikler bakımından en uygun olduğu belirlenen TPUU-3 polimeri kullanılarak üretilen doku iskelelerin kas rejenerasyonuna etkisi *in vivo* koşullarda incelenmiştir. Doku iskelelerinin *in vivo* incelemesi sıçan tibialis anterior kası defektine implantasyon ile gerçekleştirilmiştir. *in vivo* değerlendirme 3 deneysel grup kullanılarak yapılmıştır (**Çizelge 3.7**).

Çizelge 3.7 TPUU-3 doku iskelelerinin *in vivo* değerlendirme deney grupları

Grup	Grup Kodu
Hasarlı doku (negatif kontrol)	Sham
Hücresiz doku iskelesi	TPUU-3
Hücreli doku iskelesi	TPUU-3+ASC

Kas defektine implantasyon, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çağdaş Oto tarafından gerçekleştirilmiştir (n=5).

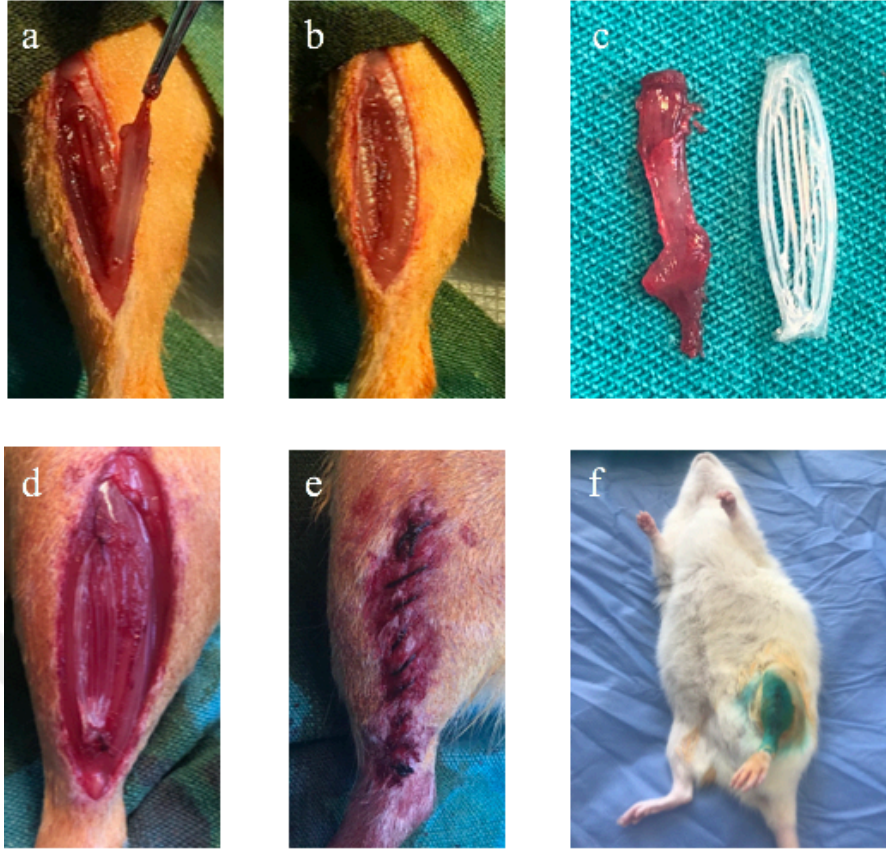
3.2.7.1 İmplantasyon

İmplantasyon işlemlerinden önce deney hayvanlarına Ketamin + Ksilazin kombinasyonu (im) kullanılarak genel anestezi uygulanmış ve sol arka ayakları tıraş edilmiştir. Tibialis anterior kasında hacimsel olarak yaklaşık %20'lik bir hasar oluşturulmuştur. 3 deney grubunun implantasyonu **Çizelge 3.8**'de açıklanmaktadır (**Şekil 3.8**).

Çizelge 3.8 TPUU-3 doku iskelelerinin implantasyonu

Deney Grubu	İmplantasyon
Sham	%20'lik hasar oluşturulan bölgeye hiçbir tedavi uygulanmadan fasya ve cilt dikiş ile kapatılmıştır.
TPUU-3	%20 kas hasarı oluşturulan bölgeye steril hücresiz 3B doku iskelesi iki uç noktalarından sütürlenerek sabitlenmiş, fasya ve cilt dikiş ile kapatılmıştır.
TPUU-3+ASC	%20 kas hasarı oluşturulan bölgeye steril hücreli 3B doku iskelesi iki uç noktalarında sütürlenerek sabitlenmiş, fasya ve cilt dikiş ile kapatılmıştır (Şekil 3.8).

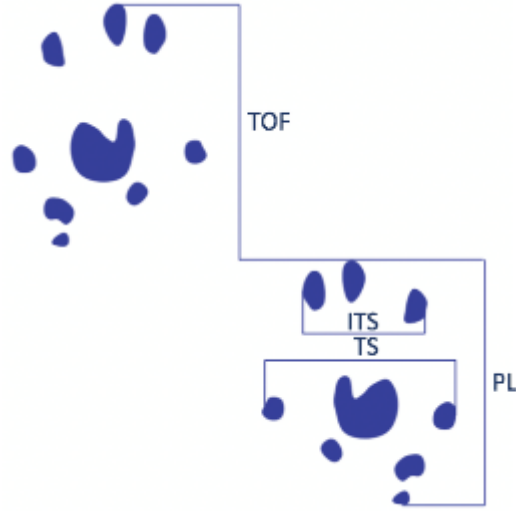
Operasyon yapılan bütün hayvanlara 4 hafta sonunda yüksek dozda anestezi ile ötenazi uygulanmıştır. Ötenazi sonrasında histopatolojik inceleme için, operasyon bölgelerinden alınan dokular %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda fikse edilmiştir.



Şekil 3.8 a) kas hasarının oluşturulması b) kas hasarı c) doku iskelesi ve çıkarılan kas kütlesi d) 3B doku iskelesinin hasarlı bölgeye implante edilmesi e-f) yara bölgesinin kapatılması.

3.2.7.2 Yürüme testi

Operasyon sonrası hayvanların tibial kaslarındaki fonksiyon değerlendirmesi için yürüme testi yapılmıştır. Yürüme testi sonucunda siyatik fonksiyon indeksi ve tibial fonksiyon indeksi hesaplanarak yorumlanmıştır. 4. haftanın sonunda ayakları mavi boya ile boyanan sıçanlar dar kapalı bir alanda yürütülerek ayak izleri alınmıştır. Şekil 3.9’de gösterildiği gibi ayak izlerinin arasındaki uzaklık ilişkileri ile, eşitlik 3.8 ve eşitlik 3.9 kullanılarak siyatik fonksiyon indeksi ve tibial fonksiyon indeksi hesaplanmıştır (Sarıkcioglu vd. 2008).



Şekil 3.9 Ayak izi arasındaki uzaklık ilişkileri

$$SFI = -38.3\left(\frac{EPL-NPL}{NPL}\right) + 109.5\left(\frac{ETS-NTS}{NTS}\right) + 13.3\left(\frac{EIT-NIT}{NIT}\right) - 8.8 \quad (3.8)$$

$$TFI = -37.2\left(\frac{EPL-NPL}{NPL}\right) + 104.4\left(\frac{ETS-NTS}{NTS}\right) + 45.6\left(\frac{EIT-NIT}{NIT}\right) - 8.8 \quad (3.9)$$

EPL= Deney sırasında hayvanın topuk-üçüncü ayak parmağı arası ayak izi mesafesi

NPL = Hayvanlar sabitken topuk-üçüncü ayak parmağı arası ayak izi mesafesi

ETS = Deney sırasında hayvanın birinci-beşinci ayak parmağı arası ayak izi mesafesi

NTS = Hayvanlar sabitken birinci-beşinci ayak parmağı arası ayak izi mesafesi

EIT = Deney sırasında hayvanın ikinci-dördüncü ayak parmağı arası ayak izi mesafesi

NIT= Hayvanlar sabitken ikinci-dördüncü ayak parmağı arası ayak izi mesafesi

3.2.7.3 Histopatolojik değerlendirme

4 hafta sonunda operasyon bölgeleri %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda tespit edildikten sonra, akan musluk suyu altında yıkamaya bırakılmıştır. Otomatik rutin takip cihazında (Leica TP1020) alkol, ksilol ve parafin serilerinden geçirilmiştir. Sonrasında hazırlanan parafin bloklardan (Thermo Fisher Histocentre 3) 5 um kalınlıkta

kesitler mikrotom cihazı ile alınarak (LEICA RM2125) otomatik boyama makinesinde (Leica Autostainer XL) Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanmıştır. Deparafinizasyon ve dehidrasyon amacıyla sırayla 3 kez ksilolde 5'er dakika ve alkol serilerinde (%100, %96, %70, %50'lik alkol) 3'er dk bekletilmiştir. Kesitler Harris'in Hematoksilen-Eozin yöntemine göre boyanmış, tekrar alkol serilerde dehidrate edilip ksilolden geçirilmiş ve entellan yardımıyla lamel ile kapatılmıştır. Histopatolojik boyamalar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Dr. Yanad Abou Monsef tarafından gerçekleştirilmiştir.

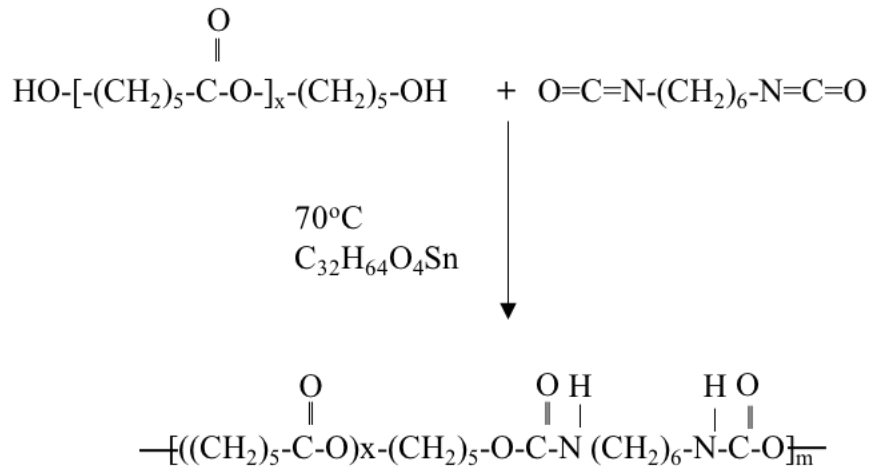


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

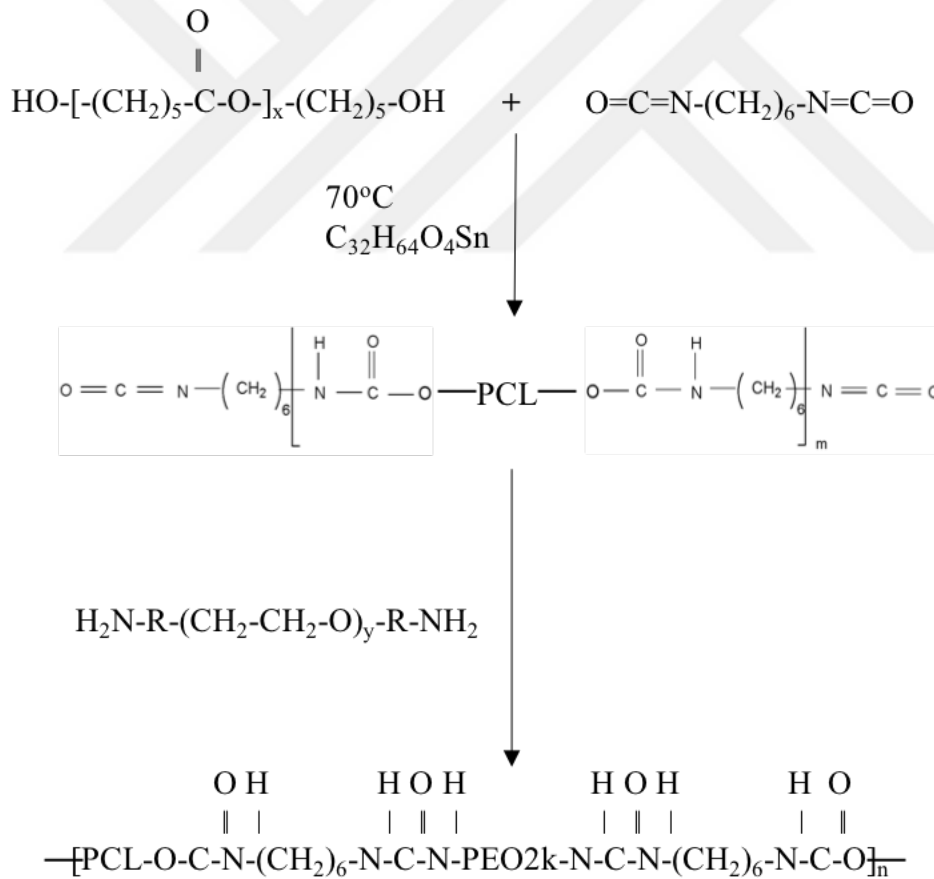
4.1 Poliüretan ve Poliüretan-Üre Sentezi Bulguları

Bu tez çalışmasında kullanılan özgün termoplastik poliüretan (TPU1) poliüretan-üre (TPUU-2-3) polimerleri, Koç Üniversitesi Kimya Bölümünde Polimer Araştırma Grubu tarafından üretilmiştir. Biyouyumlu, biyobozunur ve doğal iskelet kası dokusunu taklit edebilecek elastomerik özellikte TPU ve TPUU sentezlenmesi hedeflenmiştir. Bu hedefler kapsamında Bu hedefler kapsamında Çizelge 3.2’de gösterildiği üzere TPUU sentezlerinde yumuşak kısımlar olarak ağırlıkça %60-70 oranında polikaprolakton oligomeri (PCL) (2000 g/mol) ve %23-26 oranında farklı molekül ağırlığına sahip amin uçlu poli(etilen oksit) oligomerleri (PEO) (600 ve 2000 g/mol) kullanılmıştır. TPUU kopolimerleri sert kısım olarak ağırlıkça %8,4 ve %12 hekzametilen-1,6-diizosiyanat (HDI) içermektedir.

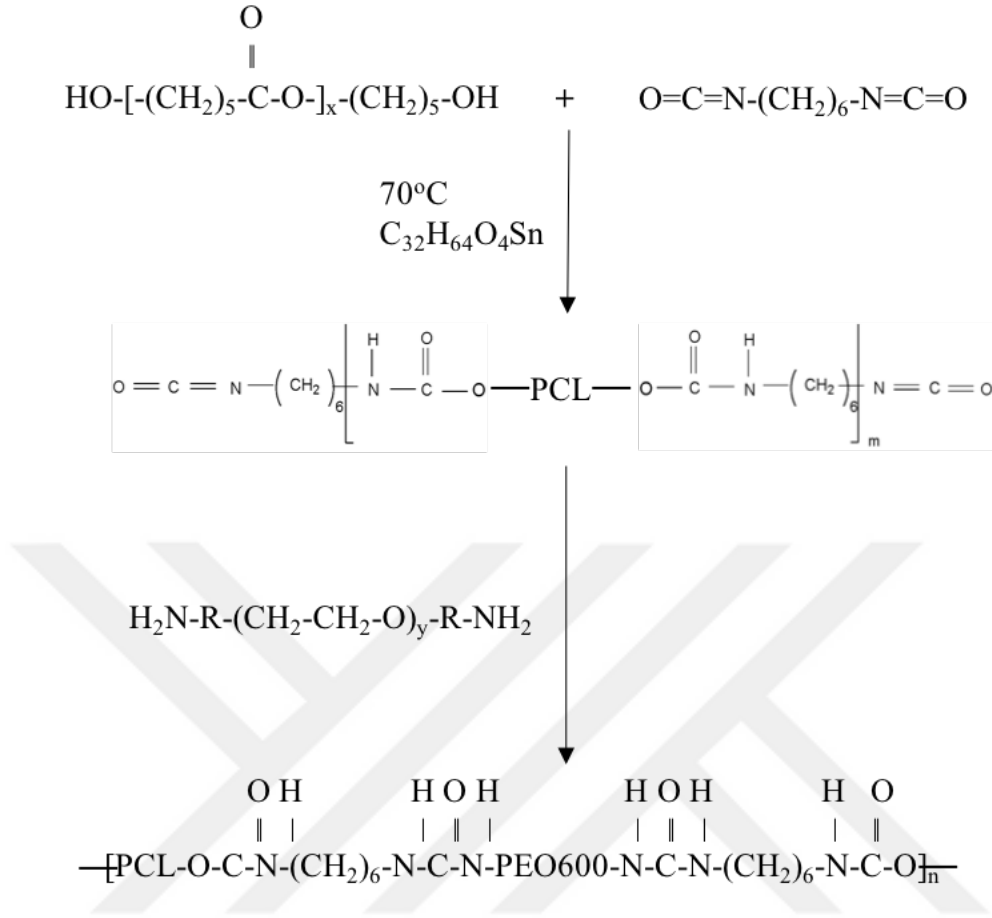
Bölüm 3.2.1 Poliüretan ve Poliüretan-üre Sentezi Bölümünde de belirtildiği gibi, TPUU’lar iki basamaklı “ön-polimer” sentezi yöntemi ile sentezlenmiştir. Zincir uzatma sırasında yüksek polariteye sahip üre grupları kopolimer zincirlere katılır. Üre grupların güçlü hidrojen bağlanma yeteneği, polimerizasyon reaksiyonu sırasında fiziksel jelleşmeye neden olarak yüksek molekül ağırlıklı TPUU polimerleri hazırlanmasını engelleyebilir (Dusek vd 1990 ve Yılgör vd 2004). Bu problemi önlemek için, bu çalışmada yüksek polariteye sahip izopropil alkol (IPA) kullanılarak zincir uzatma adımından önce ön-polimer çözeltisi seyreltilmiştir. TPU-1 ve TPUU-2-3 polimerlerine ait sentez reaksiyonu **Şekil 4.1** ve **2**’de verilmiştir.



Şekil 4.1 TPU-1 polimerine ait polikondenzasyon reaksiyonu ve koşulları.



Şekil 4.2 TPUU-2 polimerine ait polikondenzasyon reaksiyonu ve koşulları.



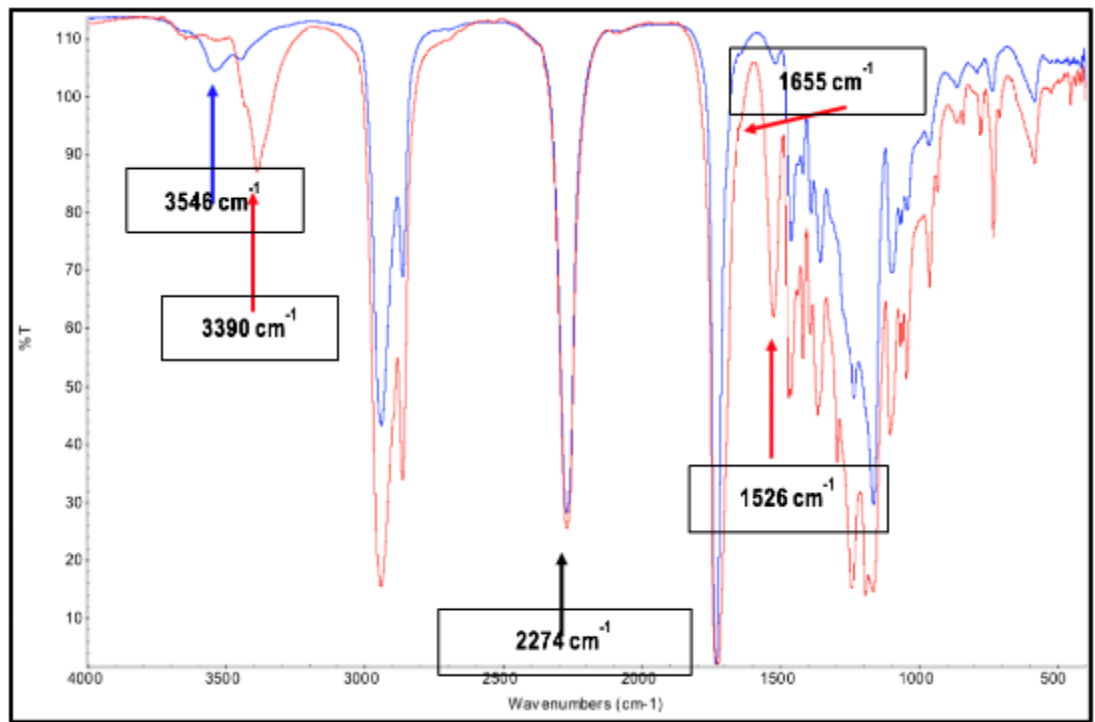
Şekil 4.3 TPUU-3 poimerine ait polikondenzasyon reaksiyonu ve koşulları.

4.2 Polimer Karakterizasyon Bulguları

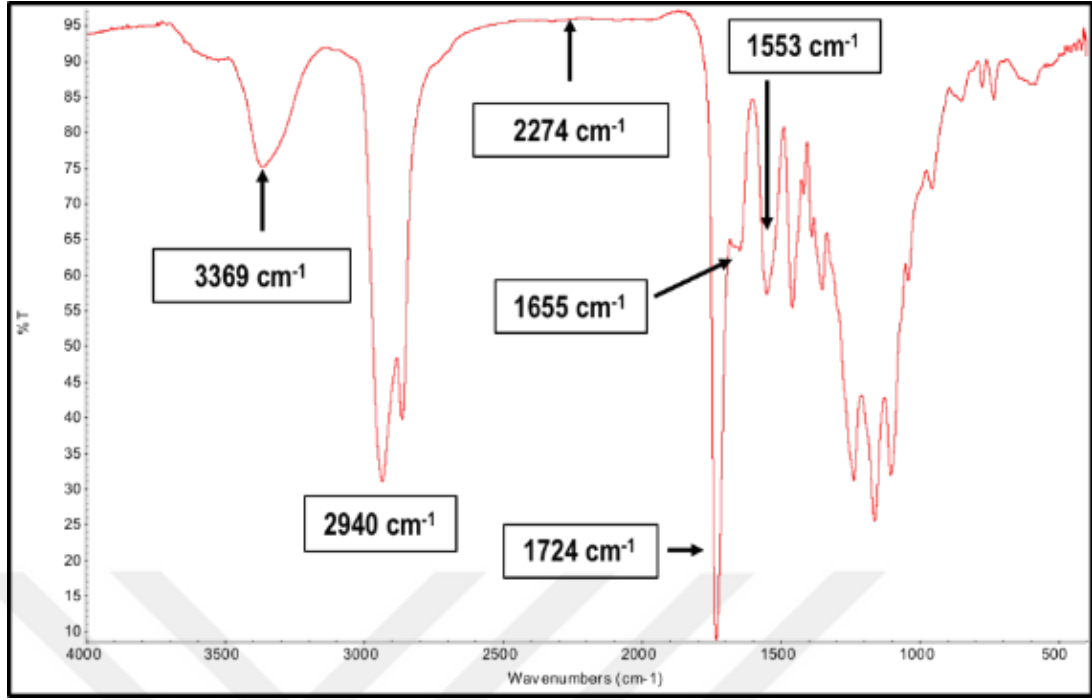
4.2.1 Kimyasal karakterizasyon bulguları

Polimerizasyonun ilerlemesi ve tamamlanması FTIR spektroskopisi ile izlenmiştir. Örnek olarak TPUU-3 (PCL2k/PEO2k/HDI) kopolimer sentezinin ilerlemesi ve ön polimer oluşumunun incelendiği FTIR spektrumları **Şekil 4.4**'te verilmiştir. Burada mavi spektrum ön polimerin hazırlanması için reaktörde PCL2k ve HDI karıştırıldıktan hemen sonra alınmış, 3550 cm⁻¹ civarında geniş bir hidroksil (O-H) bandı, 2274 cm⁻¹ ve 1726 cm⁻¹ de ise oldukça güçlü izosiyanat (N=C=O) ve ester karbonil (C=O) bantları gözlenmiştir. Kırmızı olarak verilen ön-polimerin FTIR spektrumunda ise, 3550 cm⁻¹ civarındaki hidroksil bandı kaybolmuş, buna karşılık üretan oluşumunu gösteren 3390

cm^{-1} 'de kuvvetli (N-H) bandı gözlenmiştir. Bunlara ek olarak beklendiği üzere 2274 cm^{-1} de bulunan izosiyanat ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$) bandı azalmış, 1527 cm^{-1} de ise amid-II ($\text{N}-\text{C}=\text{O}$) bantları oluşmuştur. Zincir uzatma basamağının ve polimerizasyon reaksiyonunun tamamlanması ise 2274 cm^{-1} 'de bulunan izosiyanat bandının tamamen kaybolması izlenerek belirlenmiştir (Şekil 4.5). Üre gruplarının kuvvetli hidrojen bağı yapması nedeniyle 3390 cm^{-1} de gözlenen (N-H) bandı 3369 cm^{-1} 'ye kaymıştır. Ayrıca 1655 cm^{-1} 'de kuvvetli hidrojen bağı yapan yeni bir ürethan karbonil ($\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$) bandı oluşmuş, amid-II bandı da 1553 cm^{-1} 'e kaymıştır.

