



**ÜÇ BOYUTLU BİYOYAZICIDA KOYUN VE
SENTETİK HİDROKSİAPATİT MATRİSLİ MgO
VE Al₂O₃ TAKVİYELİ BİYOMALZEME
UYGULAMALARININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

Aysu AKILLI ARI

**2022
DOKTORA TEZİ
ENDÜSTRİYEL TASARIM MÜHENDİSLİĞİ**

**Tez Danışmanları
Dr. Öğr. Üyesi Hatice EVLEN
Doç. Dr. Nermin DEMİRKOL**

**ÜÇ BOYUTLU BİYOYAZICIDA KOYUN VE SENTETİK
HİDROKSİAPATİT MATRİSLİ MgO VE Al₂O₃ TAKVİYELİ
BİYOMALZEME UYGULAMALARININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

Aysu AKILLI ARI

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Endüstriyel Tasarım Mühendisliği Anabilim Dalında
Doktora Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanları
Dr. Öğr. Üyesi Hatice EVLEN
Doç. Dr. Nermin DEMİRKOL**

**KARABÜK
Haziran 2022**

Aysu AKILLI ARI tarafından hazırlanan “ÜÇ BOYUTLU BİYOYAZICIDA KOYUN VE SENTETİK HİDROKSİAPATİT MATRİSLİ MgO VE Al₂O₃ TAKVİYELİ BİYOMALZEME UYGULAMALARININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ” başlıklı bu tezin Doktora Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Hatice EVLEN
Tez Danışmanı, Endüstriyel Tasarım Mühendisliği Anabilim Dalı

Doç. Dr. Nermin DEMİRKOL
İkinci Danışman, Kocaeli Üniversitesi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Endüstriyel Tasarım Mühendisliği Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 17/06/2022

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu) İmzası

Başkan : Prof. Dr. Arif ÖZKAN (KOÜ)

Üye : Doç. Dr. Suat ALTUN (KBÜ)

Üye : Doç. Dr. Fuat KARA (DÜ)

Üye : Doç. Dr. Nermin DEMİRKOL (KOÜ)

Üye : Doç. Dr. M. Kamil TURAN (KBÜ)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hatice EVLEN (KBÜ)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Özkan ÖZ (KBÜ)

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Hasan SOLMAZ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Aysu AKILLI ARI

ÖZET

Doktora Tezi

ÜÇ BOYUTLU BİYOYAZICIDA KOYUN VE SENTETİK HİDROKSİAPATİT MATRİSLİ MgO VE Al₂O₃ TAKVİYELİ BİYOMALZEME UYGULAMALARININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Aysu AKILLI ARI

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Endüstriyel Tasarım Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Hatice EVLEN

Doç. Dr. Nermin DEMİRKOL

Haziran 2022, 68 sayfa

Bu çalışmada ilk olarak üç boyutlu biyoyazıcı tasarımı ve imalatı yapılmıştır. İmalatı yapılan biyoyazıcının kullanılabilirliğini araştırmak için biyomürekkep üretilmiştir. Üretilen biyomürekkep sentetik ve doğal kemikten üretilen hidroksiapatit kemik dokusunun biyolojik ve morfolojik yapısı araştırılmıştır. Kemik yapı iskelelerinin üretimi için ağırlıkça %10 w/v magnezyum oksit ve alüminyum oksit ilaveli sentetik hidroksiapatit ve koyun hidroksiapatit biyomürekkep kompozitleri jelleşmesi için sodyum aljinat eklenerek biyomürekkep hazırlanmıştır. Hazırlanan biyomürekkeplerin viskozite analizi yapılmıştır. Üretilen üç boyutlu biyoyazıcı ile 10x10x2 mm kemik yapı iskeleleri biyobaskısı yapılmıştır. Kalsiyum klorür, katmanlar arasında bağ dokusu oluşturmak için kullanılmıştır. Kemik yapı iskelelerin