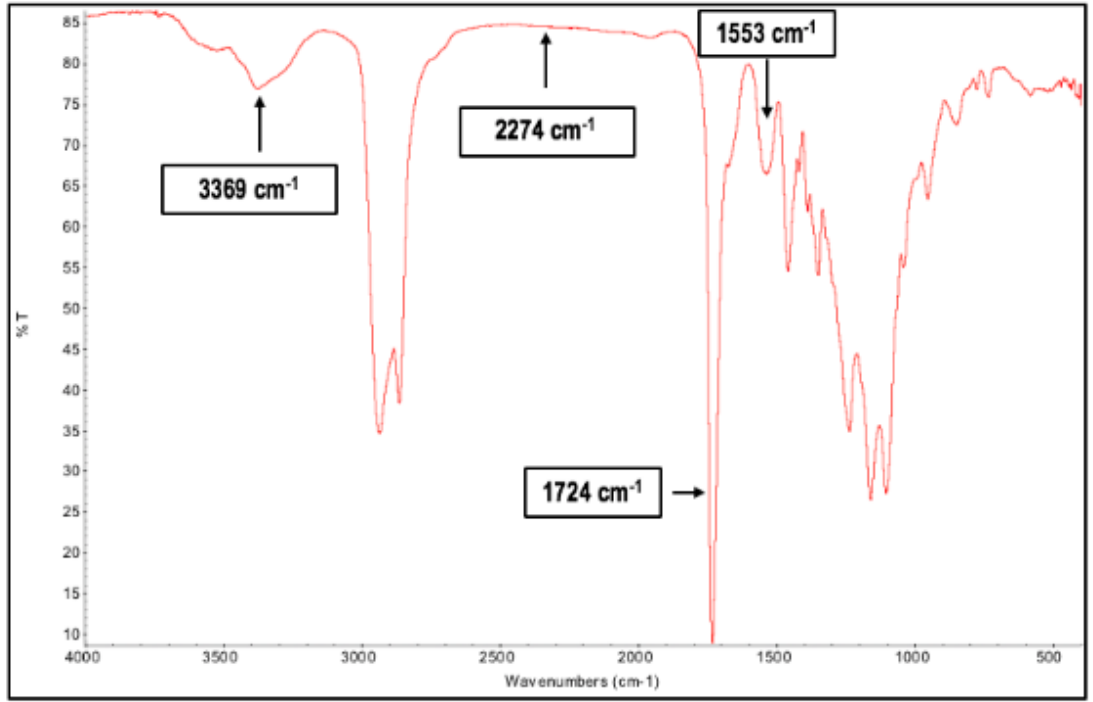


Şekil 4.4 TPUU-3 sentezi sırasında alınan ilk karışım (PCL2k/HDI) (mavi spektrum) ve ön polimer (kırmızı spektrum) örneklerinin FTIR spektrumları



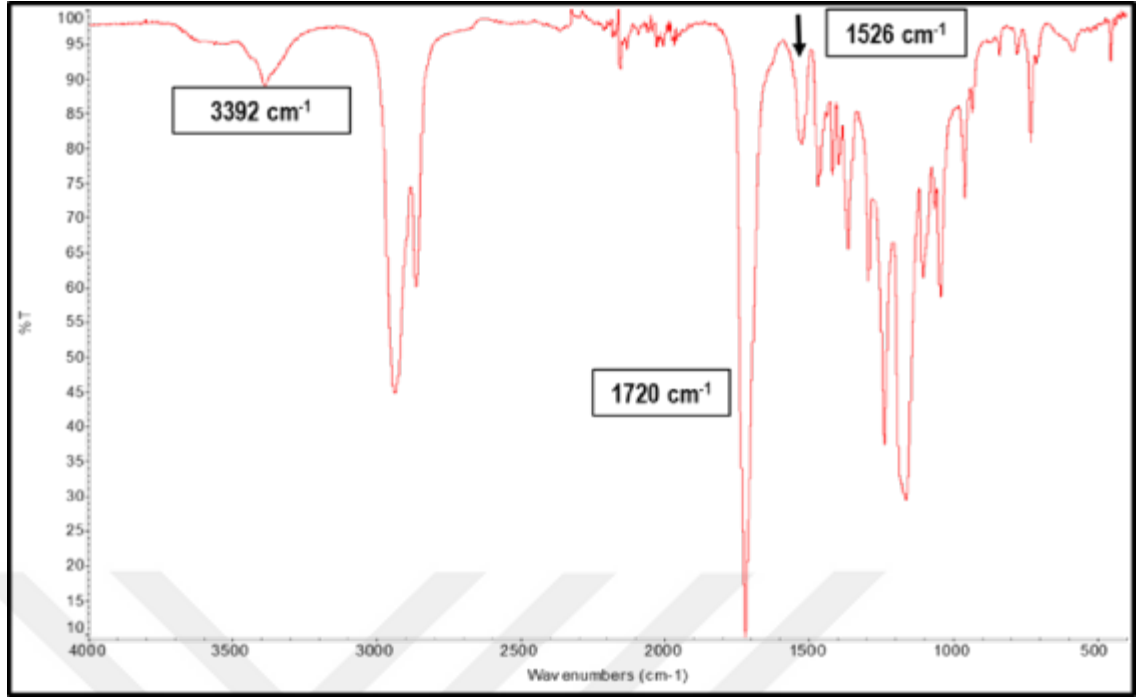
Şekil 4.5 TPUU-3 (PCL2k/PEO600/HDI) kopolimerinin FTIR spektrumu

TPUU-2 kopolimerinin FTIR spektrumu Şekil 4.6’te verilmektedir. Bu spektrumdaki ürean ve üre gruplarının yapısında bulunan (N-H) bandı 3379 cm^{-1} ’de gözlenmiştir. PCL2k yapısında bulunan ve hidrojen bağı yapmayan ester karbonil (C=O) piki 1731 cm^{-1} ’de gözlenmiştir. Bu malzeme çok az üre içerdiği için 1655 cm^{-1} ’de kuvvetli hidrojen bağı yapan bant gözlenmemiştir. Amid-II bandı ise yine 1539 cm^{-1} ’te gözlenmiştir.



Şekil 4.6 TPUU-2 kopolimerinin FTIR spektrumu

TPU-1'e (PCL2k/HDI) ait FTIR spektrumu Şekil 4.7'da verilmektedir. 1734 cm⁻¹ de bulunan kuvvetli C=O gerilmesi PCL yapısındaki ester gruplarının varlığını göstermektedir. 3390 cm⁻¹ civarında bulunan üretiler amid (N-H), ve 1527 cm⁻¹ de gözlenen amid-II (N-C=O) bantları poliüretan yapısının oluştuğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca serbest izosiyanat gruplarına ait 2274 cm⁻¹ bandının gözlenmemesi de polimerizasyon reaksiyonunun tamamlandığını göstermektedir.

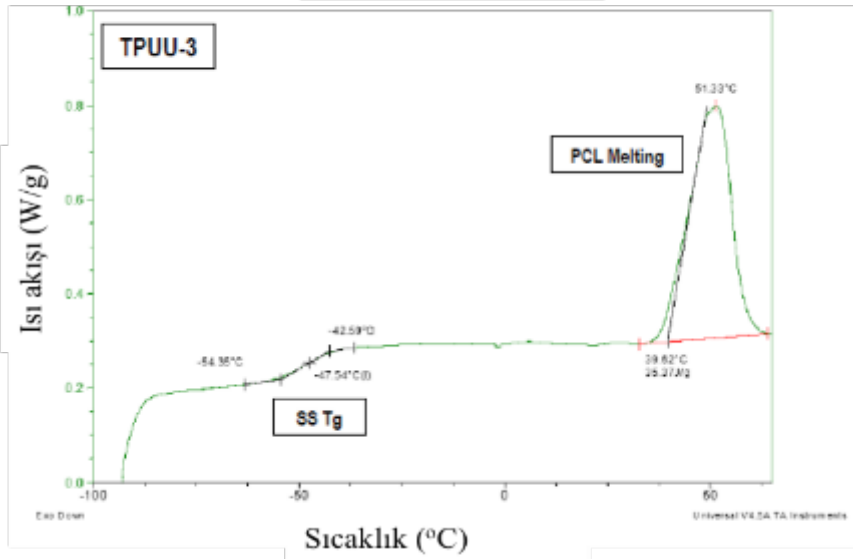
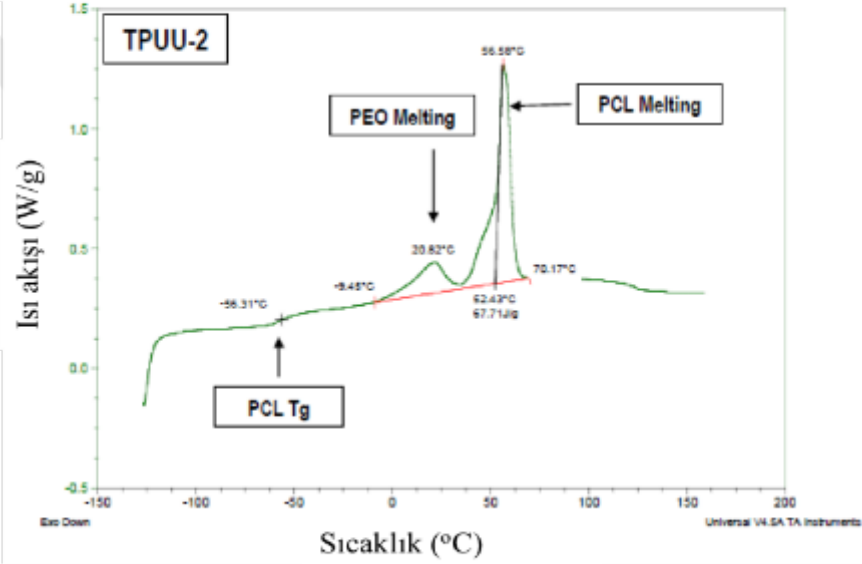
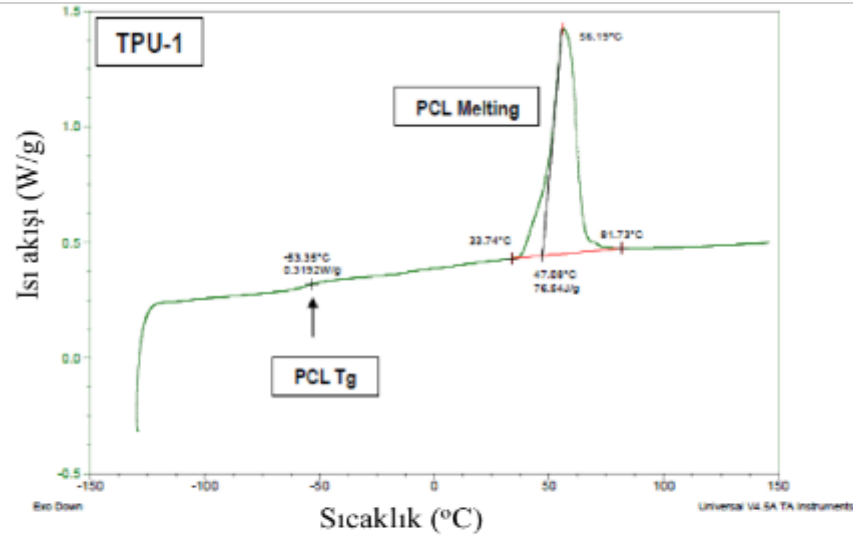


Şekil 4.7 TPU-1 (PCL2k/HDI) kopolimerinin FTIR spektrumu

4.2.2 Isıl özelliklerin karakterizasyon bulguları

TPU ve TPUU polimerlerinin yumuşak ve sert kısımları arasındaki mikrofaz ayrımının belirlenmesi ve kopolimer morfolojileri hakkında bilgi edinmek amacı ile ısı özellikleri DSC ile incelenmiştir. Bu kopolimerlerin DSC termogramları **Şekil 4.8**'de verilmektedir. Bu DSC termogramlarından polimerlerin camsı geçiş sıcaklıkları (T_g), erime noktaları (T_m) ve erime entalpileri (ΔH_{fusion}) belirlenmiş ve **Çizelge 4.1**'de verilmiştir.

Yapısında ağırlıkça %91,6 oranında PCL2k içeren TPU-1 termogramında $-53.35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de PCL'ye ait camsı geçiş sıcaklığı (T_g) gözlenmiştir. Ayrıca tepe noktası $56,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ olan, $34\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aralığında oldukça kuvvetli bir erime piki gözlenmiştir. Bu pikin altındaki alandan PCL yumuşak kısım matrisinin erime entalpisi (ΔH_{fusion}) $76,54\text{ J/g}$ olarak hesaplanmıştır. Teorik olarak %100 kristalin PCL polimerinin (ΔH_{fusion}) değerinin $139,5\text{ J/g}$ olduğu (Crescenzi vd. 1972) ve TPU-1 içerisinde %91,6 PCL olduğu düşünülürse PCL matrisin %60 oranında kristal yapıya sahip olduğu hesaplanabilir. Bu oldukça yüksek bir orandır ve dolaylı olarak TPU-1 de sert (üretan) ve yumuşak (PCL) kısımlar arasında mikrofaz ayrımı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8 TPU-1, TPUU-2,3 DSC termogramı

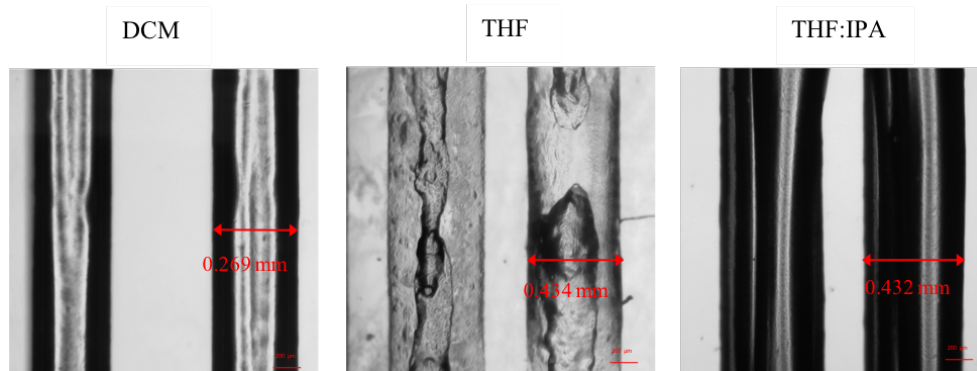
Şekil 4.8’de verilen TPUU-2 ve TPUU-3 kopolimerlerinin DSC termogramları incelendiğinde ortaya daha ilginç bir morfolojik yapı çıkmaktadır. Yapısında ağırlıkça %23 civarında PEO2k bulunan TPUU-2 kopolimerinde iki farklı erime bölgesi görülmektedir. Bunlardan tepe noktası 20,82 °C olan ilk bölge PEO2k’nin erimesini daha sonra gelen ve tepe noktası 56,19 C olan bölge ise PCL2k’nin erimesini göstermektedir. Bu sonuçlar yumuşak kısmı oluşturan PEO2k ve PCL2k arasında bir mikrofaz ayrımı olduğunu göstermektedir. PEO ve PCL oligomerlerinin T_g değerleri birbirine çok yakın olduğu için düşük sıcaklıkta sadece bir T_g değeri (-56,31° C) gözlenmektedir. Yapısında ağırlıkça %26 PEO600 bulunan TPUU-3 kopolimerinde ise sadece bir T_g (-47,54 °C) ve bir de tepe noktası 51,33 °C olan ve PCL2k kaynaklı tek bir erime bölgesi mevcuttur. Bu da TPUU-3 kopolimerinde düşük molekül ağırlıklı PEO600 ve PCL2k oligomerlerinin birbirleri ile karışarak tek bir yumuşak faz oluşturdıklarını işaret göstermektedir.

Çizelge 4.1 Polimerlerin DSC verisi

Polimer	Camsı Geçiş Sıcaklığı (T_g)	Erime Sıcaklıkları (T_m)	Erime entalpileri (ΔH_{fusion})
TPU-1	-53.35°C (PCL)	56,2°C(PCL)	76,54 J/g
TPUU-2	-56.3°C (PCL)	20,82°C (PEO) 56,19°C (PCL)	67,71 J/g
TPUU-3	-48.84°C (PEO)	51,33°C (PCL)	35,37 J/g

4.3 Doku İskelesi Üretim Optimizasyonu

Doku iskelesi üretiminin optimizasyon çalışmalarında ilk olarak uygun çözücü seçimi için TPUU-3 %70 (w/v) konsantrasyonunda sırasıyla DCM, THF ve THF: IPA (1.5:1) ile çözülerek hazırlanan TPUU-3 çözeltileri Envisiontec 3D Bioplotter Starter Series 3B biyoyazıcı kullanılarak ısıtılmış 3B baskılanmıştır. 3B baskı örnekleri yapısal inceleme için paralel hizalanmış (fiberler arası mesafe 1 mm) şekilde baskılanmıştır. 3B baskılama 1 bar basınçta, 4 mm/s hızda, iç çapı 0.26 mm olan iğne ucu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fiber yapıların çaplarının iğne ucunun iç çapı ile orantılı olarak (yüzey yapışmasında kaynaklı maksimum %10 yayılma gözlenmektedir) 0.26 ± 0.026 mm olması beklenmektedir. 3B baskıların morfolojilerinin incelendiği ışık mikroskobu görüntüleri **Şekil 4.9** verilmektedir. Image J programı kullanılarak hesaplanan fiber çapları ve fiberler arası mesafe karşılaştırıldığında, DCM kullanılarak alınan 3B baskının fiber çapı 0.269 ± 0.02 mm, fiberler arası mesafe 1.02 mm olarak hesaplanmıştır. THF ve THF:IPA kullanılarak alınan 3B baskılarının fiber çapı 0.434 ± 0.01 - 0.432 ± 0.011 mm, fiberler arası mesafe 1.032 ± 0.01 - 1.019 ± 0.011 mm olarak hesaplanmıştır. THF ve THF:IPA kullanılarak alınan baskılarda 1. katmanda %66 civarında yüzeye yayılma gözlenmiştir. Bu durum devam eden katmanlarda fiber yapıların tez düze fiber çapına engel olmuştur. **Çizelge 4.2**'de verilen çözücülerin kaynama noktaları da dikkate alınarak, stabil 3B baskı alınmasında en uygun çözücü olarak en düşük kaynama noktasına sahip DCM çözücüsü kullanmasına karar verilmiştir.

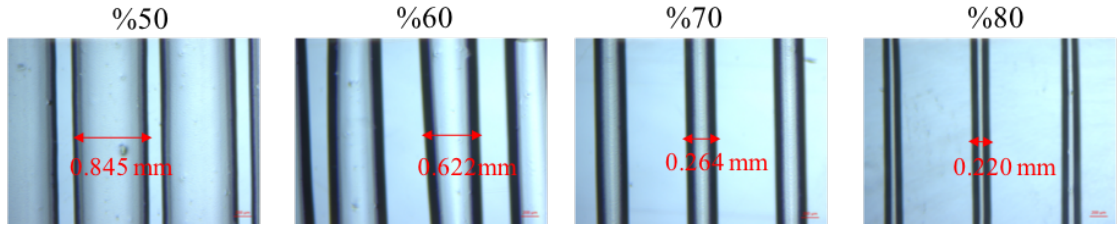


Şekil 4.9 DCM, THF, THF:IPA kullanılarak alınan paralel hizalanmış yapıların mikroskop görüntüleri (ölçek:200 µm)

Çizelge 4.2 Organik çözeltilerin kaynama noktaları

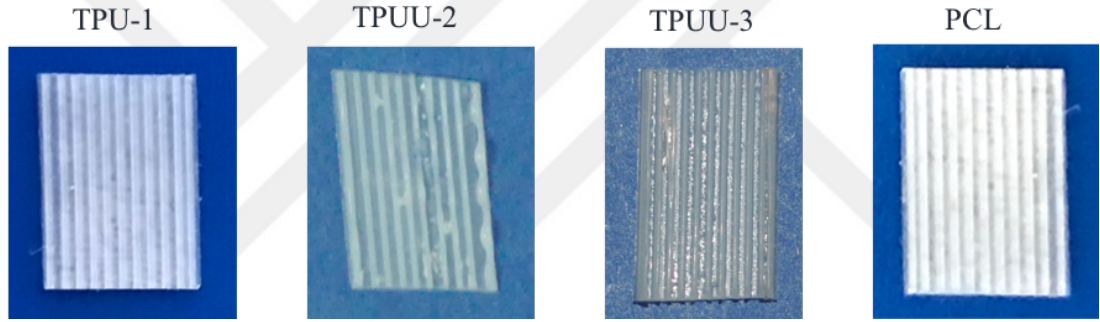
Organik Çözücü	Kaynama Noktası
DCM	39.6°C
THF	66°C
IPA	82.5°C

3B baskı çalışmalarında baskı kalitesini etkileyen faktörlerden biri de malzemelerin reolojik özellikleridir. Reolojik özelliklerin etkisinin incelenmesi için TPUU-3 kodlu polimer ile %50, 60, 70 ve 80 (w/v) konsantrasyonda çözeltiler hazırlanarak, paralel hizalanmış fiberler (fiber arası mesafe 1mm) baskılanmıştır. 3B baskılama 1 bar basınçta, 4 mm/s hızda, iç çapı 0.26 mm olan iğne ucu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 3B model tasarımında fiber kalınlığı iğne ucunun iç çapı göze alınarak 0.26mm olacak şekilde tasarlanmıştır. 3B baskıların morfolojilerinin incelendiği ışık mikroskobu görüntüleri **Şekil 4.10** verilmektedir. ImageJ programı kullanılarak hesaplanan fiber çapları ve fiberler arası mesafe karşılaştırıldığında, %70 (w/v) konsantrasyona sahip çözelti ile alınan 3B baskının fiber çapı 0.264 ± 0.015 mm olarak hesaplanmıştır. %50-60 (w/v) konsantrasyona sahip çözeltiler ile alınan 3B baskılarının fiber çapı 0.845 ± 0.01 ve 0.622 ± 0.006 mm olarak hesaplanmıştır. %80 (w/v) konsantrasyona sahip çözelti ile alınan 3B baskının ise fiber çapı 0.220 ± 0.008 mm olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar ışığında en uygun konsantrasyonun %70 (w/v) olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.10 Farklı konsantrasyonlarda alınan baskı örneklerinin ışık mikroskop görüntüleri

%70 (w/v) konsantrasyonda TPU-1, TPUU-2-3 ve PCL çözeltileri ile 37°C’de 1 bar basınçta ve 4mm/s hızda alınan 3B baskı görüntüleri **Şekil 4.11**’de verilmektedir. PCL ticari olarak temin edilmiş ve sentetik polimerlerin mekanik özelliklerinin analiz edildiği çalışmada kontrol malzemesi olarak kullanılmıştır.