davranışlarını ve vücutta apatit oluşumunu gözlemlemek amacıyla 2 ve 4 haftalık yapay vücut sıvısında (SBF) biyoaktivite testleri uygulanmıştır. Biyoaktivite testlerinin ardından taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dispersiyon spektrometresi (EDS) analizleri yapılmıştır. Ayrıca kemik yapı iskelelerinin laboratuvar ortamında 3-4,5-dimetil-tiazolyl-2,5-difenyltetrazolium bromür (MTT) testi yapılmıştır. Bu testte fibroblast ve osteoblast hücre yüklemesi ile sitotoksosite analizleri ve hücre sayıları incelenmiştir. Fallodin boyama yöntemi kullanılarak canlılık ve hücre çoğalması gözlenmiş ve biyomürekkepler arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Çalışma sonucunda hazırlanan her bir biyomürekkebin üç boyutlu biyobaskı üzerine baskı yeteneği başarılı olmuştur. Böylece istenilen gözenekli yapıda üretilmiştir. Yapay vücut sıvısında 2 ve 4 hafta bekletildikten sonra üretilen kemik yapı iskelelerinin tarama elektron mikroskobu görüntülerinde apatit oluşumları gözlenmiştir. Son aşamada yapılan hücre kültürü analizinde hücre canlılığının devamı ve ağ yapısı umut verici olmuştur.

Anahtar Sözcükler : Sentetik hidroksiapatit, koyun hidroksiapatit, magnezyum oksit, alümina, biyoyazıcı, biyomürekkep, kemik yapı iskelesi, yapay vücut sıvısı, biyoyumluluk, hücre kültürü, konfokal mikroskop, SEM-EDS analizi.

Bilim Kodu : 92503

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IMPLEMENTATION OF MgO AND Al₂O₃ REINFORCED BIOMATERIALS WITH SHEEP AND SYNTHETIC HYDROXYAPATITE MATRIX IN A THREE-DIMENSIONAL BIOPRINTER

Aysu AKILLI ARI

**Karabük University
Institute of Graduate Programs
Department of Industrial Design Engineering**

Thesis Advisor:

Assist. Prof. Dr. Hatice EVLEN

Assoc. Prof. Dr. Nermin DEMİRKOL

June 2022, 68 pages

In this study, firstly, three-dimensional bioprinter was designed and manufactured. Bioink was produced to investigate the usability of the manufactured bioprinter. The biological and morphological structure of hydroxyapatite bone tissue produced from synthetic and natural bone was investigated. For the production of bone tissue scaffolds, synthetic hydroxyapatite and sheep hydroxyapatite bioink composites with 10 wt.% Magnesium Oxide and Aluminum Oxide added were prepared with sodium alginate. The rheological analysis of the prepared bioinks was performed. 10x10x2 mm bone tissue scaffolds were bioprinted. Calcium Chloride was used to create connective tissue between layers. In order to observe the behavior of bone tissue scaffolds and the formation of apatite, bioactivity tests were applied in 2 and 4 weeks

of artificial body fluid. After the bioactivity tests, scanning electron microscopy and energy dispersion spectrometry analyzes were performed. In addition, 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test was performed in the laboratory environment of bone tissue scaffolds. In this test, fibroblast and osteoblast cell loading, cytotoxicity analyzes and cell numbers were examined. Viability and cell proliferation were observed using the phalloidin staining method and comparisons were made between bioinks. As a result of the study, the ability of each bioink prepared to print on three-dimensional bioprinting was successful. Thus, the bone scaffold with the desired porous structure was produced. Apatite formations were observed in the scanning electron microscope images of the bone tissue scaffolds produced after 2 and 4 weeks in artificial body fluid. In the cell culture analysis performed at the last stage, the continuation of cell viability and network structure were promising.

Key Word : Synthetic hydroxyapatite, sheep hydroxyapatite, magnesium oxide, alumina, bioprinter, bioink, bone scaffold, artificial body fluid, biocompatibility, cell culture, confocal microscope, SEM-EDS analysis.

Science Code : 92503

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıőmamı bilimsel temeller ışığında őekillendiren sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Hatice EVLEN ve Doç. Dr. Nermin DEMİRKOL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deney alıőmaları boyunca bilgisini esirgmeden yol gösteren Yięitcan SÜMBELLİ, hücre kültürü aşamasında çalıőmalarıma destek olan İstinye Üniversitesi Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI ve Aslı N. OYUNLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu eğitim seviyesine gelmemde maddi ve manevi destekleri olan rahmetli babam Hayri AKILLI, sevgili annem Nurten AKILLI, kardeşlerim Emel AKILLI, Ebru YENİLMEZ, Serkan AKILLI sevgili eşim Metin ARI, yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