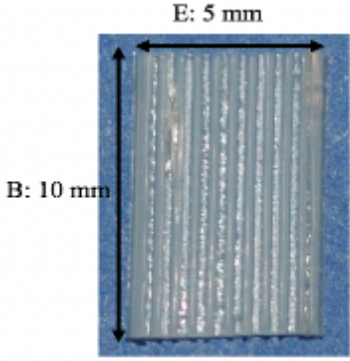
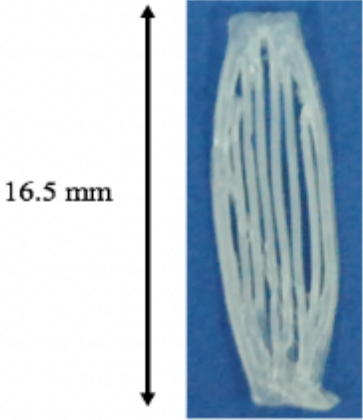


Şekil 4.11 TPU-1, TPUU-2-3 ve PCL 3B baskı görüntüleri

in vitro çalışmada kullanılmak üzere **Çizelge 4.3**’de gösterildiği gibi paralel hizalanmış fiberlere sahip TPU-1 ve TPUU-3 kodlu polimerler kullanılarak 3B doku iskelesi üretilmiştir. Hücre tutunmasını arttırmak için *in vitro* çalışmada kullanılacak doku iskelelerin ilk katmanında fiberler arası uzaklık 0.2 mm olacak şekilde üretilerek ilk katmanın kapanması sağlanmıştır. Devam eden katmanlarda fiberler arası uzaklık 0.4 mm olarak ayarlanmıştır.

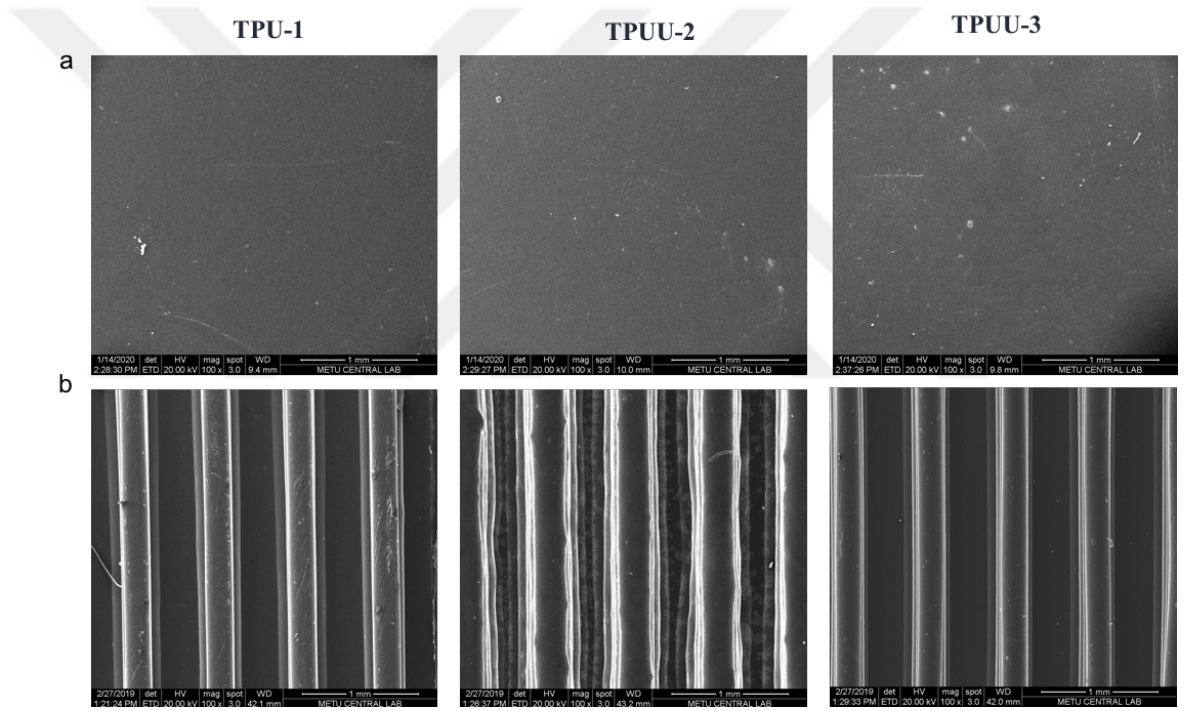
in vivo çalışmada kullanılmak üzere TPUU-3 ile **Çizelge 4.3**’de gösterildiği gibi mekik şeklinde ve fiber arası uzaklık 0.4 mm olacak şekilde üretilmiştir. İmplantasyon sonrası perfüzyon sağlanması için 3B doku iskelesinin her iki yüzünün de açık olacak şekilde baskılması gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3 3B baskı parametreleri ve TPUU-3 ile üretilmiş 3B yapıların örnek görüntüleri.

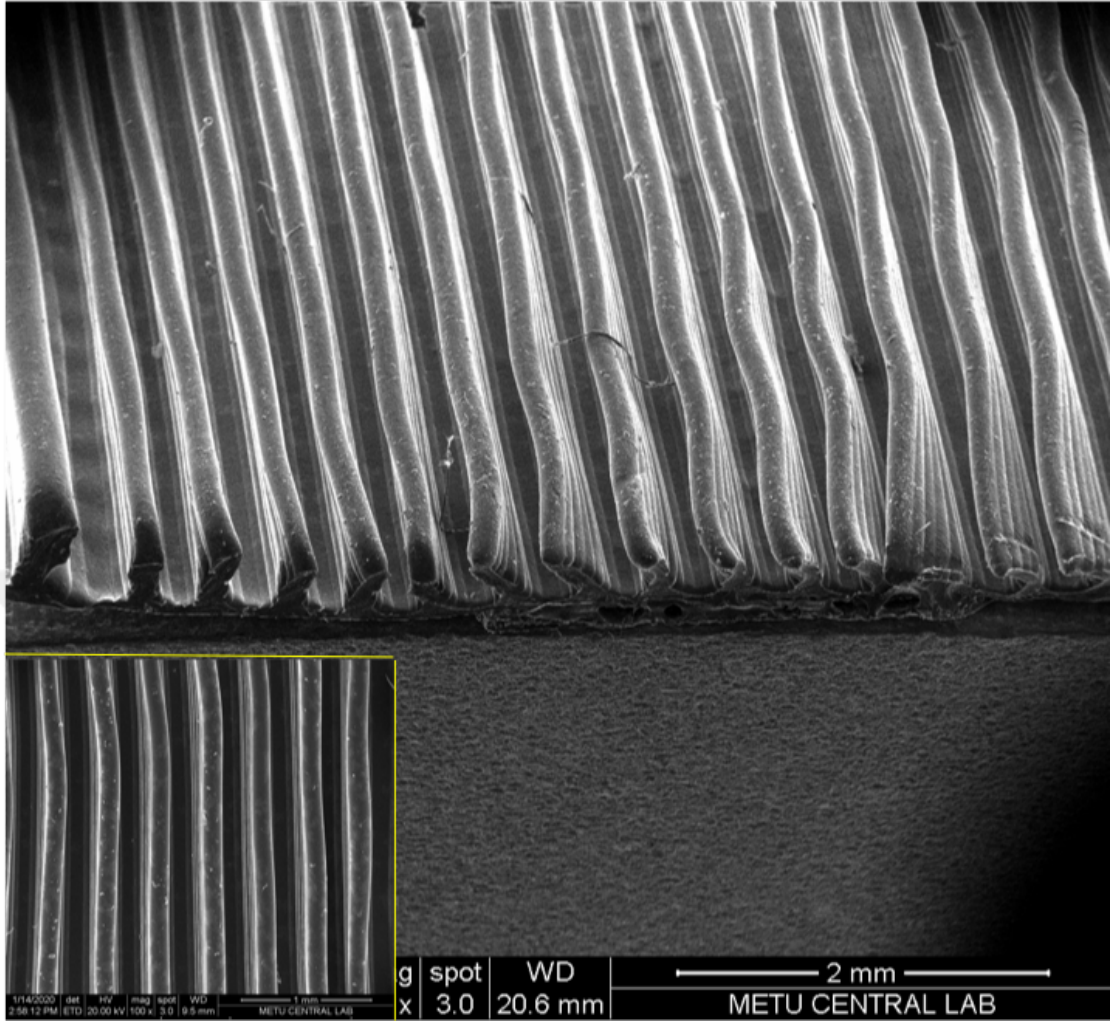
3B baskı parametreleri	TPUU-3 ile üretilmiş 3B yapıların örnek görüntüleri.
<u>3B model:</u> Üst üste biriktirilen paralel fiberler <u>Fiberler arası uzaklık:</u> ilk katman: 0.2 mm, devam eden 5 katman: 0.4 mm <u>Doku iskelesi eni:</u> 5 mm <u>Doku iskelesi boyu:</u> 10 mm	
<u>3B model:</u> Mekik <u>Fiberler arası uzaklık:</u> 0.4 mm <u>Doku iskelesi boyu:</u> 16.5 mm	

4.4 Doku İskelelerinin Yapısal Karakterizasyon Bulguları

3B biyoyazıcı ile üretilen 3B doku iskeleleri ve desensiz film yüzeylerin morfolojileri taramalı elektron mikroskop (SEM) ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.12). TPU-1, TPUU-2 ve TPUU-3 ile oluşturulan polimer filmlerin SEM görüntüleri incelendiğinde yüzeylerin pürüzsüz olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.12a). Şekil 4.11b’de verildiği gibi 3B doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde ise, TPU-1 ve TPUU-3 ile üretilen 3B doku iskelelerinin düzenli fiber dağılımına sahip olduğu gözlenmektedir. 3B doku iskelesinin kesit görüntüsü Şekil 4.13’de verilmektedir.



Şekil 4.12 a) Film ve b) 3B doku iskelelerinin SEM görüntüleri

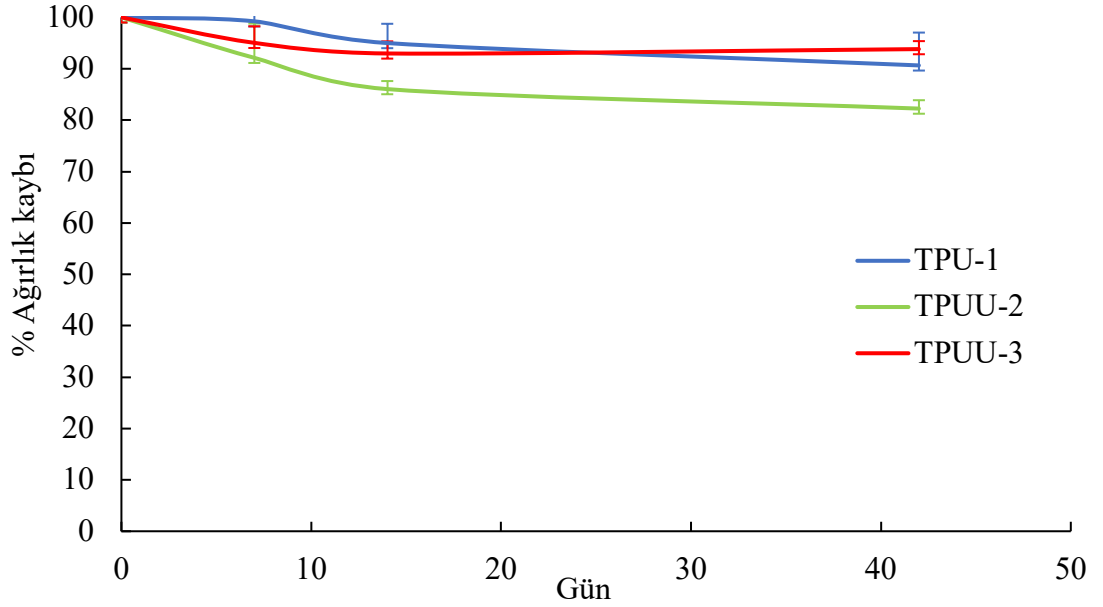


Şekil 4.13 Hücre ekim çalışmalarında kullanılan doku iskelelerinin SEM görüntüleri

4.4.1 Biyobozunma bulguları

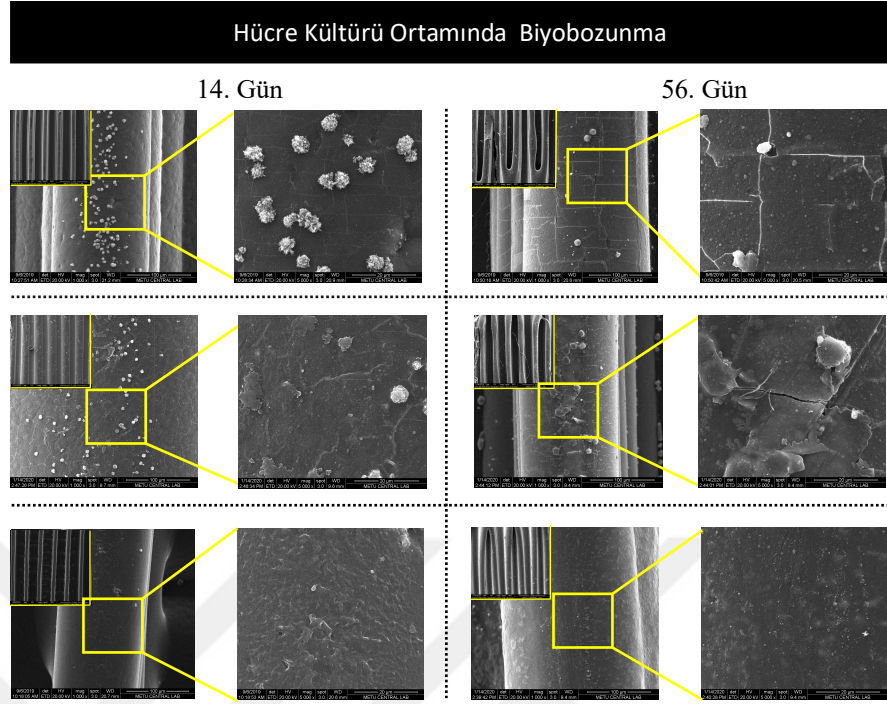
Doku iskelelerinin biyobozunma çalışmaları 37°C’de hücre kültürü ortamında ve enzimatik ortamda 56 gün süreyle gerçekleştirilmiştir. TPU-1 ve TPUU-3 doku iskelelerinde 14. günün sonunda hücre kültürü ortamında %4-7 oranında ağırlık kaybı gözlenirken, TPUU-2 doku iskelelerinde %13 oranında ağırlık kaybı gözlenmiştir. 56. günün sonunda hücre kültürü ortamında gerçekleştirilen biyobozunma çalışmalarının sonucunda TPU-1 ve TPUU-3 doku iskelelerinde %7-9 oranında ağırlık kaybı gözlenirken, TPUU-2 doku iskelelerinde %20’lik kütle kaybı gözlenmiştir (Şekil 4.14). Hücre kültürü ortamı ile yapılan biyobozunma çalışmalarında TPU-1 ve TPUU-3 doku

iskelelerinde kırılabilirlik ve erozyonu tipi bozunma gözlenmiştir, fakat 56 günün sonunda yığın bozunma kırılma ve çatlama oluşmamıştır. Yüzey erozyonunun morfolojik incelemesi SEM ile gerçekleştirilmiştir.



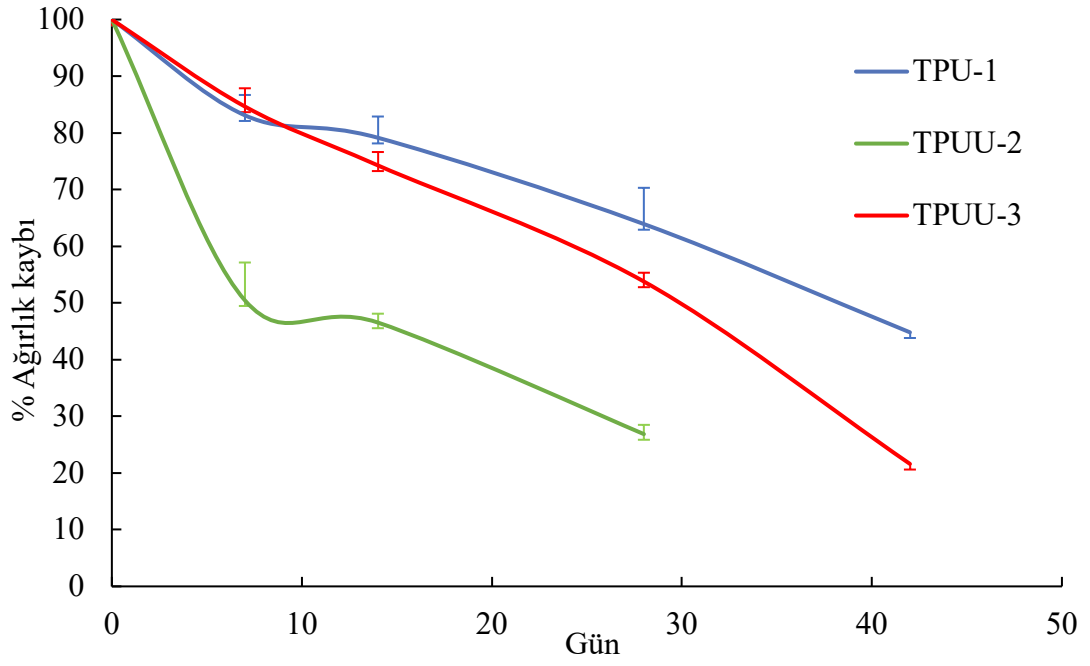
Şekil 4.14 Polimerlerin hücre kültürü ortamında biyobozunma (kütle kaybı) profili

SEM incelemesi sonuçlarına göre TPU-1 ve TPUU-3 doku iskelelerinin hücre kültürü ortamında biyobozunması sırasında yüzey morfolojisinde pürüzlü bir yapı gözlenmiştir. 56 günün sonunda örneklerin yüzeylerinde kabarmaların ve ince çatlakların arttığı gözlenmiştir. 56. günün sonunda TPUU-2 doku iskelesinin parçalanarak yapısal bütünlüğünü kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 4.15).

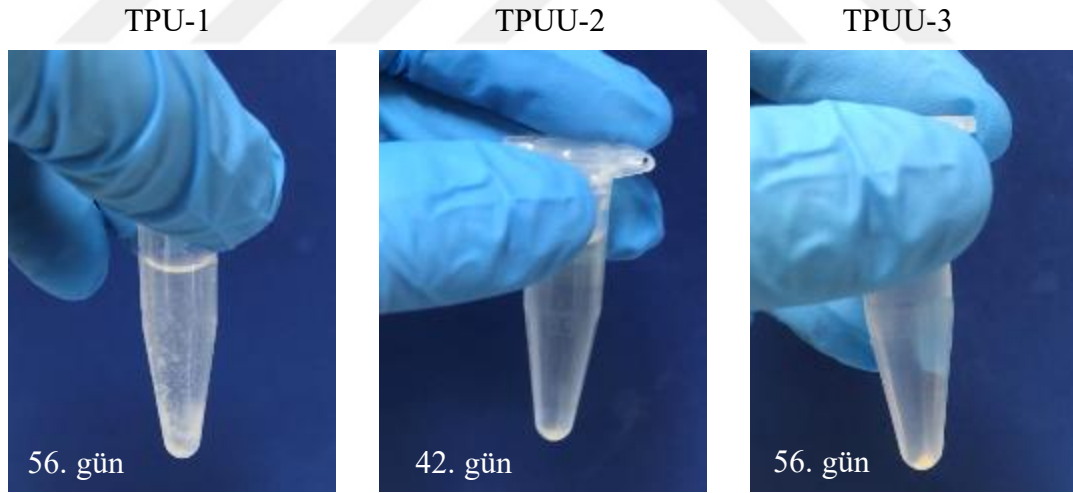


Şekil 4.15 Doku iskelelerinin hücre kültürü ortamında biyobozunma sırasında SEM ile morfolojik incelemesi

TPU-1 ve TPUU-3 doku iskelelerinin 14. günün sonunda enzimatik ortamda biyobozunma incelemesinde, yaklaşık %30 oranında ağırlık kaybı gözlenirken, TPUU-2 doku iskelesinde %50 oranında ağırlık kaybı gözlenmiştir. Enzimatik biyobozunmanın 42. gününde TPUU-3 doku iskelesinde %79 oranında ağırlık kaybı, TPU-1 doku iskelesinde %56 oranında ağırlık kaybı gözlenmiştir. 42. günün sonunda TPUU-2 doku iskelesinin tamamen bozunduğu ve yapısal bütünlüğünü kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 4.16). 56. günün sonunda TPU-1 ve TPUU-3 doku iskelelerinin de yapısal bütünlüklerini kaybettikleri gözlenmiş ve kütle kaybı hesaplaması için ağırlık ölçümleri alınamamıştır (Şekil 4.17). Yüzey erozyonu değerlendirmesi için SEM incelemesi yapılmıştır.

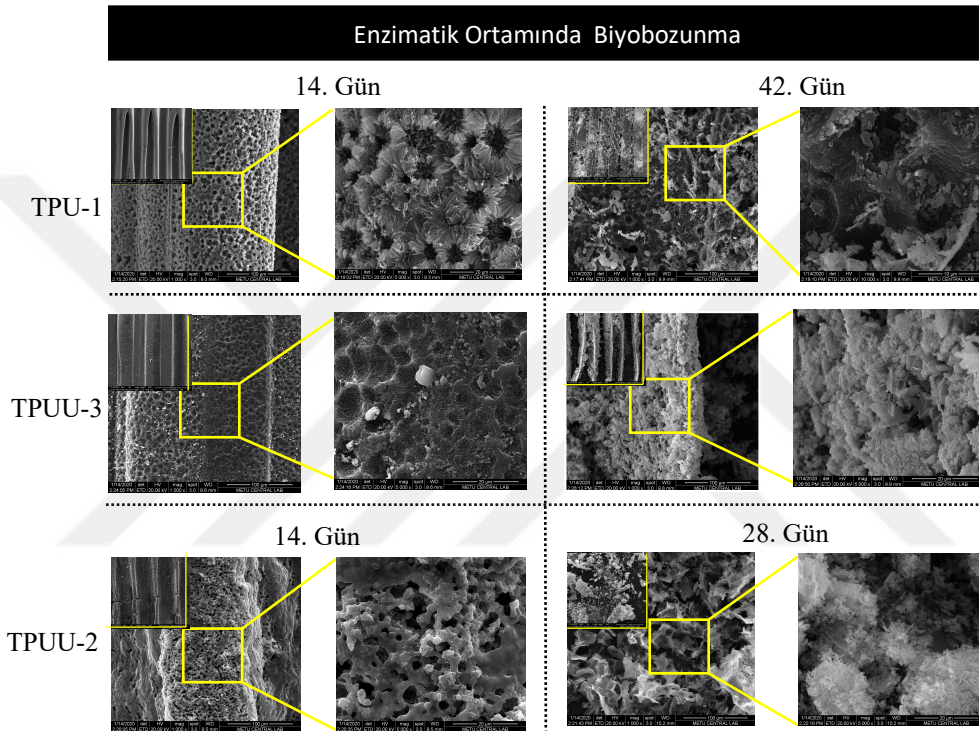


Şekil 4.16 Polimerlerin enzimatik ortamda biyobozunma profili



Şekil 4.17 Enzimatik biyobozunma ortamında 42. ve 56. günlerde doku iskeleleri yapısal bütünlüklerini kaybetmiştir.

TPU-1, TPUU-2 ve TPUU-3 örneklerinde enzimatik biyobozunma sırasında 14. günden itibaren yüzey erozyonu ile birlikte yığın bozunmanın da başladığı ve yüzeyde homojen bir şekilde gözenekler oluştuğu gözlenmiştir. 42. günün sonunda oldukça incelen ve kırılmanlaşan TPU-1 ve TPUU-3 yüzeylerinde büyük gözeneklerin oluştuğu ve yüzeyden kopmaların meydana geldiği gözlenmiştir. TPUU-2 örneğinin 28. günün sonunda yapısal bütünlüğünü kaybetmeye başladığı ve yığın halinde parçalandığı gözlenmiştir (Şekil 4.18).



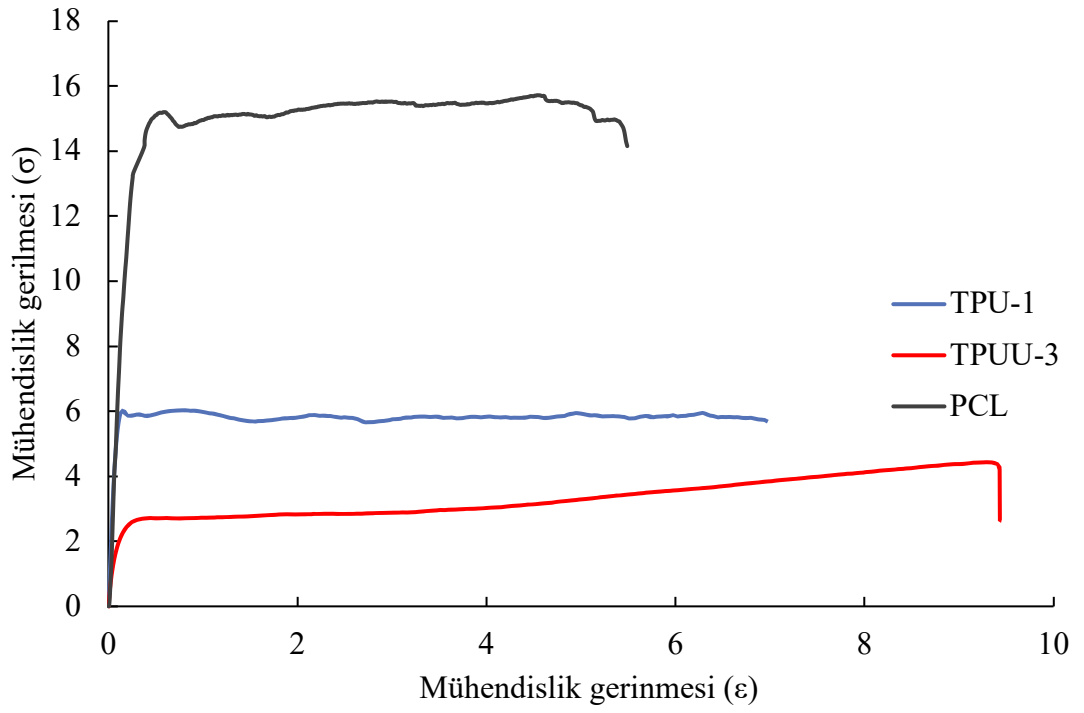
Şekil 4.18 Doku iskelelerinin hücre kültürü ortamında biyobozunma incelemesi SEM görüntüleri.

4.5 Doku İskelelerinin Mekanik Karakterizasyon Bulguları

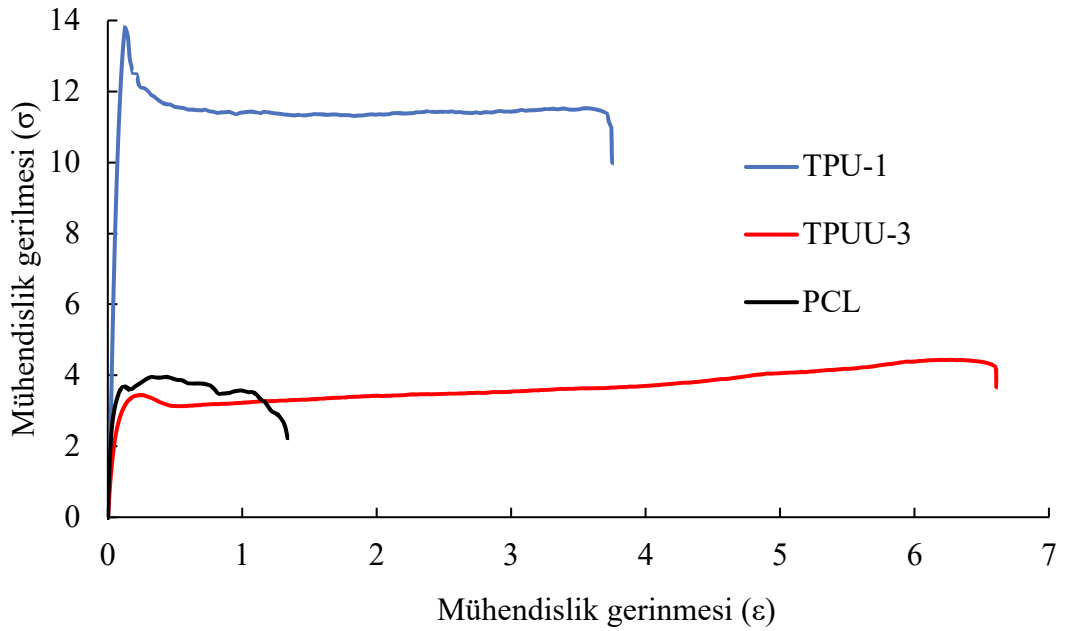
Film ve 3B doku iskelelerinin çekme testi ile mekanik özellikleri incelenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak gerinim-gerilim eğrileri oluşturulmuştur. Film örneklerin gerinim-gerilim eğrileri Şekil 4.19 ve 3B doku iskelelerinin gerinim-gerilim eğrileri Şekil 4.20’de verilmiştir. Gerinim-gerilim eğrileri kullanılarak hesaplanan esneklik modülü ve yüzde kopma uzaması Çizelge 4.4 ’de sunulmaktadır.

İskelet kası dahil olmak üzere yük taşıyan dinamik dokuların 3B biyobaskı çalışmalarında sıklıkla kullanılan, altın standart niteliğindeki PCL ile üretilen 3B doku iskelesinin sertlik değeri (Esneklik modülü (YM)) TPU-1 ve TPUU-3 3B doku iskeleleri ile karşılaştırılmıştır. TPUU-3'un PCL'e kıyasla daha yumuşak olduğu, TPU-1'nin TPUU-3'e kıyasla sertlik değerleri yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. TPUU-3 3B doku iskelesinin esneklik modülü 17.09 ± 4.71 MPa ve film örnek 29.41 ± 8.71 hesaplanmıştır. TPU-1 ve PCL 3B doku iskelesinin esneklik modülü 49.79 ± 4.16 MPa ve 57.51 ± 5.71 MPa, film örnekler 89.95 ± 4.63 ve 89.87 ± 9.28 MPa hesaplanmıştır. TPUU-2 3B doku iskelesi kırılğan olduğu için çekme testi uygulanmamıştır.

Kopmadan önce esneyebilme ve şeklini koruyabilme (elastikiyet) özellikleri değerlendirildiğinde, TPUU-3 3B doku iskelesi 939.39 ± 106.05 ve film örnek 756.37 ± 50.21 oranında uzama gösterdiği belirlenirken PCL 3B doku iskelesinin 28.19 ± 10.8 ve film örneklerin 10.13 ± 2.51 oranında uzama gösterdiği belirlenmiştir. Mekanik özellikler incelendiğinde TPUU-2'nin diğer polimerlere kıyasla daha kırılğan olduğu gözlenmektedir. TPUU-2, sahip olduğu mekanik özellikleri ve hızlı biyobozunma profilinden dolayı, devamındaki in vitro çalışmalarda deney grupları arasına alınmamıştır.



Şekil 4.19 TPU-1, TPUU3 ve film örneklerin mühendislik gerilmesi-gerinmesi grafiği



Şekil 4.20 TPU-1, TPUU3 ve PCL baskı doku iskelelerinin mühendislik gerilmesi-gerinmesi grafiği

Çizelge 4.4 Doku iskelelerinin çekme testi sonuçları.

Malzeme	Film		3B doku iskelesi	
	Esneklik (Young) modülü (MPa)	Yüzde kopma uzaması (%)	Esneklik (Young) modülü (MPa)	Yüzde kopma uzaması (%)
TPUU-1	89.95±4.63	14.78±2.67	49.79±4.16	37.89±12.17
TPUU-2*	-	-	-	-
TPUU-3	29.41±8.71	756.37± 50.21	17.09±4.71	939.39± 106.05
PCL	89.87±9.28	10.13±2.51	57.51±5.71	28.19±10.80

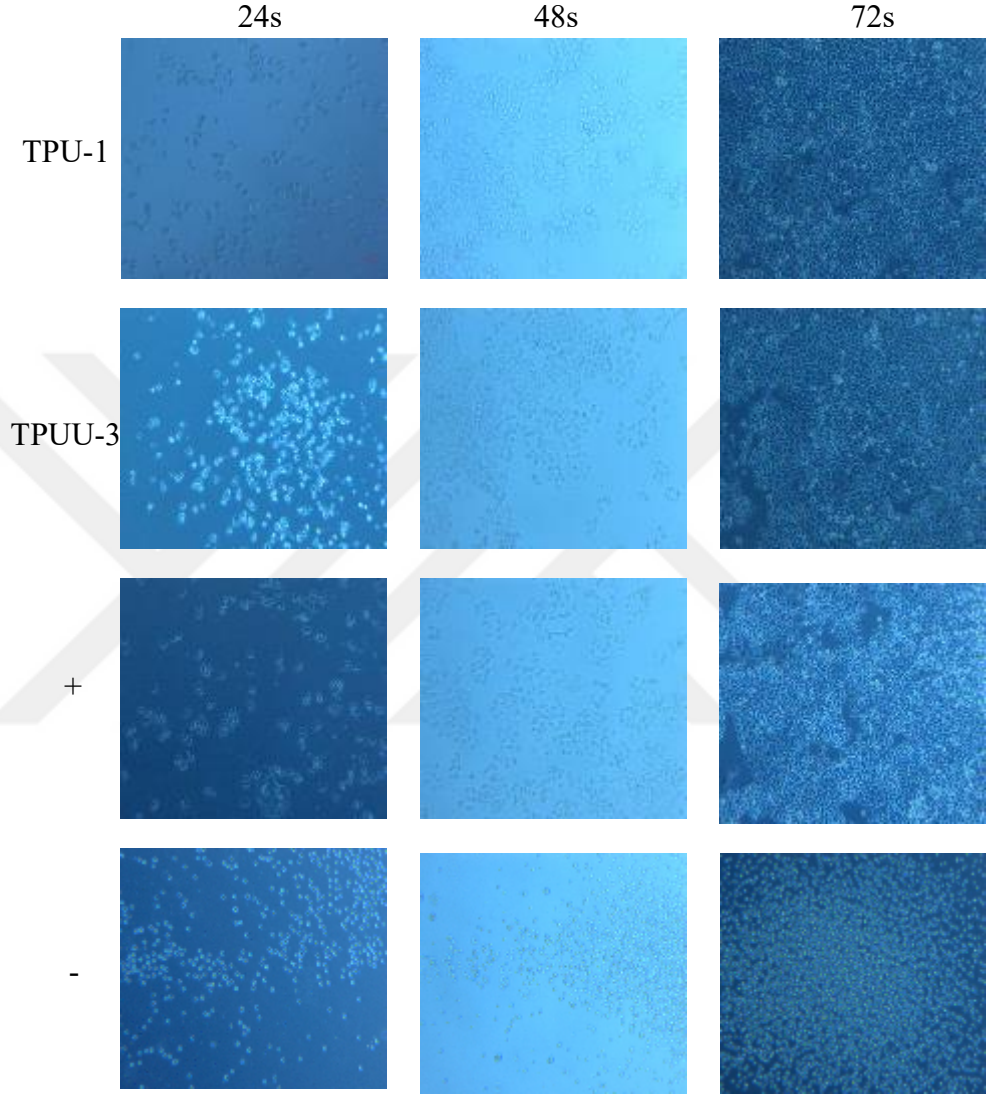
*TPUU-2 film örnek ve 3B doku iskelesine kırılmalıktan dolayı çekme testi uygulanamadı.

4.6 *in vitro* Çalışmalar

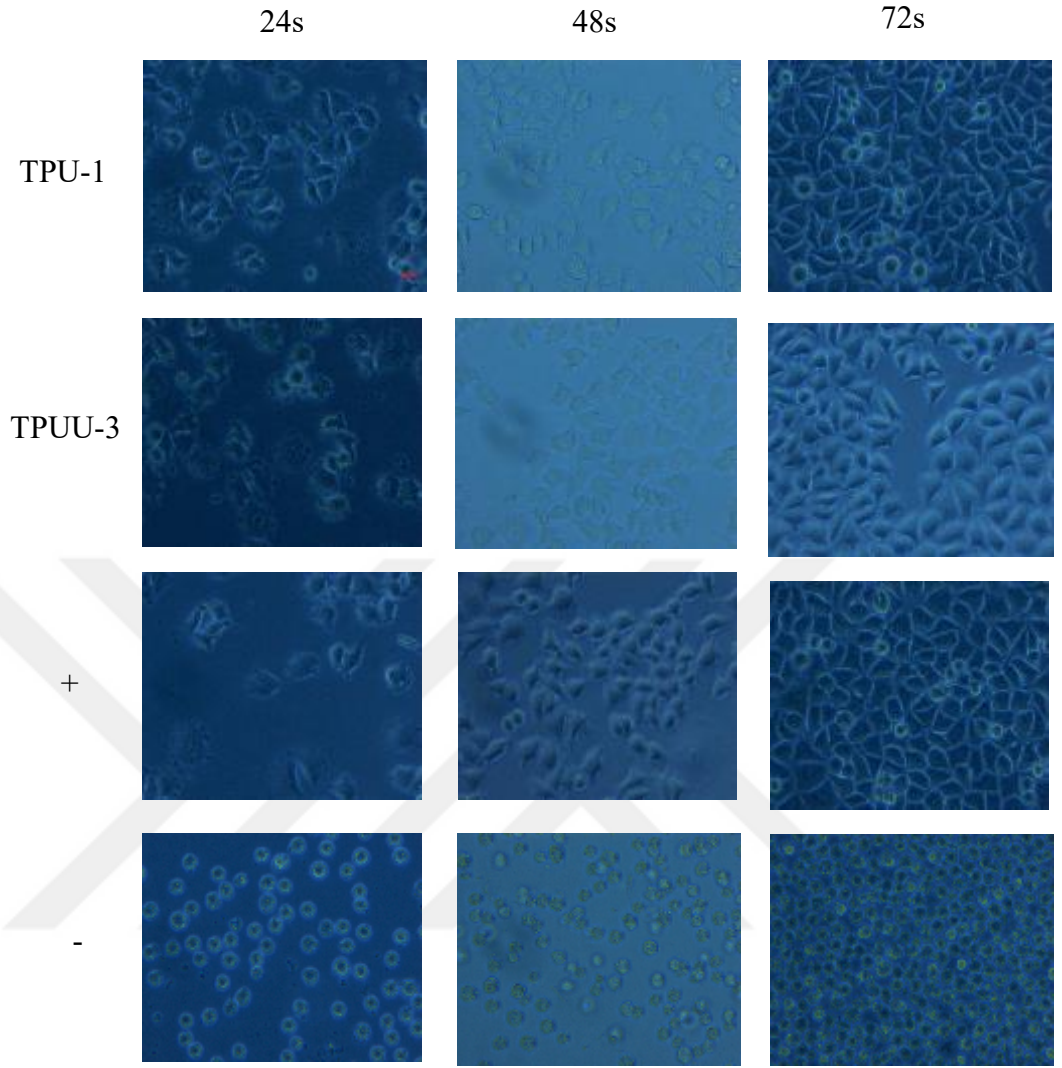
4.6.1 Sitotoksosite testi sonuçları

Bu tez kapsamında sentezlenen ve özgün yapıda TPU-1 ve TPUU-3 polimerlerinin sitotoksosite özellikleri Bölüm 3.2.6.1’de açıklandığı gibi, indirekt toksisite testi ile incelenmiştir. Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 24, 48 ve 72 saat sonra deneysel gruplara göre hücre tabakası yayılımı ve ölü hücre miktarı ışık mikroskobu ile 10x büyütmede incelenmiştir. 24, 48 ve 72 saatte gözlemlenen hücre tabakasının yayılımı

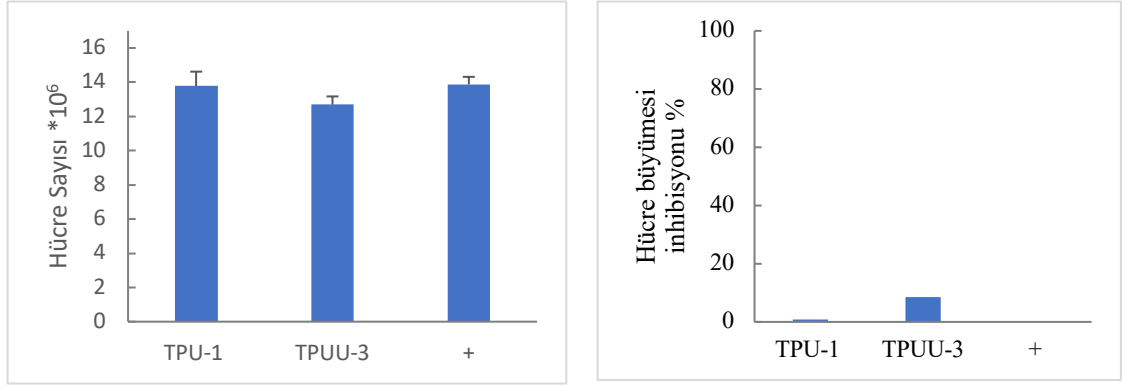
Şekil 4.21’de verilmektedir. Kültür boyunca hücre morfolojisinde izlenen değişimler 40x büyütmede incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.22’de sunulmuştur.



Şekil 4.21 Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden sonra deneysel gruplara göre 24, 48 ve 72 saatte hücre tabakası yayılımının değişimi. 10x



Şekil 4.22 Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden sonra deneysel gruplara göre 24, 48 ve 72 saatte hücre morfolojisinin değişimi. 40x



Şekil 4.23 Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 72 saat sonra deneysel gruplara göre (a) Canlı hücre sayısının değişimi; sonuçlar negatif kontrol grubuna göre normalize edilmiştir, (b) % hücre büyümesi inhibisyonu; sonuçlar pozitif kontrol grubuna bağlı olarak verilmiştir.

Yapılan mikroskopik inceleme ve hücre sayımı sonuçlarına göre, deneysel grupların “biyoyumluluk testi değerlendirme kriterleri” puanlama cetveline göre sonuçları **Çizelge 4.5**’de sunulmaktadır.