KBÜBAP-17-DR-303 numaralı proje kapsamında maddi destek için Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Bölümü'ne teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
BÖLÜM 3	7
MALZEME VE METOD	7
3.1.BİYOYAZICI TÜRLERİ.....	7
3.1.1.Ekstrüzyon Bazlı Biyoyazıcılar	8
3.1.2.Damlacık Bazlı Biyoyazıcılar.....	9
3.1.3.Lazer Tabanlı Biyoyazıcı.....	10
3.2.BİYOMALZEMELER.....	10
3.2.1.Biyometaller	11
3.2.1.1.Çelik.....	11
3.2.1.2.Titanyum (Ti).....	11
3.2.1.3.Dental Amalgam	11
3.2.1.4.Altın (Au).....	12
3.2.2.Biyoseramikler.....	12

Sayfa

3.2.2.1.Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).....	12
3.2.2.2.Trikalsiyum Fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).....	13
3.2.2.3.Alümina (Al_2O_3).....	13
3.2.2.4.Zirkonya (ZrO_2).....	13
3.2.2.5.Biyocam seramikler.....	14
3.2.3.Biyopolimerler.....	14
3.2.4.Biyokompozitler.....	14
BÖLÜM 4.....	15
DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	15
4.1.BİYOYAZICI TASARIMI VE ÜRETİMİ.....	15
4.2.MALZEME SEÇİMİ VE BİYOMÜREKKEP HAZIRLAMA.....	21
4.2.1.Koyun Hidroksiapatit (SHA).....	21
4.2.2.Sentetik Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).....	21
4.2.3.Magnezyum Oksit (MgO).....	22
4.2.4.Alüminyum Oksit (Al_2O_3).....	22
4.2.5.Sodyum Aljinat ($(\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6)_n$).....	22
4.3.REOLOJİK ÖLÇÜM.....	24
4.4.KEMİK YAPI İSKELESİ ÜRETİMİ.....	25
4.5.YAPAY VÜCUT SIVISI HAZIRLAMA VE İN VİTRO BİYOAKTİVİTE DENEYİ.....	27
4.6. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOP (SEM)- ENERJİ DAĞITICI SPEKTRUM (EDS) DENEYİ.....	30
4.7. MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) SİTOTOKSİSİTE TESTİ.....	30
4.8. KONFOKAL MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜ.....	30
BÖLÜM 5.....	32
DENEYSEL SONUÇLAR.....	32
5.1.REOMETRE CİHAZI İLE VİSKOZİTE ÖLÇÜM SONUÇLARI.....	32
5.2.SEM-EDS GÖRÜNTÜ ANALİZİ.....	37
5.3.MTT SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ.....	43
5.4.KONFOKAL MİKROSKOP ANALİZİ.....	46

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 6	56
SONUÇLAR	56
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3. 1. Biyolojik baskı teknikleri (a) hücrelerin lazer tabanlı yazımı, (b) mürekkep püskürtmeli sistemler, (c) ekstrüzyon tabanlı biriktirme	8
Şekil 4. 1. Modellemesi yapılan biyoyazıcı.....	15
Şekil 4. 2. Modellemesi yapılan şırınga sistemi.....	17
Şekil 4. 3. Kabin sistemi elemanları.....	17
Şekil 4. 4. Y ekseni hareket sistemi (a) ön, (b) yan görüntüsü.	18
Şekil 4. 5. Z ekseni hareket sistemi.....	19
Şekil 4. 6. Tasarlanan biyoyazıcı mekanizma bölümleri.	19
Şekil 4. 7. İmal edilen biyoyazıcı (a) model ve (b) gerçek görüntüsü.	20
Şekil 4. 8. Biyomürekkep karışımlarının şematik gösterimi.....	23
Şekil 4. 9. Reometre cihazı.	24
Şekil 4. 10. (a) Baskı düzeneği ve (b) basılan kemik yapı iskelesi.....	25
Şekil 4. 11. (a) %10 ve (b) %15 kemik yapı iskelesi baskısı.	26
Şekil 4. 12. 1000 ml de 1,5X SBF hazırlamak için akış diyagramı basamakları.....	28
Şekil 4. 13. SBF deney düzeneği.	29
Şekil 4. 14. (a) SBF’de bekletilen deney düzeneği, (b) 4 haftalık SBF sonrası kemik yapı iskelesi görüntüsü.	29
Şekil 5. 1. Viskozite (Pa.s) ve kesme hızı (s^{-1}).....	33
Şekil 5. 2. Viskozite (Pa.s)- zaman t(s).....	34
Şekil 5. 3. G'' - G' (Pa) zaman (s).	35
Şekil 5. 4. Tan δ -zaman t(s).	36
Şekil 5. 5. (a) %10, (b) %15 doluluk oranlı kemik yapı iskeleleri SEM görüntüsü. .	37
Şekil 5. 6. CSHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF’siz %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.	37
Şekil 5. 7. CSHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin 2 ve 4 hafta SBF’de bekletilen %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.....	38
Şekil 5. 8. SHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF’siz %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.....	39
Şekil 5. 9. SHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin 2 ve 4 hafta SBF’de bekletilen %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.....	39

Şekil 5. 10. CSHA+Al ₂ O ₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF'siz %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.....	40
Şekil 5. 11. CSHA+Al ₂ O ₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin 2 ve 4 hafta SBF'de bekletilen %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.....	40
Şekil 5. 12. SHA+Al ₂ O ₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF'siz %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.....	41
Şekil 5. 13. SHA+Al ₂ O ₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin 2 ve 4 hafta SBF'de bekletilen %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.....	42
Şekil 5. 14. Kuyucuklu plaka.....	43
Şekil 5. 15. Konsantrasyona bağlı L929 fare fibroblast hücre hattında % canlılık grafiği.....	44
Şekil 5. 16. Konsantrasyona bağlı osteoblast hücre hattında % canlılık grafiği.....	45
Şekil 5. 17. Kemik yapı iskelelerinin 12 ve 32 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskoptaki kontrol grubu görüntüleri.....	46
Şekil 5. 18. CSHA+MgO biyomürekkebin 12 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.....	47
Şekil 5. 19. CSHA+MgO biyomürekkebin 36 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.....	48
Şekil 5. 20. SHA+MgO biyomürekkebin 12 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.....	49
Şekil 5. 21. SHA+MgO kemik yapı iskelesinin 36 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.....	50
Şekil 5. 22. CSHA+Al ₂ O ₃ kemik yapı iskelesinin 12 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.....	51
Şekil 5. 23. CSHA+Al ₂ O ₃ kemik yapı iskelesinin 36 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.....	52
Şekil 5. 24. SHA+Al ₂ O ₃ kemik yapı iskelesinin 12 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.....	53
Şekil 5. 25. SHA+Al ₂ O ₃ kemik yapı iskelesinin 36 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4. 1. Biyoyazıcı teknik özellikler.	16
Çizelge 4. 2. Biyomürekkep için karışımların malzeme ve oranları.....	23
Çizelge 4. 3. 1,5X SBF hazırlamada kullanılan kimyasallar ve miktarları (1000ml)	27
Çizelge 5. 1. Karışımların kemik yapı iskelelerinin 4 haftalık %10 doluluk oranlı EDS analizleri.	42
Çizelge 5. 2. Karışımların kemik yapı iskelelerinin 4 haftalık %15 doluluk oranlı EDS analizleri.	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: hidroksiapatit
MgO	: magnezyum oksit
Al_2O_3	: alüminyum oksit (alumina)
$(\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6)_n$: sodyum aljinat
Ti	: titanyum
Au	: altın
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: trikalsiyum fosfat
ZrO_2	: zirkonya
f(Hz)	: frekans
G'	: depolama modülü
G''	: kayıp modül
CaCl_2	: kalsiyum klorür

KISALTMALAR

SHA	: Koyun Hidroksiapatit
CSHA	: Sentetik Hidroksiapatit
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskop
EDS	: Enerji Dispersiv Spektrum
SBF	: Yapay Vücut Sıvısı
HUBTUAM	: Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
SARGEM	: Sakarya Üniversitesi Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
TS	: Türk Standardı

ANOVA : Varyans Analizi
SD : Standart Sapma
WST-1 : 2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium,
monosodyum tuzu
FBS : Fetal Bovine Serum
Pen-Strep : Mixture of Penicillin G and Streptomycin
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Talaşlı ve talaşsız imalat teknolojisine ek olarak günümüzde katmanlı imalat teknolojisi olan üç boyutlu yazıcılar endüstriyel imalat, tıp, sağlık, savunma sanayi, eğitim, gıda, havacılık ve tekstil alanları gibi birçok alanlarda üç boyutlu (3B) yazıcı kullanılmaktadır [1]. 3B yazıcıda iki boyutlu (2B) katmanların üst üste gelerek üç boyutlu baskı oluşturması sürecidir. Bu süreçteki avantaj, talaşlı imalat teknolojisine göre 3B baskının malzeme yoğunluğu kadar malzeme tüketmesidir. Bilgisayar destekli çizim kullanılarak karmaşık şekilli 3B baskıların kolay üretilmesi de mümkündür. Bu özellik ile 3B yazıcıların günümüzde kullanım alanlarını genişletmektedir. Böylece 3B yazıcı tasarımı ve baskıda kullanılan malzemelerde çeşitlilik artmaktadır.