Çizelge 4.5 Biyoyumluluk testi değerlendirme kriterleri sonuçları

	Grup	Not		Grup	Not
Hücre tabakası yayılımı (Confluency)	TPU-1	2	Hücre morfolojisindeki değişim	TPU-1	1
	TPUU-3	2		TPUU-3	1
Ölü hücre miktarı (Yüzen hücreler)	TPU-1	1	Hücre büyümesi inhibisyonu	TPU-1	1
	TPUU-3	1		TPUU-3	1

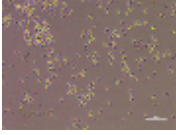
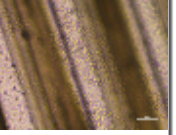
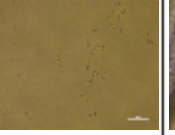
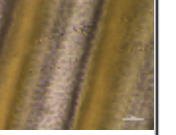
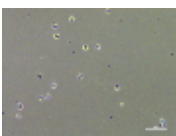
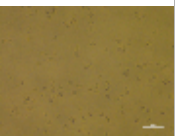
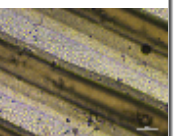
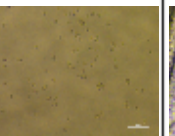
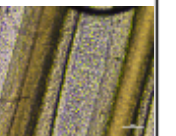
Bu sonuçlara göre, üretilen polimerik malzemeler için sitotoksik cevap indeksi ve biyoyumluluk değerlendirme sonuçları **Çizelge 4.6**’de sunulmaktadır. Buna göre, TPU-1 ve TPUU-3 biyoyumludur ve az miktarda reaktivite özelliği gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 TPU-1 ve TPUU-3 için biyoyumluluk değerlendirme sonuçları

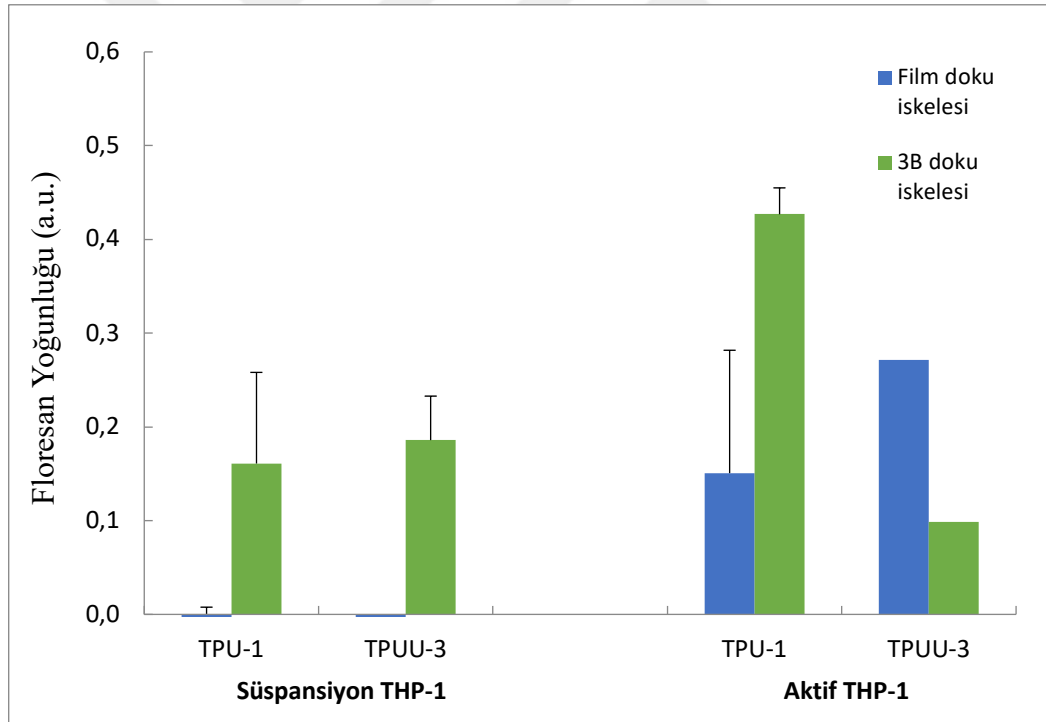
Grup	Sitotoksik cevap indeksi	“Malzeme Sitotoksiktir”
TPU-1	2.3	Hayır
TPUU-3	2.2	Hayır

4.6.2 Doku iskelelerinde immün uyumluluk incelemesi sonuçları

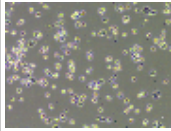
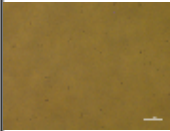
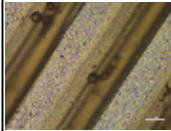
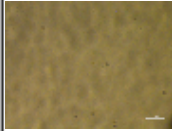
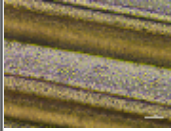
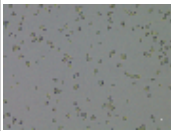
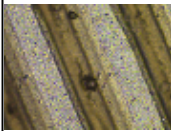
Şekil 4.24’de THP-1 monositlerin TPU-1 ve TPUU-3 film ve 3B doku iskelelerinin üzerinde ekiminden sonra 1. gündeki davranışları sunulmuştur. THP-1 monositlerin üretilen doku iskelelerine yapışmadığı gözlenmiştir. Doku iskeleleri üzerinde bulunan THP-1 monosit ve farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinin 24 saatlik kültürü sonrası metabolik aktivitesinin incelendiği Alamar blue testi sonuçları Şekil 4.25 verilmektedir. PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerin 3 günlük kültürü sonrası hücre tutunmasının faz kontrast mikroskobu ile incelemesi Şekil 4.26’de verilmiştir. Farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinin 3 günlük kültürünün metabolik aktivitesinin incelendiği Alamar blue testi sonuçları Şekil 4.27 verilmektedir. THP-1 makrofajların 3 günlük kültürü sonrası hücre tutunmasının DAPI/Phalloidin ile incelemesi Şekil 4.28 ve SEM incelemesi Şekil 4.29’da verilmektedir.

	Kontrol	TPU-1		TPUU-3	
		Film	3B doku iskelesi	Film	3B doku iskelesi
Besiyeri					
Besiyersiz					

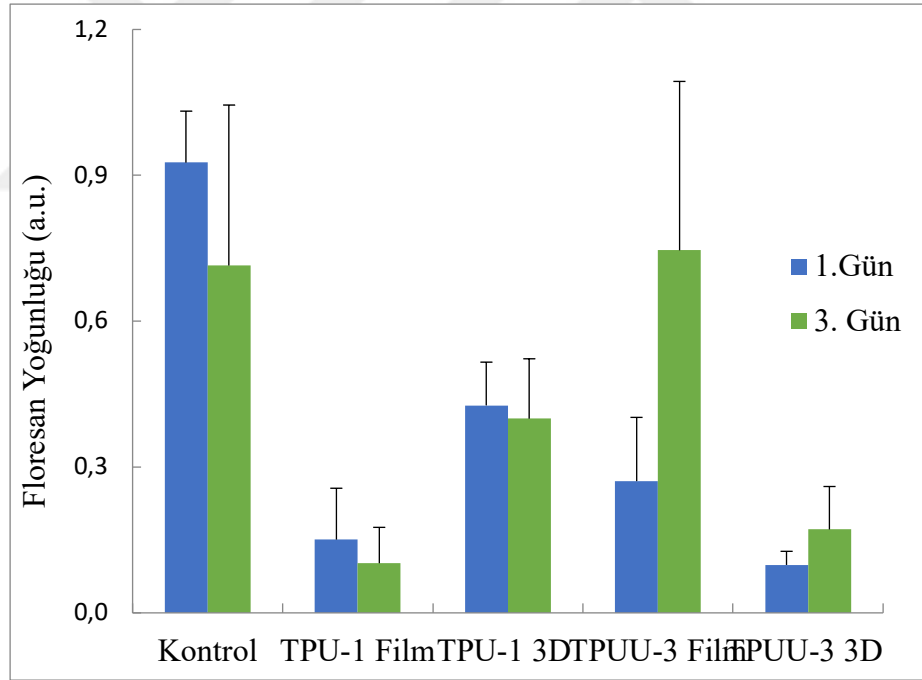
Şekil 4.24 TPU-1 ve TPUU-3 örneklerde THP-1 monosit hücre davranışlarının incelenmesi (1. Gün)



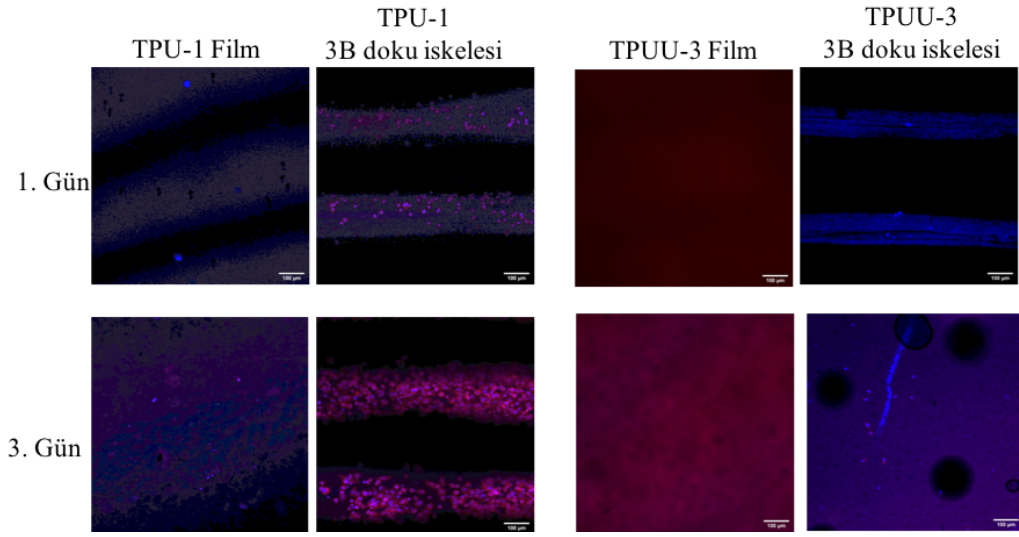
Şekil 4.25 TPU-1 ve TPUU-3 örneklerde THP-1 monosit ve makrofaj hücrelerin 1., Gün Alamar Blue test sonuçları

	Kontrol	TPU-1		TPUU-3	
		Film	3B doku iskelesi	Film	3B doku iskelesi
1. Gün					
3. Gün					

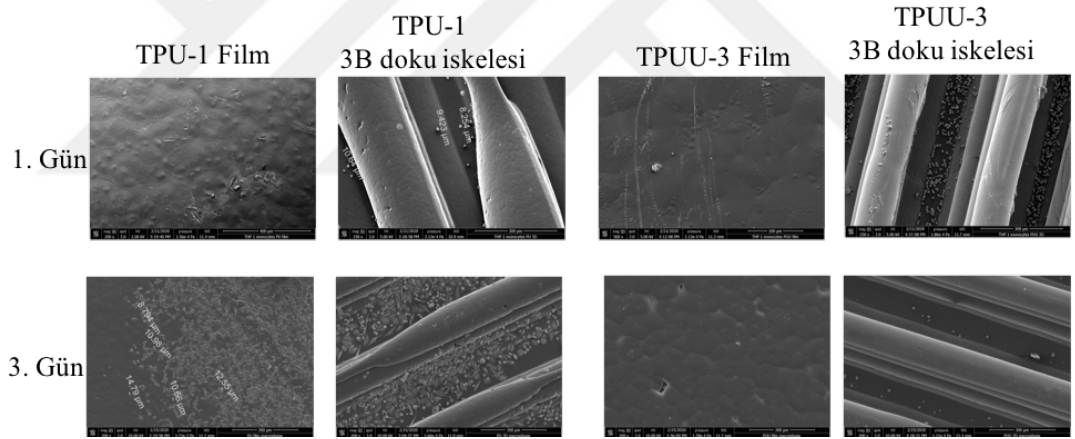
Şekil 4.26 TPU-1-TPUU-3 doku iskelelerinin THP-1 makrofaj hücre davranışlarının incelenmesi (1., 3. gün)



Şekil 4.27 Doku iskelelerinin üzerinde PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerin 1., 3. Gün Alamar Blue test sonuçları



Şekil 4.28 TPU-1 ve TPUU-3 doku iskelelerinin THP-1 makrofaj hücre davranışlarının DAPI/Phalloidin incelenmesi (1., 3. Gün) (ölçek:100μm)



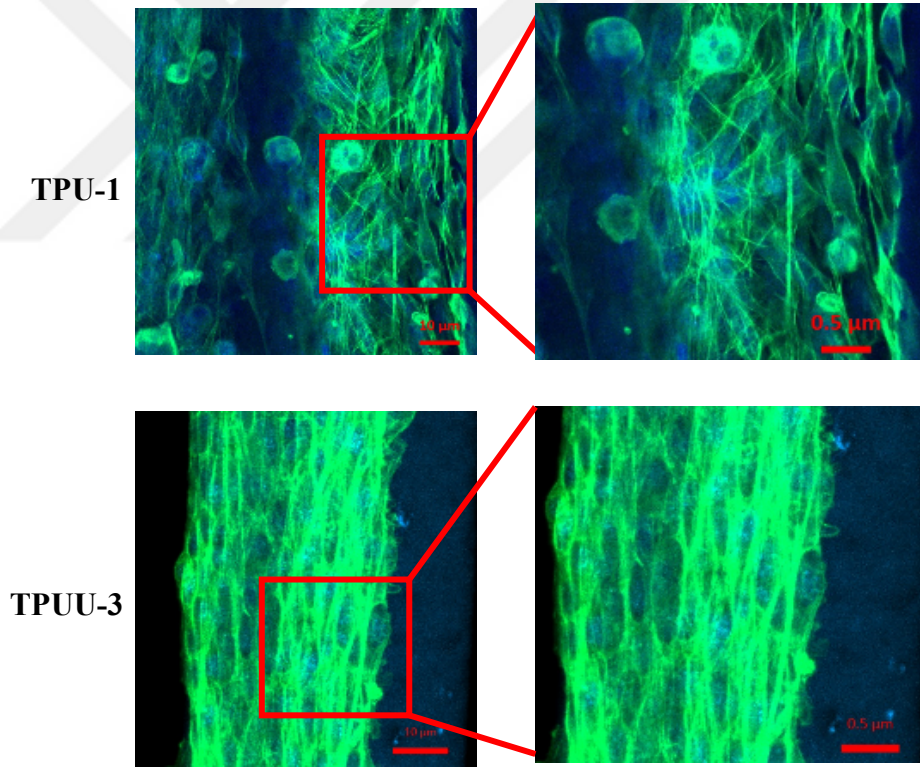
Şekil 4.29 TPU-1 ve TPUU-3 doku iskelelerinin THP-1 makrofaj hücre davranışlarının SEM ile incelenmesi (1., 3. Gün)

Elde edilen sonuçlar, polimerlerin hem film hem de 3D printed halde makrofajlar ile kontrollü bir immun yanıt gelişmesine neden olduğunu ve TPU-1 polimerinin daha az, TPU-3 polimerinin ise daha fazla immun reaktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Yüksek oranda yangısal tepki ile rejenerasyonu tetiklenen iskelet kası dokusuna yönelik uygulamalar için, büyük hacimli defektlerde TPU-3'ün, daha yüzeysel defektlerin rejenerasyonu için ise TPU-1'in kullanımının daha uygun olacağı düşünülmektedir. Bu sonuçların kas hücreleri ve makrofajların ko-kültürlerinde sinerjistik etkileşimlerinin

inceleneceği ileriki çalışmalarımızda daha ayrıntılı biçimde ortaya konması beklenmektedir

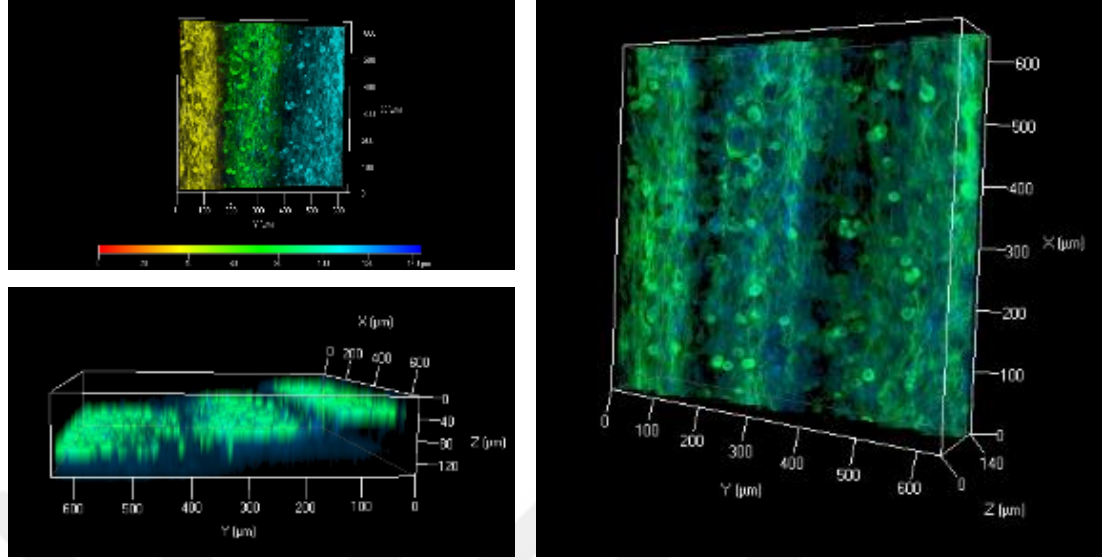
4.6.3 Doku iskelelerinin *in vitro* değerlendirme sonuçları

3B doku iskelelerinin üzerine ekilen C2C12 hücreleri, kültürün 7. gününde fikse edilerek aktin filament/hücre çekirdeği görüntülemesi için Phalloidin/DAPI ile boyanmıştır ve sonuçlar **Şekil 4.30**'de sunulmuştur. TPU-1 3B doku iskeleleri üzerinde, TPUU-3 3B doku iskelelerine kıyasla daha fazla hücre yayılımı gözlenmiştir. TPUU-3 3B doku iskelelerinin paralel fiberlerinin üzerinde C2C12 hücrelerinin daha fazla yönlendiği gözlenmiştir (Şekil 4.30). C2C12 hücrelerinin 3B doku iskelelerinin 3B yapısı içindeki yayılımı **Şekil 4.31**'de verilmiştir.

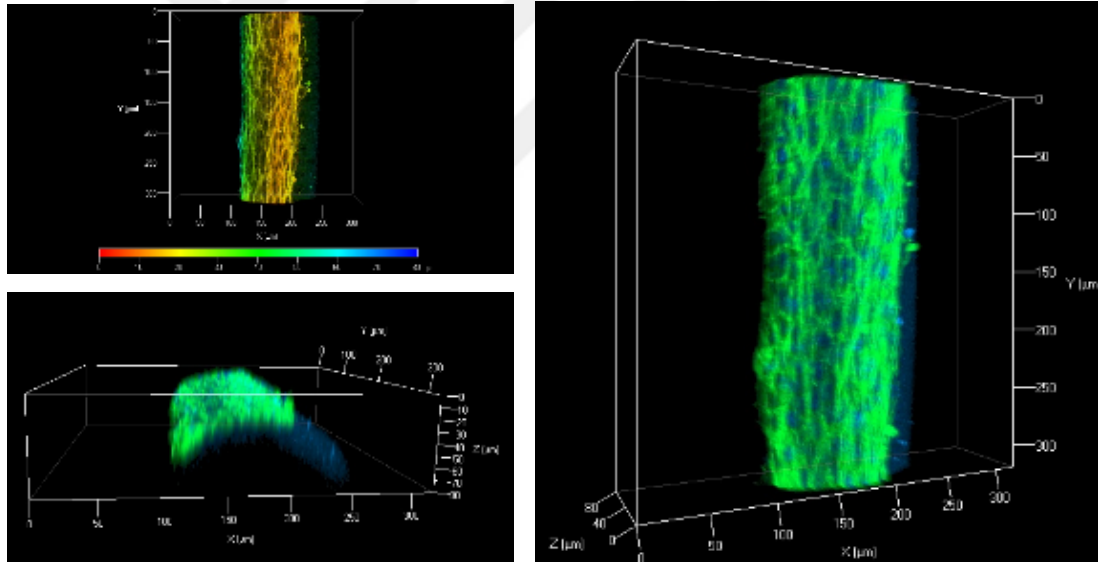


Şekil 4.30 C2C12 hücreleri ekilen 3B doku iskelelerinin 7.gün Phalloidin/DAPI boyaması. Yeşil boyamalar Phalloidin, mavi boyamalar DAPI ifade etmektedir

TPU-1

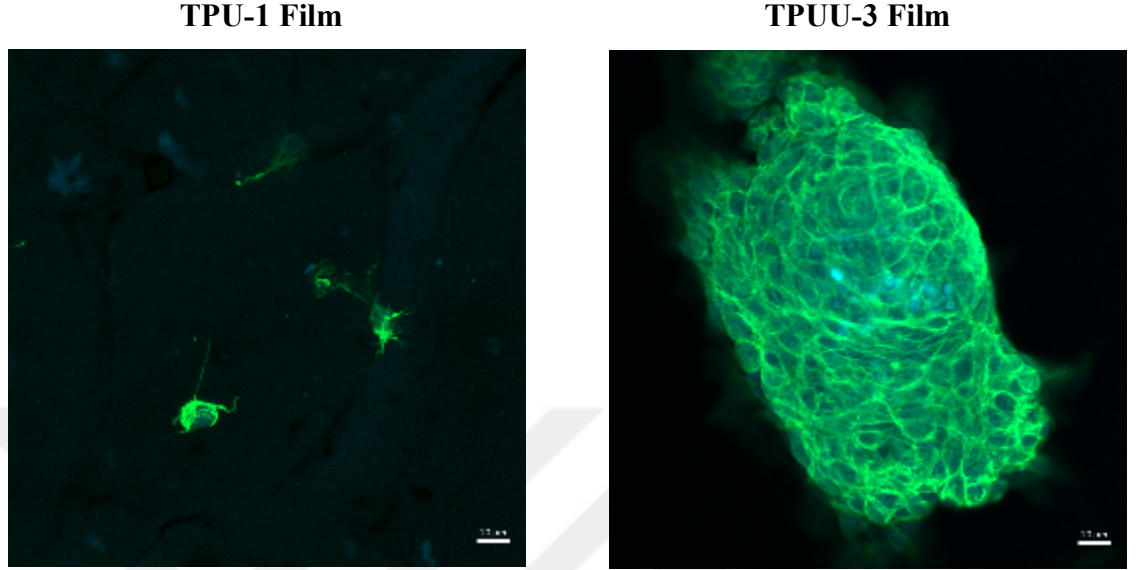


TPU-3



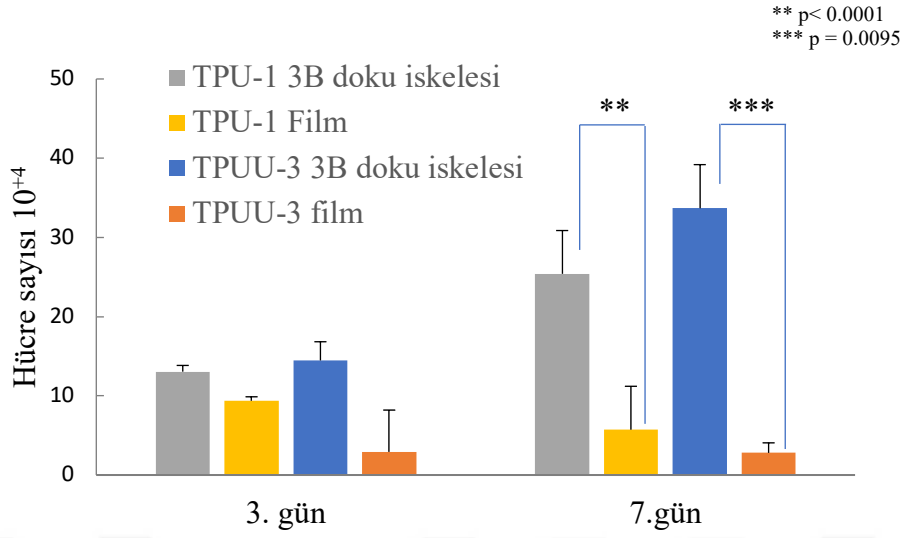
Şekil 4.31 C2C12 hücreleri ile ekilen 3B doku iskelelerine hücrelerinin yayılımı.

Şekil 4.32’da görüldüğü üzere desensiz film örnekler üzerinde hücre yayılımı gözlenmemiştir.