Son zamanlarda sağlık ve tıp alanında 3B yazıcı geliştirilerek tasarlanan birçok çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların ortak konusu, 3B yazıcının canlıda hasar görmüş veya kaybedilmiş dokunun vücuda uygun şekilde üretilmesini sağlamaktır. Bu alanda kullanılan biyoyazıcılarda aranan özelliklerden biri mikron boyutta doluluk oranlı baskı yapılabilmesidir. Bu biyobaskı kemik yapı iskelesinin yüksek baskı hassasiyeti, tekrarlanabilirliği ve doğruluğu ile doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır [2].

Doku mühendisliğinde 3B yazıcı ile 3B biyoyazıcı arasındaki en önemli fark; biyoyazıcı ile canlı hücreleri içerebilecek yapıda biyobaskı yapılabilmesidir.

Canlıdaki hasar görmüş veya kaybedilmiş dokuların yerine yerleştirilebilen biyomalzemeler kullanılmaktadır. Bu biyomalzemeler ile, 3B biyoyazıcılarda kullanılabilen özellikte biyomürekkep üretim çalışmaları yapılmaktadır [3,4,5]. Kemik dokusu onarım ve implantı için hidroksiapatit malzemesi kullanılarak birçok kemik yapı iskelesi biyobasılabilme ve hücre eklemesi çalışmaları yapılarak olumlu sonuçlar

alınmıştır [6,7,8,9]. Takviye biyomalzemelerden olan magnezyum oksit (MgO) ve alüminanın (Al_2O_3) biyomürekkepte varlığı mekanik dayanımı arttırmaktadır ve biyouyumlu oldukları için hücre çoğalmasında olumsuz sonuç oluşturmamaktadır. [10,11,12]. Sodyum aljinatın biyomürekkep içerisine hücrelerin çoğalmasını etkilediğinden kontrollü olarak ilave edilmelidir. Biyomürekkebe ağırlıkça %5 ve üzeri değerlerde eklenen sodyum aljinat hücre yıkımı ve çoğalmasını engellediğinden bu oranın altındaki değerlerde kullanılmaktadır [13,14,15,16,17,18].

Biyomalzemelerin geliştirilmesi bilim insanları için biyolojik ve biyokimyasal ortamlarda karmaşık biyoyapılar oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. İdeal bir biyomürekkep malzemesinin bazı önemli özellikleri ise; biyobasılabirlik, yüksek mekanik bütünlük, hücre kültürü ortamında çözünmezlik, toksit etkisinin olmaması ve hücre yapışmasını destekleme yeteneğidir [19,20,21,22]. Biyobaskıda yapılarını, şekillerini, yapısal bütünlüklerini korumaları, in vitro boyunca belirli süre 3B yapısını koruması, in vivo olarak zamanla bozulmaları, kısa-uzun vadeli kültürde hücre yayılması ve çoğalması beklenir.

Üç boyutlu doku ve organ yapılarının biyobaskısında iki tip hücre ekleme yöntemi bulunmaktadır. İlki ve yaygın olarak kullanılan yöntem hücrelerin hidrojellere veya 3B iskele yapılarına eklenmesidir. Bu hücre yüklü hidrojeller, hücre çoğalmasına ve büyümesine izin verir, doku oluşumunu kolaylaştırır. İkinci tip hücre ekleme ise, biyomürekkepte hücreler, embriyon gelişimi taklit eden yapı iskelesi içermeyen bir süreçte biyobaskılama yapılıdır.

Doku iskelelerinin kullanılabilir ve ideal olabilmesi için yapısında bulunması gereken bazı özellikler vardır. Bunlardan en önemlisi gözenek boyutudur. Hücreler doku iskelelerine ekildikten sonra gözeneklere tutunmaktadırlar. Uygun boyutta ve sayıda gözeneklerin olmaması çoğalmaya başlayan hücreleri doku ölümüne sürükleyebilir. Oksijen ve besinlerin alışverişini de sağlayan gözenekler doku iskelesi için en önemli parametredir. İdeal bir doku iskelesinin uygun sayıda ve boyutta makro gözeneklere sahip olması, elastik olması, mekanik olarak dayanıklı olması, hidrofilik olması, kontrollü olarak biyobozunur olması, biyouyumlu olması, immün yanıt

oluşturmaması, hücreler için toksik olmaması ve hücrelerin tutunabileceği bir ortam sağlaması gerekmektedir [23,24,25,26].

Bu çalışmanın amacı, canlı yapı iskelesi oluşturabilmek için, homojen dağılımlı mikron boyutunda gözenekli kemik yapı iskelesinin baskılanmasıdır. Şırıngadaki baskının gücünü arttırmak için tasarlanan 3B biyoyazıcının amaca uygunluğunun araştırılması için biyomalzemelerden olan sentetik hidroksiapatit (CSHA) ve koyun hidroksiapatit (SHA) matrisli, MgO, Al₂O₃ ve sodyum aljinat katkılı biyomürekkep üretimi yapılmıştır. Biyoyazıcı kullanarak kemik yapı iskelesi baskısı ve biyoaktivite değerlendirmesi yapılmıştır. Biyomürekkebin reolojik sonuçları araştırılarak, biyoaktivite durumunu değerlendirmek için yapay vücut sıvısında (SBF) bekletilen kemik yapı iskelelerinin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü incelenmiştir [27,28]. Sitotoksikite testleri [29] ve L929 fibroblast hücre hattı ile konfokal mikroskop görüntüleri [30] alınmıştır. Tasarlanan biyoyazıcı, baskı kafasının türü ve sayısı çeşitlendirilerek geliştirilebilen özellikte tasarlanmıştır. Biyoyazıcının kullanım kolaylığı sayesinde istenilen yapı iskelesi üretimi yapılabilmektedir. Baskı kafasının altında bulunan UV ışığı baskı esnasında yapı iskelesinde hem sterilizasyon hem de sertleşmesi sağlanmıştır. Kemik yapı iskelelerine eklenen fibroblast ve osteoblast hücrelerinin varlığını sürdürerek bağ oluşturması umut verici sonuçlar göstermiştir. Bu teknoloji geliştirilerek, fonksiyonel doku ve organ transferi sağlayabilecek, organ üretimine erişimde umut verici olacak ve organ gereksinimlerini azaltacaktır.

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Günümüzde canlı vücudunda hasar görmüş veya eksik doku ve organların nakilleri için biyobaskı teknolojisi geliştirilmiştir. Biyobaskı teknolojisinin geliştirilmesi ile canlılarda kullanılacak yapıların oluşturulmasını sağlayacak çalışmalar yapılmıştır. Bu teknolojiye biyobaskı potansiyeli hakkında çok sayıda bilimsel çalışmalar sunulmuştur.

Biyoyazıcı ilk olarak 1998'de Klebe tarafından biyobaskı teknolojisi, hücrelerin mikro konumlandırılması ve iki boyutlu sentetik dokuların oluşturulması için bir yöntem olarak gösterilmiştir [31].

Odde ve Renn (1999) tarafından ilk kez lazer tabanlı biyobaskı kullanılarak hücrelerin yazdırılması göstermişlerdir. Hücrelerin karmaşık anatomiye sahip doku analoglarını biyomimetik olarak geliştirmek için 3B olarak modellenebileceğini ortaya koymuşlardır [32].

Aydın ve arkadaşları (2017), kemik yapı iskelelerinin doğal polimer-seramik kompozit biyomürekkep geliştirilmişler ve biyobasım parametrelerinin optimizasyonunun gerçekleştirmişlerdir. Hücre kültürü besiyeri, gliserol, jelatin, aljinat ve cam katkı hidroksiapatit farklı oranlarda karıştırılarak biyobasılabilirliğe uygun hale getirmişlerdir. Sıcaklık, pH, filtrasyon ve kimyasal katalizör madde eklenilmesinin biyobasılabilirliğe etkileri değerlendirmişlerdir. 3B iskelelerin biyoyumluluğu adipoz doku kaynaklı kök hücreler kullanılarak laboratuvar koşullarında incelemişlerdir [33].