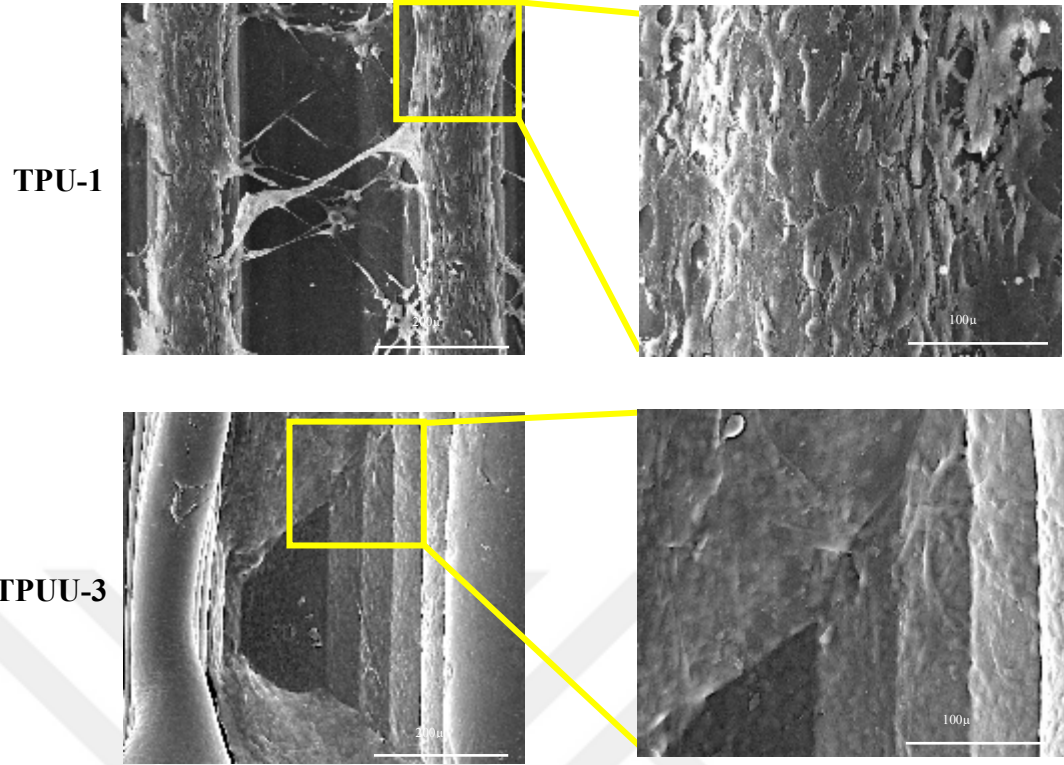
Şekil 4.32 C2C12 hücreleri ile ekilen film örneklerin 7.gün Phalloidin/DAPI boyaması. Yeşil boyamalar Phalloidin, mavi boyamalar DAPI ifade etmektedir

Doku iskeleleri üzerindeki canlı hücre sayısının kantitatif olarak belirlenebilmesi için kültürün 3. ve 7. günlerinde Alamar Blue testi uygulanmıştır. Phalloidin/DAPI boyamasında da gösterildiği gibi TPU-1 3B doku iskelelerinde hücreler daha fazla hücre canlılık gösterirken, film örneklerde kültürün devamıyla hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.33).

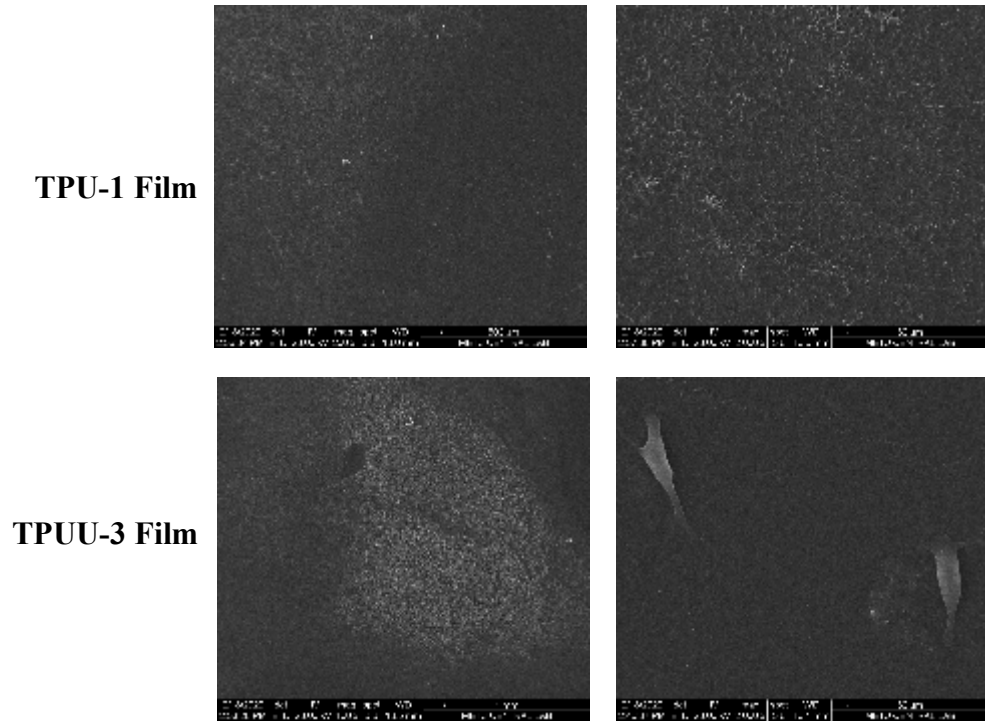


Şekil 4.33 Doku iskeleleri üzerinde Alamar Blue yöntemiyle canlı hücre sayısı belirlenmesi. Mavi barlar TPUU-3 3B doku iskelesini, turuncu barlar TPUU-3 film örnekler, gri barlar TPU-1 3B doku iskelesini, sarı TPU-1 film örnek göstermektedir

Doku iskelelerine tutunan hücrelerinin morfolojileri SEM ile de incelenmiştir. **Şekil 4.34** ve **4.35**'de görüldüğü üzere 3B doku iskelelerine C2C12 hücreleri tutunup yayılırken, film örneklerine hücreler yapışmama eğilimindedir. Bu sonuçlara göre, SEM incelemesi Phalloidin/DAPI boyaması verilerini desteklemektedir ve TPU ve TPUU yüzeylerde hücre tutunması ve canlılığının devamı için 3B fiber yapısına sahip doku iskelelerinin kullanımı gereklidir.



Şekil 4.34 C2C12 hücreleri ekilen 3B doku iskelelerinin 7.gün SEM görüntüleri



Şekil 4.35 C2C12 hücreleri ekilen film örneklerin 7.gün SEM görüntüleri

4.7 *in vivo* Çalışmalar

TPUU-3 kodlu polimer ile üretilmiş 3B yapıda doku iskelelerinin iskelet kas dokusunun yenilenmesindeki *in vivo* etkinliği wistar sıçanların TA kasına implantasyonu ile incelenmiştir. Her 3 deney grubundaki hayvanlara post-operasyon süreçte ağrı kesici ve inflamasyon engelleyici herhangi bir ilaç kullanılmamıştır. Post-op süreçte hayvanlar normal yürüme ve tırmanma davranışlarını sergilemişlerdir. İmplantasyon gerçekleştirilen sol arka ayaklarında inflamasyon belirtisi olan şişlik ve kızarıklık gözlenmemiştir.

4.7.1 Yürüme testi bulguları

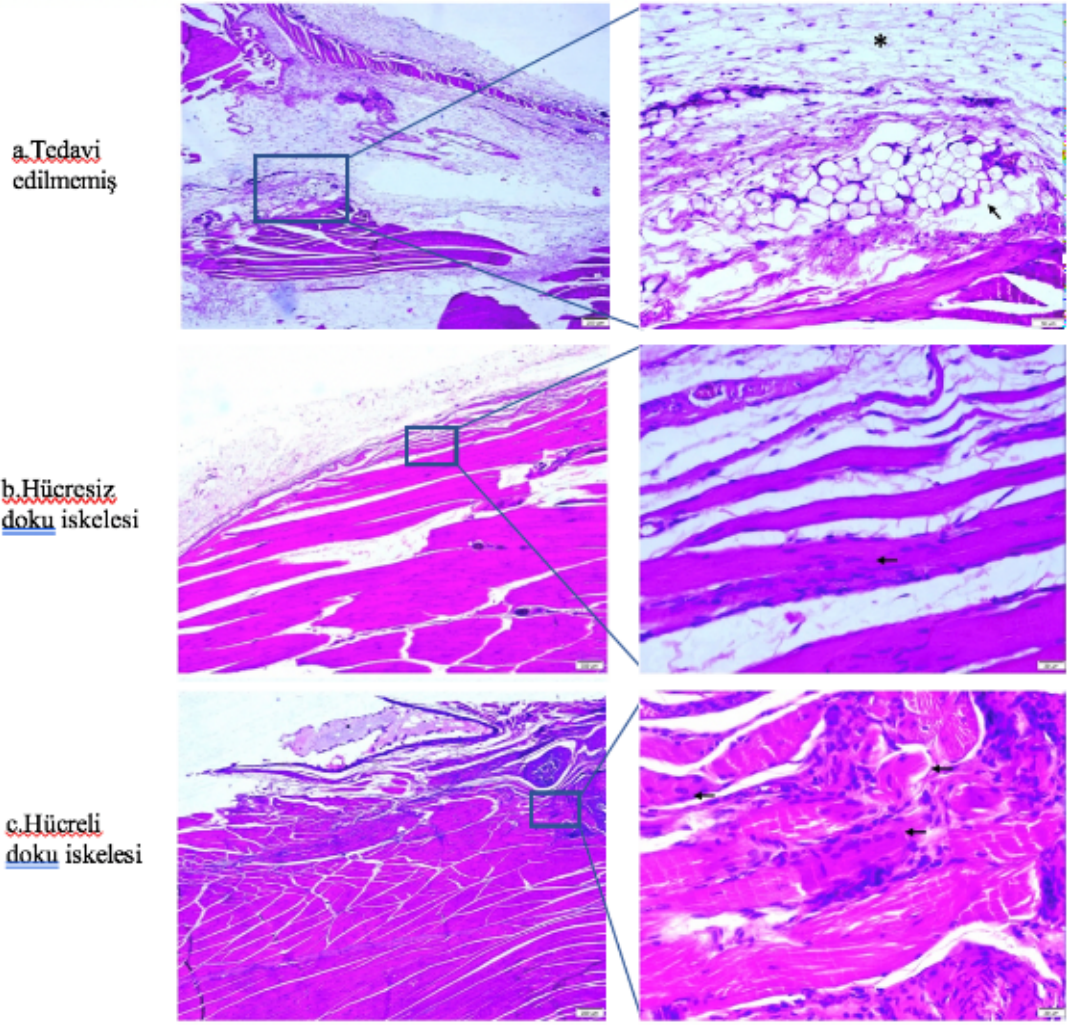
Operasyon sonrası 4. haftanın sonunda hücresiz doku iskelesi implante edilmiş hayvanlara yürüme testi uygulanmıştır. 4. haftanın sonunda ayakları mavi boya ile boyanan sıçanları dar kapalı bir alanda yürütülerek ayak izleri alınmış ve ayak izlerinin arasındaki uzaklık ilişkileri ile eşitlik 3.8 ve eşitlik 3.9 kullanılarak siyatik fonksiyon indeksi -2.05 ± 6.3 olarak ve tibial fonksiyon indeksi -5.53 ± 7.07 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Hücresiz doku iskelesi implante edilen hayvanların siyatik fonksiyon indeksi ve tibial fonksiyon indeksi

	SFI	TFI
Hücresiz doku iskelesi	-2.05 ± 6.3	-5.53 ± 7.07

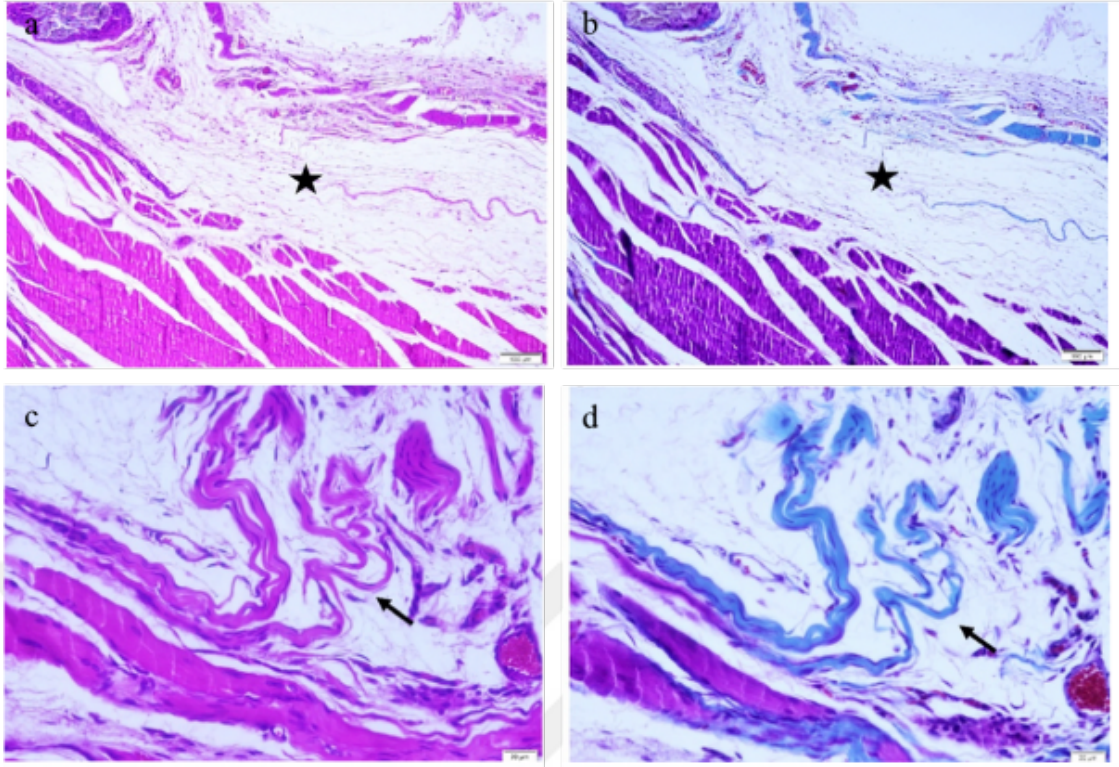
4.7.2 Histopatolojik değerlendirme bulguları

4 haftalık gözlem sonunda implantasyon gerçekleştirilen bütün hayvanlar sakrifiye edilmiş ve operasyon bölgelerinden alınan dokular %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda fikse edilmiştir. 3 grupta gerçekleştirilen *in vivo* çalışmanın karşılaştırmalı histopatolojik değerlendirmesi **Şekil 4.36**'de verilmektedir. Tedavi uygulanmayan deney grubunda hasar bölgesinde kas atrofisi ile birlikte bağ doku ve yağ hücreleri gözlenirken (Şekil 4.36a), hücresiz doku iskelelerinin implante edildiği deney gruplarında bağ doku çoğalması ve kısıtlı kas yenilenmesi, hücreli doku iskelelerinin implantasyonunda ise kas volümünün homojen bir şekilde geri kazanıldığı ve yoğun kas rejenerasyonu (oklar) gözlenmiştir.



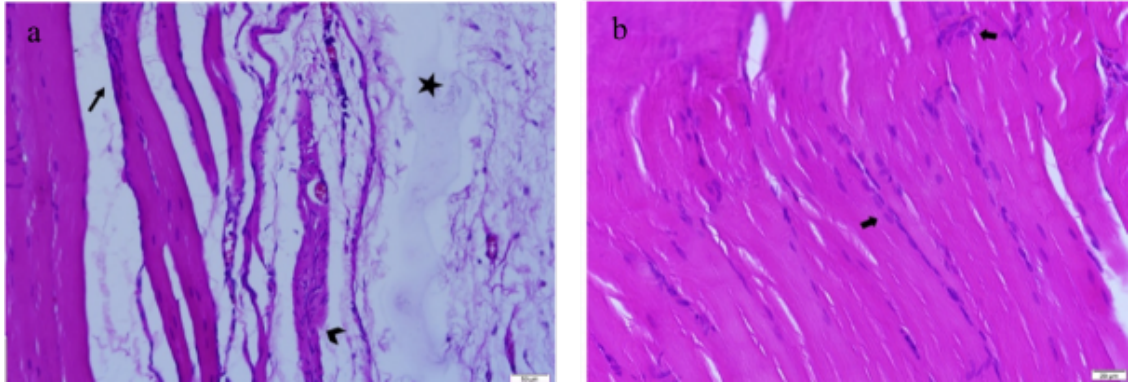
Şekil 4.36 Hematoksilen-Eozin a) Tedavi edilmemiş grubunda defekt alanında kas atrofisi ile birlikte bağ doku (Asteriks) ve adipoz (ok) hücreler gözlenmektedir. b) Hücresiz implant grubunda bağ doku çoğalması ve kısıtlı kas rejenerasyon (ok) gözlenmektedir. c) Hücreli implant grubunda kas volümün homojen bir şekilde geri kazanıldığı ve yoğun kas rejenerasyonu (oklar) gözlenmektedir

Tedavi uygulanmayan sıçanların histopatolojik incelemesinde, şiddetli kas atrofisi ve hafif kas rejenerasyonu ile karşılaşmıştır. Defekt bölgesinde kas dokusu kaybı (Şekil 4.37 a ve b’de yıldız ile gösterilen bölgeler) ve yerinin ağırlıklı olarak kollajen ipliklerin bulunduğu fibröz bağ doku ve adipoz doku tarafından doldurulduğu gözlenmiştir (Şekil 4.37 c ve d’de ok ile gösterilen iplikli yapılar).

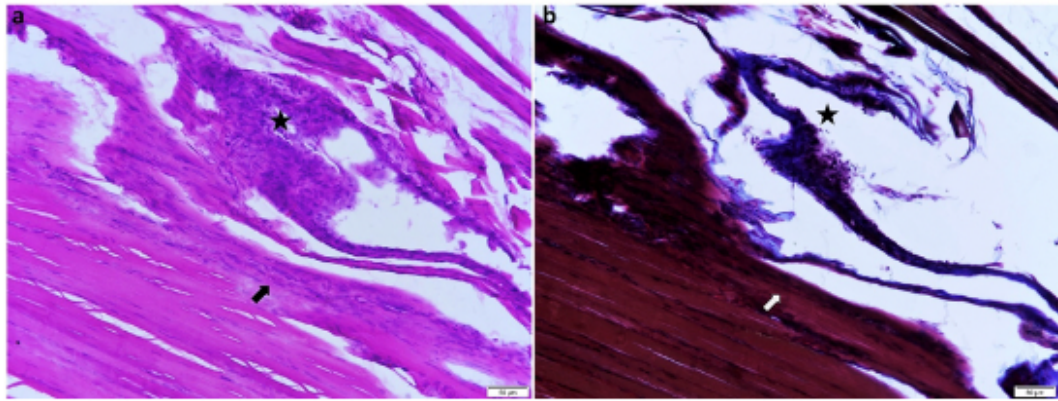


Şekil 4.37 Tedavi edilmemiş deney grubunun a, c) Hematoksilen-Eozin ve b, d) Masson'un Trikrom boyama görüntüleri a, b) Geniş defekt alanları yıldız ile gösterilmektedir. c, d) Ok ile kasların yerini doldurmaya çalışan kollagen demetler göstermektedir. (Masson'un Trikrom boyasıyla mavi boyanan bölgeler kollagen demetleri ifade etmektedir.)

Hücreli doku iskeleleri yerleştirilen sıçanların histopatolojik incelemesinde hem boyuna ve hem de enine kesitlerde hücreli doku iskelesine ait kalıntılar gözlenmiştir. Bahsedilen bu kalıntılar, iskelet kas lifleriyle paralel dizilim gösteren geniş boşluklar (porlar) şeklindedir (Şekil 4.38). Porların çevresinde yeni şekillenen kapiller halinde damar oluşumlarına (neovaskülarizasyon) ve Masson'un Trikrom boyamasıyla bağ doku hücrelerle uyumlu olarak mavi renkte boyanan hücrelere rastlanmıştır. Ayrıca, özellikle doku iskelesi porlarının altındaki alanlarda az sayıda rejenere olan (yenilenen) kas liflerine rastlanmıştır (Şekil 4.39).



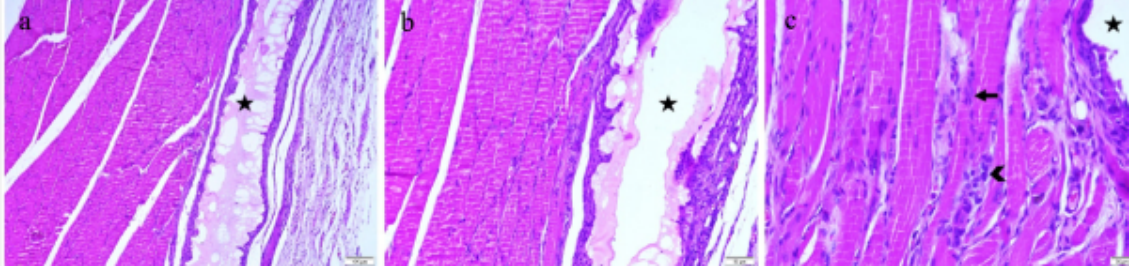
Şekil 4.38 Hematoksilen-Eozin boyaması ile, a) hücresiz doku iskelesine ait kalıntılar (yıldız), fibröz bağ doku proliferasyon (ok başı) ve porların altında az sayıda rejenere olan (yenilenen) kas lifleleri (ok) b) Rejenere olan kas lifleri. Sıra şeklinde dizilmiş veziküler çekirdeklere sahip miyoblast hücreleri gözlenmektedir



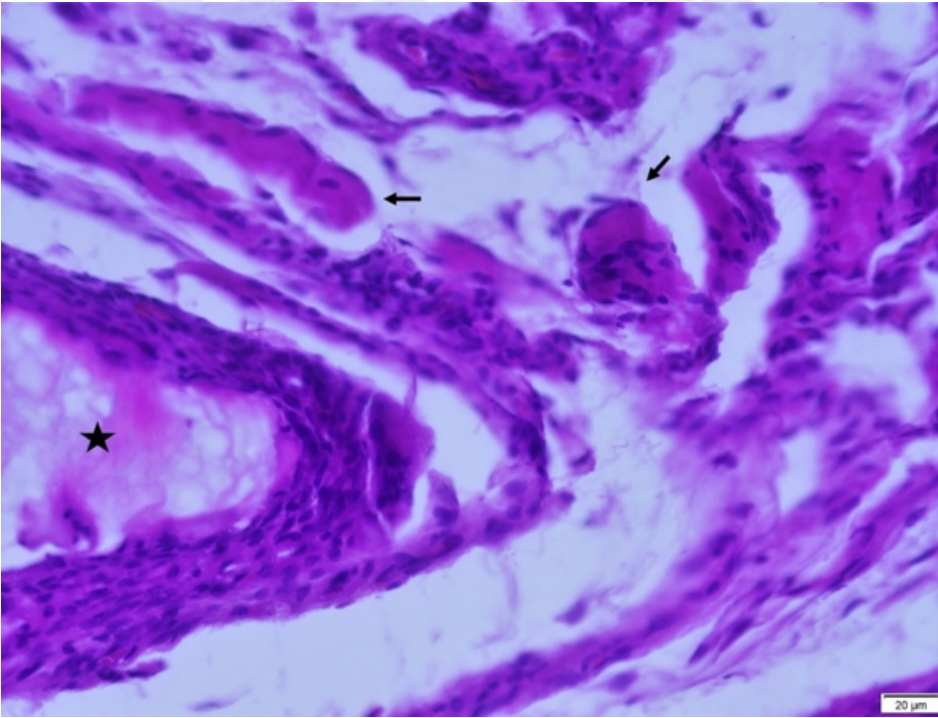
Şekil 4.39 a) Hematoksilen- Eozin boyaması ile bağ doku proliferasyonu (yıldız) ve çoğalan miyoblastlar (ok), b) Masson'un Trikróm boyasıyla boyanmış kesiti. Bağ doku hücrelerin mavi renkte boyanması (yıldız) ve çoğalan miyoblastların kırmızı renkte boyası (beyaz ok) göstermektedir