Campbell ve Weiss (2007) tarafından biyobaskı konseptinde bir hayvan deri modeli mürekkep püskürtmeli biyobaskısıyla deneme yapmışlardır. Farelerde cilt yaralarını

tedavi etmek için mürekkep püskürtmeli biyobaskı teknolojisini kullanmışlardır. Kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücreler (MSC), fibrin-kollajen jel içinde yeniden süspanse edilerek yara bölgesi üzerine baskılamışlardır. Floresan etiketli MSC hücrelerinin izlenmesi, hücrelerin geçici olarak kaldığını ve dokuya kalıcı olarak entegre olmadığını ortaya koymuşlardır [34].

Forgacs ve çalışma arkadaşları (2009), küre yapıları bir iskeleye ihtiyaç duymadan yapı taşı olarak kullanan ilk biyobaskılı dokuyu büyütme için hücrelerin tohumlanabileceği, *in vitro* veya *in vivo* olgunlaştırılabileceği biyoyumlu yapı iskelelerinin kullanımını deneyimlemişlerdir. Fakat birden fazla hücre tipi durumunda, desen oluşumunun hassas kontrolünü korurken, tekrarlanabilir, yüksek verim ve kolayca ölçeklenebilir bir şekilde özel şekilli dokular üretmek için henüz güvenilir bir yöntem sağlamadığını belirlemişlerdir [35].

DiGiuseppe ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmalarında, Aljinat ve jelatin hidrojenlerin mekanik özellik, basılabilirlik, geometrik tamamlık ve hücre canlılığını sağlayan optimum karışım belirlemişlerdir. Bununla birlikte aljinat jelatin hidrojenleri fizyolojik sıcaklıkta muhafaza edildiklerinde hızlı bir şekilde bozulduklarını ve *in vivo* uygulamalarını sınırladığını belirlemişlerdir [36].

Naghieh ve arkadaşları (2018) çalışmalarında, vasküler ağlara sahip büyük hibrit yapı iskeleleri oluşturmak için uygun biyomekanik özelliklere sahip biyomalzeme geliştirmek için birçok çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmüşlerdir. Hibrit yapılarla yapay doku ve organların basılmasının başarılı olması için, büyük bir hücre popülasyonunun, fonksiyonel bir damar sisteminin varlığında ilgili dokuları oluşturmak için organize bir şekilde işlev görebileceği uygun bir mikro ortamın oluşturulması gerektiğini ortaya koymuşlardır [37].

Kim ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmalarında, Alg-CaSO₄ and Alg-Carr-CaSO₄ reolojik özelliklerine dayanarak gelişmiş biyobasılabilirlikte yapı iskeleleri üretmek için optimum baskı parametrelerini araştırmışlardır. Sonucunda, canlı ölü hücre tahlili yapılarak biyoyumlu olduğu ve doku mühendisliği uygulamalarında ekstrüzyon yöntemi ile biyobasılabilirliğini kanıtlamışlardır [38].

Naghieh ve arkadaşları (2021) katman kalınlığı, gözenek boyutu ve şerit yönü, iskele tasarımının yazdırılabilirliğini etkileyen önemli faktör olarak belirlemişlerdir. Baskı, hız ve çapraz bağlama mekanizması gibi kritik baskı proses parametrelerinin ve koşullarının basılabilirlik üzerindeki etkilerinin olduğunu belirlemişlerdir [39].

Wang ve arkadaşları [2021], 3B biyo-baskı yapı iskelelerinin imalatının, kontrollü gözeneklilik ve tasarım, gelişmiş biyolojik aktivite ve ayrıca iyileştirilmiş mekanik özellikler dahil olmak üzere birçok avantajı olan cesaret verici bir çözüm olduğu gösterilmişlerdir. Bağışıklık reddi, değişmez yoğunluk ve 3D biyobaskı uygulaması yoluyla yetersiz biyokimyasal işlevsellik gibi önceki kusurlar olmadan geleneksel malzemeler gelişmiş transplantasyonda kullanılabileceğini ve aynı zamanda kemik onarımı ve rejenerasyonu için umut verici olduğunu ortaya koymuşlardır [40].

Wu ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışmalarının deneysel sonuçlarında, ilk kez, farklı biyobozunma hızına sahip biyoseramik yapı iskelelerinde gözenek yapısının, kemik onarımını arttırdığını göstermişlerdir. Bu nedenle, çok yönlü bilgisayar destekli çizim modeli optimizasyon sürecinin rasyonel bir tasarımla biyoaktif yapı iskeleleri üretmek için uygun bir yol sundukları ileri sürmüşlerdir [41].