Hücreli doku iskeleleri yerleştirilen sıçanların histopatolojik incelemesinde belirgin kas kütlesi artışı ve defekt yerlerinde neovaskülarizasyon'un eşlik ettiği yeni şekillenen yoğun kas lifleri gözlenmiştir. Hücreli doku iskelesine ait porların içlerinde, duvarlarında ve çevresinde kas dokusu hücrelerle uyumlu olarak pembe boyanan miyoblastlar dikkati çekmiştir (Şekil 4.40). Rejenere olan kas hücrelerin morfolojisi; sentral nükleer yerleşim gösteren miyofibriller, bazofilik ve sıra şeklinde yakın dizilim gösteren hücreler ve binükleer veya çok çekirdekli dev hücreler Şekil 4.41'de oklar ile gösterilmektedir. Bu

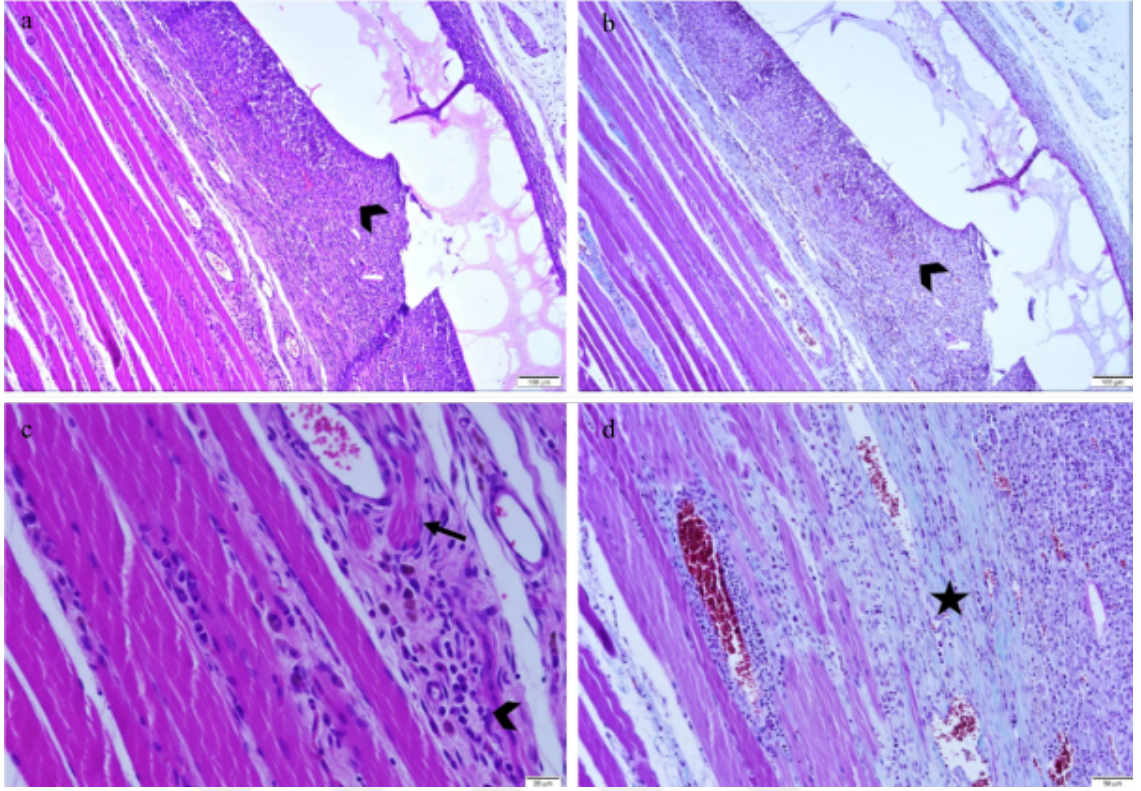
hücreler bazı alanlarda sağlam doğal TA kasına benzemektedir. Kas hücrelerinin aralarında, çoğunlukla fibroblast ve fibrositlerden oluşan, değişen şiddette fibröz bağ doku proliferasyonuna da rastlanmıştır (Şekil 4.42).



Şekil 4.40 Hematoksilen-Eozin boyaması ile yoğun miyoblastlar ile hücreli doku iskelesinin porları (yıldızlar). Porların altında sıra şeklinde nükleer dizilim gösteren rejenere kas lifleri (ok) ve aralarında yangısal hücre infiltrasyonu (ok başı) göstermektedir

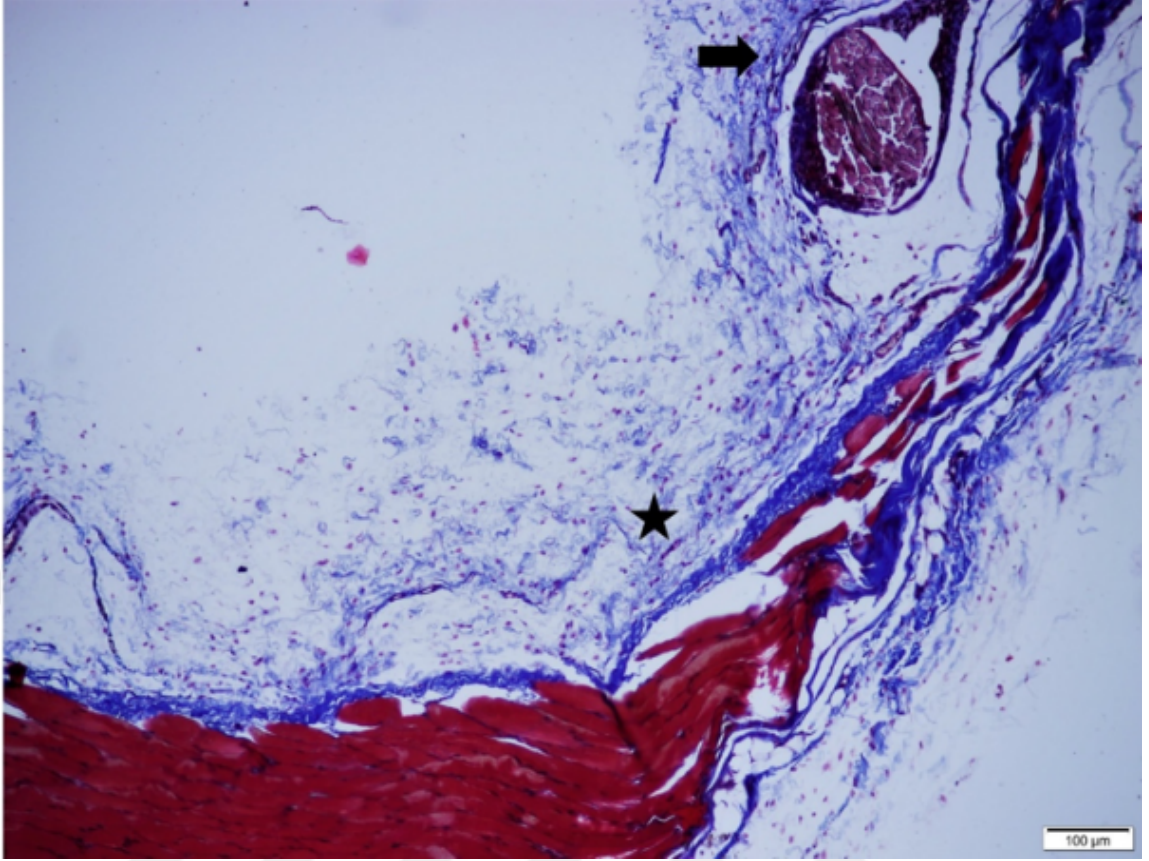


Şekil 4.41 Hematoksilen-Eozin boyaması ile doku iskelesi porlarının (yıldız) çevresinde sentral nükleer yerleşim gösteren ve çok çekirdekli rejenere kas hücreler (oklar) gösterilmektedir



Şekil 4.42 a, c) Hematoksilen-Eozin, b, d) Masson'un Trikrom boyası. b) Masson'un trikrom boyasıyla kırmızı boyanan miyoblastlarıyla (ok başı) beraber yoğun yangısal hücre infiltrasyonu. c)Yakın görünümde yeni şekillenen küçük miyotüpleri (ok) ve aralarında yangı hücrelerin eşlik ettiği d) Masson'un trikrom boyasıyla mavi boyanan bağ doku hücreler (yıldız) gösterilmektedir

Ayrıca hücreli gruplarda daha yoğun olmak üzere, hücreli ve hücreli doku iskelesi gruplarında belirgin yangısal hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Lenfositlerin ve makrofajların yoğunlukta olduğu mononükleer hücre infiltrasyonu bazı preparatlarda nötrofil lökositlerce eşlik edildiği dikkat çekti. Ayrıca sütür materyalin çevresinde yangısal infiltrasyonu ile beraber çok çekirdekli dev hücrelerin de bulunduğu sütür granülomlarına rastlandı (Şekil 4.43).



Şekil 4.43 Sütür materyali (ok) ve implant alanında kollagen iplikleri (yıldız), Masson'un Trikróm boyası.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Tartışma

Bu tez kapsamında biyoyoumlu, mekanik ve biyobozunma özellikleri bakımından doğal dokuyu taklit edebilecek nitelikte özgün TPU ve TPUU sentezlenmiş ve bu polimerlerin 3B biyoyazıcı ile kullanımıyla paralel hizalanmış fiber yapıda 3B doku iskelesi üretilmiştir. Sitotoksikite ve immün reaktivite özellikleri incelenen doku iskeleleri daha sonra *in vitro* ve *in vivo* ortamda etkinlik değerlendirmesine tabi tutulmuştur. *in vitro* ortamda, C2C12 miyoblast hücrelerinin 3B doku iskelelerinin üzerinde tutunma, çoğalma ve paralel yönelme etkinlikleri incelenmiştir. *in vivo* çalışmalarda ise, 3B doku iskelelerinin büyük hacimli kas kaybı modelinde kas rejenerasyonuna etkisi incelenmiştir.

5.1.1 Doku iskelesi üretim sonuçlarının değerlendirilmesi

Gua vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada organik çözücü ile gerçekleştirilen 3B baskılamada organik çözücünün kaynama noktasının 3B baskıların yapısını etkilediğini gösterilmiştir (Gua vd. 2013). Bu nedenle uygun organik çözücü seçimi için yürütülen çalışmalarda olduğu gibi THF ve IPA gibi kaynama noktası yüksek çözücüler kullanılarak Şekil 4.8’de görüldüğü üzere alınan baskılarda, 1. katmanda %66 civarında yüzeye yayılma gözlenmiştir. DCM kullanılarak alınan 3B doku iskelelerinin eş dağılımlı fiber yapıları ve THF ve IPA kullanılarak 3B baskılaması ile alınan doku iskelelerine kıyasla 3B modele en uygun şekilde düzgün morfolojiye sahip olduğu gözlenmektedir.

Gua ve arkadaşları çalışmalarında uygun çözücü seçiminin yanında polimer çözeltisinin reolojik özelliklerinin de 3B baskılamayı etkilediğini göstermiştir (Gua vd. 2013). Uygun polimer konsantrasyonunun bulunması amacıyla %50, %60, %70 ve %80 (w/v) konsantrasyonda çözelti hazırlanarak 3B baskıları alınmıştır. 3B model tasarımında fiber kalınlığı iğne ucunun iç çapı göze alınarak 0.26 mm olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu tasarım ışığında 3B baskılama sonuç fiber çapları ölçülmüştür. %50 ve %60 (w/v) konsantrasyonda çözelti ile alınan 3B baskıların fiber çapı 0.845 ± 0.01 ve 0.622 ± 0.006 mm olarak ölçülmüştür ve düşük viskozite sebebiyle tasarıma kıyasla %10’dan fazla

sapma gözlenmiştir. %80 (w/v) konsantrasyona sahip çözelti ile alınan 3B baskının fiber çapı ise 0.220 ± 0.008 mm olarak hesaplanmıştır. %70 (w/v) konsantrasyona sahip çözelti ile alınan 3B baskının fiber çapı 0.264 ± 0.015 mm olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar ışığında en uygun konsantrasyonun %70 (w/v) olduğu saptanmıştır.

Film ve 3B doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4. 11) film örneklerin gözeneksiz yüzeye sahip olduğu gözlenmektedir. Gözeneksiz yüzeylerin hücre tutunmasını negatif etkilediği literatür verisi tarafından da desteklenmektedir. Bu nedenle, 3B doku iskeleleri oluşturulurken doğal doku yapısının taklit edilmesi için paralel hizalanmış fiber tasarımı tercih edilmiştir. Şekil 4.11a'da görüldüğü gibi TPU-1 veTPUU-3 ile üretilen 3B doku iskeleleri düzenli fiber dağılımına sahiptir. TPUU-2 ile üretilen doku iskelesinin SEM görüntüsü incelendiğinde fiberlerinin düzenli yerleşmediği ve alt katmanlarda yayılmaların olduğu gözlenmektedir.

5.1.2 Biyobozunma bulgularının değerlendirilmesi

Hücre kültürü ortamında gerçekleştirilen biyobozunma çalışmalarında 56. günün sonunda TPU-1 ve TPUU-3'de %7-9 oranında kütle kaybı izlenirken TPUU-2'de de %13 oranında kütle kaybı izlenmiştir. TPUU-2'in 56. gün sonunda TPU-1 ve TPUU-3'e oranla daha kırılkan olduğu gözlenmiştir. Nazeer ve arkadaşlarının hücre kültürü ortamında biyobozunmasını inceledikleri PCL/ipek fibroin sentetik yapılarının 14. haftanın sonunda %20 oranında kütle kaybı izlendiğini göstermişlerdir (Nazeer vd. 2019).

Lipaz enzimi sulu ortamda polyesterlerdeki ester bağlarının kopmasını katalize eden bir enzimdir. Literatürde yapılmış çalışmalarda PCL'in biyobozunmasını arttırdığı gözlenmiştir (Azevedo ve Reis 2004). Bu nedenle yumuşak segmenti PCL olan TPU-1, TPUU-2 ve TPUU-3 polimerlerinin enzimatik biyobozunma çalışmaları lipaz enzimi ile gerçekleştirilmiştir. Xu ve arkadaşları yumuşak segment olarak PCL, sert segment olarak HDI kullanılarak sentezledikleri poliüretanlar için lipaz ile gerçekleştirdikleri enzimatik biyobozunma çalışmalarında, 14. günün sonunda %20 oranında kütle kaybı gözlemlemişlerdir (Xu vd. 2016). Bu çalışmadan farklı olarak, bu tez çalışmasında TPUU-2 ve TPUU-3 polimerlerinin zincir uzama adımı PEO kullanılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında bu tez kapsamında sentezlenen poliüretan ve poliüretan-üre

polimerlerinin 56. günün sonunda %80 oranında biyobozunma gösterdiği gözlenmektedir. Winkler ve arkadaşları hasarlı bir kasın 8. hafta sonunda %50 oranında rejenere olduğunu göstermişlerdir (Winkler vd. 2011). Bu nedenle iskelet kas doku yenilenmesinin uzun bir süreç olduğu gözlenmektedir ve iskelet kas doku yenilenmesinde kullanılacak doku iskelelerinin bu süreç boyunca destek sağlaması beklenmektedir. Bu tez çalışmasında sentezlenen TPUU-3 polimerinin, 56. günün sonunda %70 oranında kütle kaybı göstermesi iskelet kas doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir bir malzeme olduğunu kanıtlamaktadır.

5.1.3 Doku iskelelerinin mekanik karakterizasyon bulgularının değerlendirilmesi

Doğal iskelet kası dokusunun sertlik değerinin (Esneklik (Young) modülü) ~ 15 kPa olduğu bilinmektedir. Bu düşük sertlik değerine sahip ve aynı zamanda kas kasılması sırasında oluşan yükleri taşıyabilme özelliğine sahip elastikiyet ve kuvveti gösterebilecek mekanik özelliklere sahip doku iskelelerinin üretimi bu alandaki ve en büyük zorluklardan biridir. İskelet kası dahil olmak üzere yük taşıyan dinamik dokuların 3B biyobaskı çalışmalarında sıklıkla kullanılan, altın standart niteliğindeki PCL ile üretilen 3B doku iskelesinin sertlik değerinin 57.51 ± 5.71 MPa olduğu görülürken, özellikle TPU-1 ve TPUU-2 ile üretilen 3B doku iskelelerinin sertliğinin PCL'e göre yaklaşık 1,5 kat daha fazla doğal dokuya yakın olduğu belirlenmiştir. Polimerlerin çekme dayanımları karşılaştırıldığında, TPUU-3'un PCL'e kıyasla doğal kas dokusuna daha yakın özellik gösterdiği belirlenirken, TPUU-1 ve TPUU-2'nin TPUU-3'e kıyasla yaklaşık 2 kat daha fazla dirençli olduğu belirlenmiştir. TPUU-3 ile üretilen doku iskelelerinin esneklik modülleri dikkate alındığında literatürde iskelet kas doku mühendisliği uygulamaları için geliştirilen poliüretanlardan 3.5 kat daha fazla doğal dokuya yakın olduğu gözlenmektedir (Ergene vd. 2019).

Sertlik ve dayanım ile birlikte, iskelet kası doku mühendisliğinde kullanılacak bir biyomalzemenin sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri de kopmadan önce esneyebilme ve şeklini koruyabilme (elastikiyet) özellikleridir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, TPUU-3 kodlu polimer ile üretilen 3B doku iskelesi 939.39 ± 106.05 ve film örneğin 756.37 ± 50.21 oranında uzama özelliği, ve uygun sertlik değerine sahip olması ile, iskelet kası doku mühendisliğine yönelik en uygun

malzeme olduğu değerlendirilmiştir. Mekanik özellikler incelendiğinde TPUU-2'ün diğer polimerler kıyasla daha kırılğan olduğu gözlenmektedir.

5.1.4 *in vitro* alışma bulgularının değerlendirilmesi

TPUU-2 polimeri uygun olmayan mekanik özellikleri ve hızlı biyobozunma davranışından dolayı *in vitro* alışmalarda deney gruplarından çıkarılmıştır. TPU-1 ve TPUU-3 polimeri ile üretilen doku iskelelerinin toksik özellik göstermediği sitotoksite testi ve immün uyumluluk testleri ile kanıtlanmıştır.

5.1.4.1 Doku iskelelerinin hücre költürü çalışmalarından elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi

C2C12 hücrelerinin paralel hizalanmış mimariye sahip doku iskeleleri üzerinde hizalandığı çeşitli araştırma grupları tarafından gösterilmiştir. Liao vd 2008 yaptıkları çalışmada elektro eğirme ile üretilen paralel hizalanmış doku iskelelerinde C2C12 hücrelerinin film örneklerine kıyasla daha fazla hizalandığı gözlenmektedir (Liao vd. 2008). Bu tez çalışmasında aktin filament (Phalloidin)/hücre çekirdeği (DAPI) boyamaları sonuçları incelendiğinde (şekil 4.27), TPU-1 ile üretilen 3B doku iskelelerinde C2C12 hücrelerinin yüzeye yayıldığı gözlenmektedir. TPUU-3 3B doku iskelelerinde C2C12 hücrelerinin yüzeye yayıldığı gözlenirken, paralel fiberler üzerinde hizalandığı gözlenmektedir. şekil 4. 28'de verilen Phalloidin/DAPI boyaması görüntüsü ile C2C12 hücrelerinin 3B doku iskelelerinin 3B yapısına yayıldığı görölmektedir. 3B yapının hücre tutunması ve hücrelerin hizalanmasında etkili olduğu gözlenmiştir. Phalloidin/DAPI boyaması ve SEM görüntülerini, Alamar Blue testi de desteklemektedir.

TPU-1 ve TPUU-3'ün mekanik özellikleri kıyaslandığında ve hücre költürü çalışmalarından elde edilen bilgiler ışığında, TPUU-3 kodlu polimerin en uygun yapı ve özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.

5.1.5 *in vivo* çalışma bulgularının değerlendirilmesi

5.1.5.1 Yürüme testi bulgularının değerlendirilmesi

Medinaceli ve arkadaşları opere edilmemiş sıçanlarda siyatik fonksiyon indeksi ve tibial fonksiyon indeksinin -11 ve +11 aralığında olduğunu göstermişlerdir (Medinaceli vd. 1982). Bu tez çalışmasında TA kasına implantasyonu gerçekleştirilen sıçanların yürüme testi sonuçlarında siyatik fonksiyon indeksi -2.05 ± 6.3 ve tibial fonksiyon indeksi -5.53 ± 7.07 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.8). Hesaplanan indeksler Medinaceli'nin normal sıçan indeksi ile karşılaştırıldığında, siyatik sinir ve tibial fonksiyonlarında hasar oluşmadığı görülmektedir.

5.1.5.2 Histopatolojik değerlendirme bulgularının değerlendirilmesi

Doku iskelesi kullanımının, hücresel tedavi seçeneklerine kıyasla *in vivo* kas rejenerasyonunu arttırdığı fare ve sıçanlarda yapılan çeşitli *in vivo* çalışmalarda, çeşitli araştırma grupları tarafından gösterilmiştir. İki farklı araştırma grubu tarafından yapılan çalışmalarda, hücreli doku iskelelerinin kas rejenerasyonuna hücresiz doku iskelelerinden daha fazla katkı sağladığını göstermişlerdir (Honick vd. 2018 and Kim J. vd 2018).

3 grupta gerçekleştirilen *in vivo* çalışmamızda, tedavi uygulanmayan deney grubunda hasar bölgesinde kas atrofisi ile birlikte bağ doku ve yağ hücreler gözlenirken (Şekil 4.22a), hücresiz doku iskelelerinin implante edildiği deney gruplarında bağ doku çoğalması ve kısıtlı kas yenilenmesi, hücreli doku iskelelerinin implantasyonunda ise kas volümünün homojen bir şekilde geri kazanıldığı ve yoğun kas rejenerasyonu gözlenmiştir.

Tedavi uygulanmayan sıçanların histopatolojik incelemesinde, şiddetli kas atrofisi ve çok hafif kas rejenerasyonu ile karşılaşmıştır. Hücresiz doku iskeleleri yerleştirilen sıçanların histopatolojik incelemesinde doku iskelelerinin porların çevresinde yeni şekillenen kapiller damar oluşumlarına (neovaskülarizasyon) ve Masson'un Trikróm boyamasıyla bağ doku hücrelerle uyumlu olarak mavi renkte boyanan hücrelere rastlanmıştır. Ayrıca, özellikle doku iskelesi porlarının altındaki alanlarda az sayıda rejenere olan kas liflerine rastlanmıştır (Şekil 4.25).

Hücreli doku iskelelerinin yerleştirildiği sıçanların histopatolojik incelemesinde belirgin kas kütlesi artışı ve defekt yerlerinde neovaskülarizasyonun eşlik ettiği yeni şekillenen yoğun kas lifleri gözlenmiştir (Şekil 4.26).

5.2 Sonuç

İskelet kası, insan vücut ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturan bir dokudur ve spor aktiviteleri, travma gibi nedenlerle hasar görmektedir. Hasar sonrası, iskelet kası sahip olduğu normalde uyku halinde bulunan uydu hücrelerinin aktivasyonu sonucu kendini yenileyebilmektedir. Ancak, kas iyileşmesi büyük hacimli kas kaybı yaşanan vakalarda tam olarak gerçekleşmemektedir. Bu gibi durumlarda klinikte sıklıkla otolog doku greftleri kullanılmaktadır ancak bu uygulamada da yeterli miktarda doku bulunmaması ve greft bölgesinde yaşanan sorunlar kullanımı kısıtlamaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımıyla büyük hacimli kas kayıplarında kullanıma yönelik fonksiyonel kas dokusu geliştirilmesine yönelik çalışmalar yürütülmektedir (Äärimaa vd. 2004, Maclean vd. 2012, Quintero vd. 2009, Turner ve Badylak 2012, Yılgör vd. 2012, Wang vd. 2016).

3B baskılama yöntemi, paralel fiberlerden oluşan ve kompleks damar ve sinir ağı yapısı içeren iskelet kasının fonksiyonel şekilde üretiminde önemli ve umut vaat eden bir 3B üretim teknolojisidir (Murphy ve Atala 2014, Derby 2012, Pfister vd 2003, Ong vd. 2017, Turner ve Badylak 2012, Duan vd. 2013). 3B baskılama ile doku iskelesi üretiminin en önemli zorluklarından biri mekanik ve kimyasal olarak iskelet kas doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir uygun malzemelerin mevcudiyetidir. Sentetik polimerler gerekli esnekliği, doğal polimerler ise kas kasılması sırasında oluşan kuvvetler için gerekli mukavemeti sağlayamamaktadır (Mi vd. 2017).

Bu tez çalışmasında sentezlenen özgün biyoyumlu ve biyobozunur elastomerik poliüretan ve poliüretan-üre ile üretilen doku iskeleleri in vitro çalışmalarda C2C12 hücrelerinin tutunup çoğalması ve yönlenmeleri bakımından elverişli olarak bulunmuştur. in vivo çalışmalarda ise, hücreli doku iskelelerinin implante edildikleri bölgede yeni miyoblast oluşumuna katkıda bulunduğunun gösterilmesi, sonraki araştırmalarımız için motivasyon teşkil etmektedir. Bununla birlikte, doku iskeleleri üzerine hücre tutunmasının artırılması ve miyogenik farklılaşmanın ve kasılma fonksiyonunun tam

olarak sağlanması gibi daha ileri seviye çalışmalarla geliştirilmesi gerekliliğini işaret etmektedir.



KAYNAKLAR

- Äärmaa, V., M. Kääriäinen, S. Vaitinen, J. Tanner, T. Järvinen, T. Best, and H. Kalimo. 2004. Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus. *Neuromuscular Disorders* 14:421–428.
- Atala, A., S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik. 2006. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 367:1241–1246.
- Azevedo, H., and R. Reis. 2004. Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate. Pages 177–202 *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.
- Barrioni, B. R., S. M. De Carvalho, R. L. Oréfice, A. A. R. De Oliveira, and M. D. M. Pereira. 2015. Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C* 52:22–30.
- Brazelton, T. R., M. Nystrom, and H. M. Blau. 2003. Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Developmental Biology* 262:64–74.
- Camarero-Espinosa, S., A. Calore, A. Wilbers, J. Harings, and L. Moroni. 2020. Additive manufacturing of an elastic poly(ester)urethane for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 102:192–204.
- Carr, L. K., D. Steele, S. Steele, D. Wagner, R. Pruchnic, R. Jankowski, J. Erickson, J. Huard, and M. B. Chancellor. 2008. 1-Year Follow-Up of Autologous Muscle-Derived Stem Cell Injection Pilot Study To Treat Stress Urinary Incontinence. *International Urogynecology Journal* 19:881–883.
- Chattopadhyay, S., and R. T. Raines. 2014. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers* 101:821–833.
- Derby, B. 2012. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science* 338:921–926.
- Duan, B., L. A. Hockaday, K. H. Kang, and J. T. Butcher. 2013. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 101 A:1255–1264.
- Ergene, E., B. S. Yagci, S. Gokyer, A. Eyidogan, E. A. Aksoy, and P. Yilgor Huri. 2019. A novel polyurethane-based biodegradable elastomer as a promising material for skeletal muscle tissue engineering. *Biomedical Materials (Bristol)* 14:1–26.
- Fan, Ying; Maley, Moira; Beilharz, Manfred; Grounds, M. 1996. Rapid Death of Injected Myoblasts in Myoblast. *Muscle and Nerve* 19:853–860.

- Fomby, P., A. J. Cherlin, A. Hadjizadeh, C. J. Doillon, V. Sueblinvong, D. J. Weiss, J. H. T. Bates, T. Gilbert, W. C. Liles, C. Lutzko, J. Rajagopal, D. J. Prockop, D. Chambers, A. Giangreco, A. Keating, D. Kotton, P. I. Lelkes, D. E. Wagner, and D. J. Prockop. 2010. Stem cells and cell therapies in lung biology and diseases: Conference report. *Annals of the American Thoracic Society* 12:181–204.
- Guan, J., K. L. Fujimoto, M. S. Sacks, and W. R. Wagner. 2005. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials* 26:3961–3971.
- Guo, S. Z., F. Gosselin, N. Guerin, A. M. Lanouette, M. C. Heuzey, and D. Therriault. 2013. Solvent-cast three-dimensional printing of multifunctional microsystems. *Small* 9:4118–4122.
- Honick, Gilbert, J., S. R. Iyer, S. M. Somers, R. M. Lovering, K. Wagner, H. Q. Mao, and W. L. Grayson. 2018. Engineering functional and histological regeneration of vascularized skeletal muscle. *Biomaterials* 164:70–79.
- Honick, Jordana, G., B. Ginn, Y. Zhang, S. Salehi, K. R. Wagner, H.-Q. Mao, and W. L. Grayson. 2018. Adipose-derived Stem:Stromal Cells on Electrospun Fibrin Microfiber Bundles Enable Moderate Muscle Reconstruction in a Volumetric Muscle Loss Model. *SAGE journal/ Cell Transplantation* 27:1644–1656.
- Hsieh, F. Y., H. H. Lin, and S. hui Hsu. 2015. 3D bioprinting of neural stem cell-laden thermoresponsive biodegradable polyurethane hydrogel and potential in central nervous system repair. *Biomaterials* 71:48–57.
- Huri, P., Yilgor, C.A. Cooka, D.L. Huttona, B.C. Gohb, J.M. Gimblec, D.J. DiGirolamob, A., and W. L. Graysona. 2012. Biophysical cues enhance myogenesis of human adipose derived stem/stromal cells. *Biochem Bioph Res Co* 40:1301–1315.
- Kang, H., S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo, and A. Atala. 2016. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology* 34:312–319.
- Kang, S. W., H. W. Lim, S. W. Seo, O. Jeon, M. Lee, and B. S. Kim. 2008. Nanosphere-mediated delivery of vascular endothelial growth factor gene for therapeutic angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Biomaterials* 29:1109–1117.
- Khademhosseini, A., and R. Langer. 2016. A decade of progress in tissue engineering. *Nature Protocols* 11:1775–1781.
- Kim, J. H., Y. J. Seol, I. K. Ko, H. W. Kang, Y. K. Lee, J. J. Yoo, A. Atala, and S. J. Lee. 2018. 3D Bioprinted Human Skeletal Muscle Constructs for Muscle Function Restoration. *Scientific Reports* 8:1–15.
- Ku, S. H., S. H. Lee, and C. B. Park. 2012. Synergic effects of nanofiber alignment and electroactivity on myoblast differentiation. *Biomaterials* 33:6098–6104.

- Kundu, J., J. Shim, J. Jang, S. Kim, and D. Cho. 2015. An additive manufacturing-based PCL – alginate – chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering:1286–1297.
- Langer, R., and J. P. Vacanti. 1993. Tissue Engineering. *sciencemag* 260:920–926.
- Liao, I.-C., J. B. Liu, N. Bursac, and K. W. Leong. 2008. Effect of Electromechanical Stimulation on the Maturation of Myotubes on Aligned Electrospun Fibers. *Cellular and Molecular Bioengineering* 1:133–145.
- Macchiarini, P., P. Jungebluth, T. Go, M. A. Asnaghi, L. E. Rees, T. A. Cogan, A. Dodson, J. Martorell, S. Bellini, P. P. Parnigotto, S. C. Dickinson, A. P. Hollander, S. Mantero, M. T. Conconi, and M. A. Birchall. 2008. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet* 372:2023–2030.
- Medinaceli, L., W. J. Freed, and R. J. Wyatt. 1982. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Experimental Neurology* 77:634–643.
- Merceron, T. K., M. Burt, Y. J. Seol, H. Kang, S. J. Lee, J. J. Yoo, and A. Atala. 2015. A 3D bioprinted complex structure for engineering the muscle–tendon unit. *Biofabrication* 7:1758–5090.
- Mi, H., X. Jing, B. N. Napiwocki, and B. S. Hagerty. 2017. Biocompatible, degradable thermoplastic polyurethane based on polycaprolactone-block-polytetrahydrofuran-block-polycaprolactone copolymers for soft tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B* 5:4137–4151.
- Moroni, L., J. A. Burdick, C. Highley, S. J. Lee, Y. Morimoto, S. Takeuchi, and J. J. Yoo. 2018. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. Springer US.
- Murphy, S. V., and A. Atala. 2014. review 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Publishing Group* 32:773–785.
- Nazeer, M. A., E. Yilgor, and I. Yilgor. 2019. Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer* 168:86–94.
- Ong, C. S., P. Yesantharao, C. Y. Huang, G. Mattson, J. Boktor, T. Fukunishi, H. Zhang, and N. Hibino. 2018. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatric Research* 83:223–231.
- Pati, F., D. Ha, J. Jang, H. Ho, and J. Rhie. 2015. Biomaterials Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration. *Biomaterials* 62:164–175.
- Pfister, A., R. Landers, A. Laib, U. Hübner, R. Schmelzeisen, and R. Mülhaupt. 2004. Biofunctional Rapid Prototyping for Tissue-Engineering Applications: 3D Bioplotting versus 3D Printing. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 42:624–638.

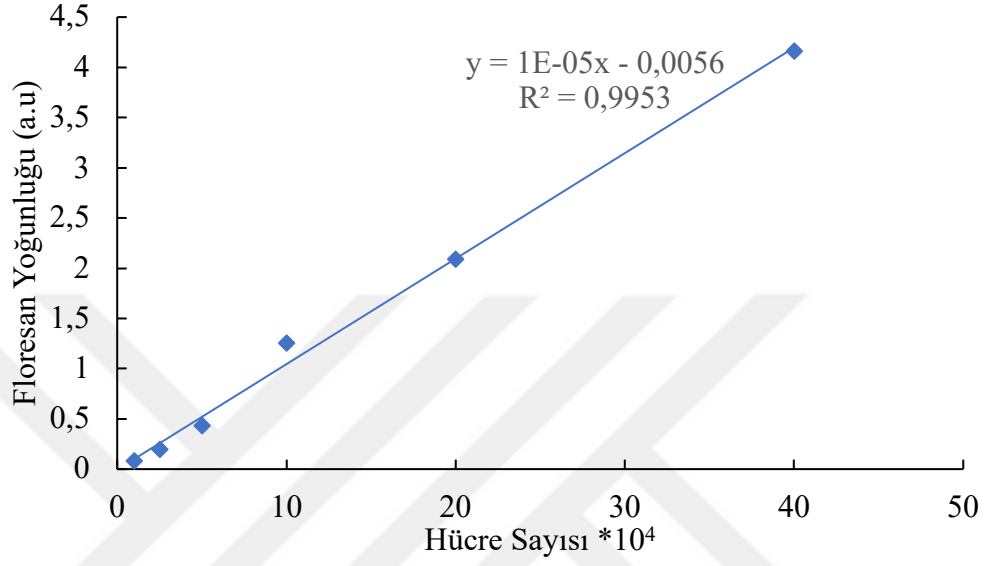
- Punnakitikashem, P., D. Truong, J. U. Menon, K. T. Nguyen, and Y. Hong. 2014. Electrospun biodegradable elastic polyurethane scaffolds with dipyrindamole release for small diameter vascular grafts. *Acta Biomaterialia* 10:4618–4628.
- Qazi, T. H., D. J. Mooney, M. Pumberger, S. Geißler, and G. N. Duda. 2015. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends. *Biomaterials* 53:502–521.
- Qi Gu, Eva Tomaskovic-Crook, Rodrigo Lozano, Yu Chen, Robert M. Kapsa, Qi Zhou, Gordon G. Wallace, and J. M. C. 2016. Functional 3D Neural Mini-Tissues from Printed Gel-Based Bioink and Human Neural Stem Cells.
- Quintero, A. J., V. J. Wright, F. H. Fu, and J. Huard. 2009. Stem Cells for the Treatment of Skeletal Muscle Injury. *Clinics in Sports Medicine* 28:1–11.
- Sarikcioglu, L., B. M. Demirel, and A. Utuk. 2009. Walking track analysis: An assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphologica* 68:1–7.
- Scime, A., A. Z. Caron, and G. Grenier. 2009. Regenerative Medicine Program and Center for Stem Cell and Gene Therapy, Ottawa Health Research Institute, 501 Smyth Road, Ottawa, Ontario, Canada, K1H 8L6, 2 Research Center on Aging, Faculty of Medicine, Department of Orthopedic Surgery, Universite de S:3012–3023.
- Shier, David; Butler, Jackie; Lewis, R. 2019. Hole's Human Anatomy and Physiology. *Journal of Chemical Information and Modeling* 53:1689–1699.
- Tatai, L., T. G. Moore, R. Adhikari, F. Malherbe, R. Jayasekara, I. Griffiths, and P. A. Gunatillake. 2007. Thermoplastic biodegradable polyurethanes: The effect of chain extender structure on properties and in-vitro degradation. *Biomaterials* 28:5407–5417.
- Temple, J. P., D. L. Hutton, B. P. Hung, P. Y. Huri, C. A. Cook, R. Kondragunta, X. Jia, and W. L. Grayson. 2014. Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D-printed PCL scaffolds:1–9.
- Turner, N. J., and S. F. Badylak. 2012. Regeneration of skeletal muscle. *Cell and Tissue Research* 347:759–774.
- Wang, J., Z. Zheng, Q. Wang, P. Du, J. Shi, and X. Wang. 2013. Synthesis and characterization of biodegradable polyurethanes based on L-cystine/cysteine and poly(ϵ -caprolactone). *Journal of Applied Polymer Science* 128:4047–4057.
- Wang, L., R. M. Shelton, P. R. Cooper, M. Lawson, J. T. Triffitt, and J. E. Barralet. 2003. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials* 24:3475–3481.
- Wang, X.-F., Y. Song, Y.-S. Liu, Y. Sun, Y. Wang, Y. Wang, and P.-J. Lyu. 2016. Osteogenic Differentiation of Three-Dimensional Bioprinted Constructs

Consisting of Human Adipose-Derived Stem Cells In Vitro and In Vivo. *Plos One* 11:e0157214.

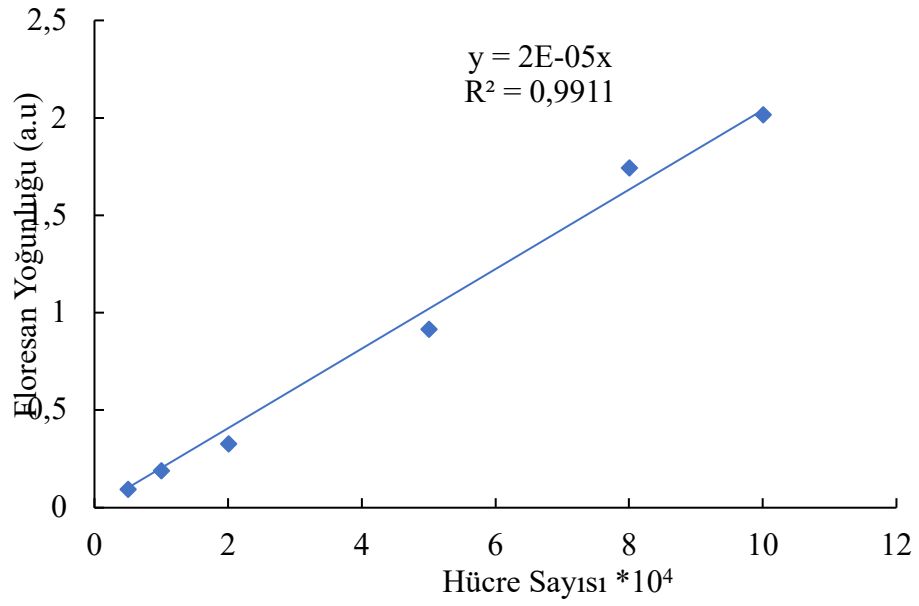
- Wang, Z., L. Yu, M. Ding, H. Tan, J. Li, and Q. Fu. 2011. Preparation and rapid degradation of nontoxic biodegradable polyurethanes based on poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) and l-lysine diisocyanate. *Polymer Chemistry* 2:601–607.
- Winkler, T., P. Von Roth, G. Matziolis, M. R. Schumann, S. Hahn, P. Strube, G. Stoltenburg-Didinger, C. Perka, G. N. Duda, and S. V. Tohtz. 2011. Time course of skeletal muscle regeneration after severe trauma: Muscle function against the background of MRI and histological findings. *Acta Orthopaedica* 82:102–111.
- Woodfield, T. B. F., K. S. Lim, and R. Levato. 2017. *Biofabrication in Tissue Engineering* 5:236–266.
- Wu, Z., X. Su, Y. Xu, B. Kong, W. Sun, and S. Mi. 2016. Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Scientific Reports* 6:1–10.
- Xu, C., G. Yepez, Z. Wei, F. Liu, A. Bugarin, and Y. Hong. 2016. Synthesis and characterization of conductive, biodegradable, elastomeric polyurethanes for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 104:2305–2314.
- Yilgör, E., M. Isik, C. K. Sözü, and I. Yilgör. 2016. Synthesis and structure-property behavior of polycaprolactone-polydimethylsiloxane-polycaprolactone triblock copolymers. *Polymer* 83:138–153.
- Yilgör, I., E. Yilgör, and G. L. Wilkes. 2015. Critical parameters in designing segmented polyurethanes and their effect on morphology and properties: A comprehensive review. *Polymer* 58:A1–A36.
- Zhao, X., R. Dong, B. Guo, and P. X. Ma. 2017. Dopamine-Incorporated Dual Bioactive Electroactive Shape Memory Polyurethane Elastomers with Physiological Shape Recovery Temperature, High Stretchability, and Enhanced C2C12 Myogenic Differentiation. *ACS Applied Materials and Interfaces* 9:29595–29611.

EKLER

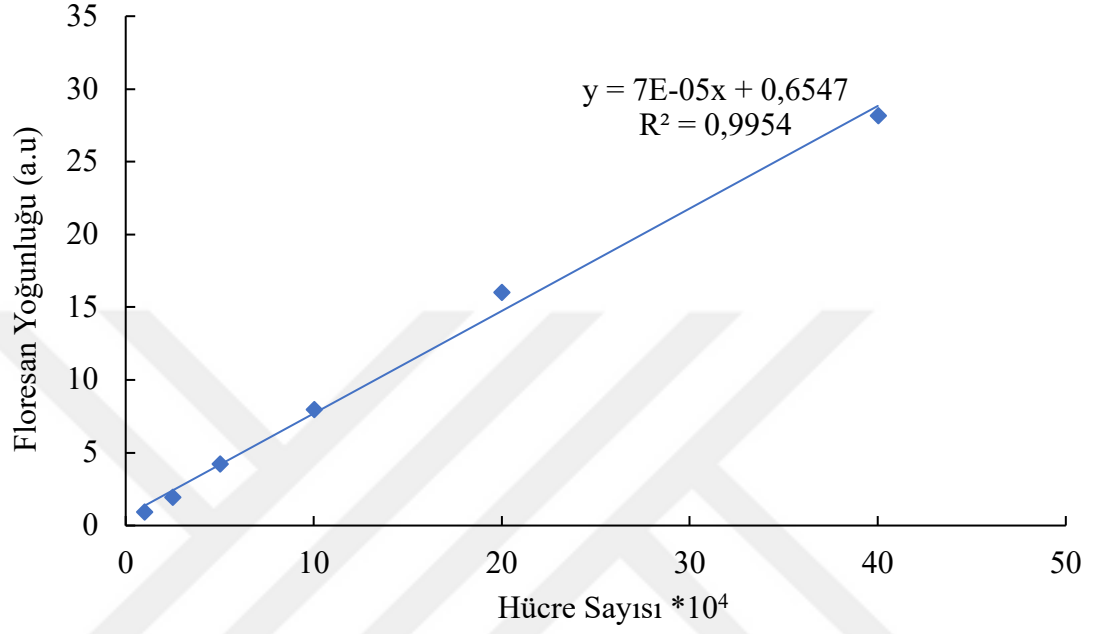
EK 1 Alamar Blue Testi için L929 Hücreleri ile Oluşturulan Kalibrasyon Eğrisi



EK 2 Alamar Blue Testi için THP-1 Hücreleri ile Oluşturulan Kalibrasyon Eğrisi



EK 3 Alamar Blue Testi için C2C12 Hücreleri ile Oluşturulan Kalibrasyon Eğrisi



EK 4 Etik Kurul Onayı

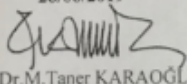
ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 26/06/2019
TOPLANTI NO : 2019-13
DOSYA NO : 2019-88
KARAR NO : 2019-13-123

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ'nin yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Çağdaş OTO, Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ ve F. Şeyda GÖKYER'in katıldığı "Üç Boyutlu Biyobaskılama ile Geliştirilen İskelet Kası Eşleniklerinin in vivo Değerlendirilmesi" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 20
Geçerlilik Süresi : 01/09/2019-01/03/2020

ASLININ AYNIDIR
26/06/2019


Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Fahriye Şeyda GÖKYER

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 26.04.1993

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Kaya Bayazıtöğlu Lisesi (2007-2011)

Lisans: Kimya Mühendisliğı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (2011-2015)

Yüksek Lisans : Kimya Mühendisliğı, Ankara Üniversitesi (2017-2020)

Yayınlar

Ergene E, Yagci BS, Gokyer S, Eyidogan A, Aksoy EA, Yilgor Huri P. A Novel Polyurethane-Based Biodegradable Elastomer as a Promising Material for Skeletal Muscle Tissue Engineering, *Biomed Mater*, 2019; 14: 025014.

Sunumlar

- Gokyer S, Yilgor E, Yilgor I, Karakeçili A, Yilgor Huri P. 3D Printed Elastomers as Skeletal Muscle Tissue Substitutes, 30th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials (ESB2019), Dresden, Germany, September 9-13, 2019.
- Gokyer S, Ergene E, Eyidogan A, Bayrak E, Birgul O, Yilgor Huri P. Myoblast Alignment Enhance Electrical Conductivity of Polypyrrole-Incorporated Hydrogel Microfibers, *29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials (ESB2018)*, Maastricht, the Netherlands, September 9–13, 2018.
- Yilgor Huri P, Gokyer S, Ergene E, Yagci BS, Eyidoğlan A, Aksoy EA. Biodegradable Polyurethane-Fibrinogen Elastomers in Skeletal Muscle Tissue Engineering, *29th Annual*

Meeting of the European Society for Biomaterials (ESB2018), Maastricht, the Netherlands, September 9–13, 2018.

- Renkler NZ, Ergene E, Gokyer S, Yilgor Huri P, Tuzlakoglu K. Evaluation of electrospun polycaprolactone/egg white protein scaffolds interaction with adipose derived stem cells, *29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials (ESB2018)*, Maastricht, the Netherlands, September 9–13, 2018.
- Gokyer S, Yazıcı D. Preparation and Characterization of a Biocomposite Material That Can Be Used For Bone Regeneration Process, *4th Global Biotechnology Congress 2016*, Boston USA, August 22 – 25.