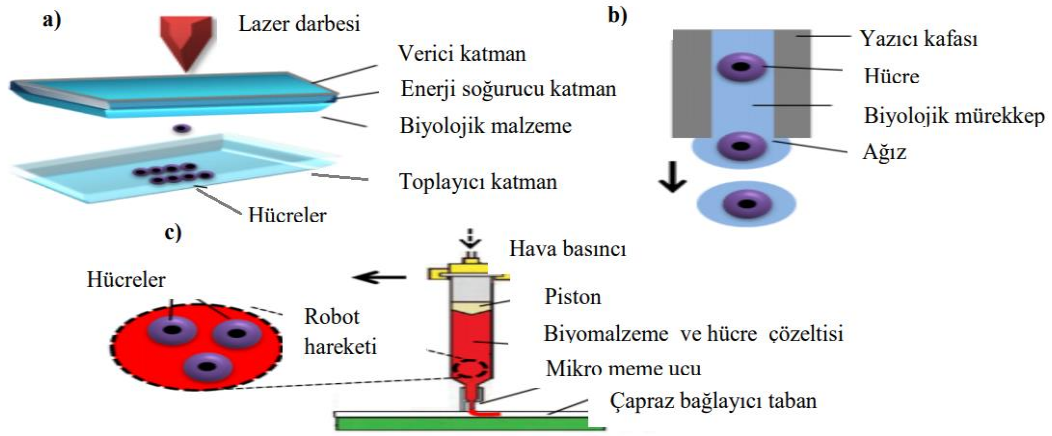
Allen ve arkadaşları (2022), GelMA jelatine HA eklenmesinden oluşan biyomürekkebin 3B baskı için ideal olduğunu göstermişlerdir. Bu biyomürekkepte şişmenin önemli ölçüde azaldığı ve biyomürekkebin bozulma direncini arttırdığı göstermişlerdir. HA eklenmeyen biyomürekkepte ise hücre canlılığını koruduğunu belirlemişlerdir [42].

BÖLÜM 3

MALZEME VE METOD

3.1. BİYOYAZICI TÜRLERİ

3B yazıcı, dijital ortamda hazırlanan model dosyasından 3B katı nesnelere üretme sürecidir. Bu işlemleri gerçekleştiren makineler 3B yazıcı olarak adlandırılır. 3B yazıcıların çalışma mantığı ile baskı malzemesi geliştirilerek üç boyutlu biyoyazıcılar tasarlanmıştır. Biyoyazıcılar biyobaskı yöntemlerine göre ekstrüzyon [43], damlacık ve lazer tabanlı biyoyazıcılar [44,45] olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılabilir. Ekstrüzyon bazlı biyoyazıcılar, hücreleri bir filament şeklinde biriktirmek için mekanik veya pnömatik tahrikli sistem kullanırken, damlacık bazlı biyoyazıcılar, hücre süspansiyonu damlacıklarını yüksek verimle biriktirmek için termal piezo veya akustik tahrikli mekanizmalar kullanılır. Lazer destekli biyoyazıcılarda ise emici yüzey üzerine odaklı lazer kullanılarak pulse oluşturulur. Bu basınçla hücreler alt tarafta bulunan bir toplayıcı yüzeye doğru itilir [46]. Üç boyutlu biyobaskı ise, doku yapılarını üç boyutlu formda oluşturmak için birbirini takip eden katman yaklaşımı kullanılır. Biyobaskıda hücreler fonksiyonunu ve canlılığını koruyarak biyoyumlu bir materyal içerisinde doku basımı yapılır [47]. Kemik yapı iskelesi oluşumu için önemli etkenlerden olan gözeneklilik [46,48,49], yapısal dayanım [51] ve hücre canlılığıdır [52]. Şekil 3.1’de biyoyazdırma teknolojileri görülmektedir.



Şekil 3.1. Biyolojik baskı teknikleri (a) hücrelerin lazer tabanlı yazımı, (b) mürekkep püskürtmeli sistemler, (c) ekstrüzyon tabanlı biriktirme [53].

Biyoyazıcılar günümüz ve gelecek tıp teknolojisinin ilerlemesine ve şekillendirilmesi mümkün olmayan kompleks geometrik şekilli kemik dokularının üretimine imkan sağlamıştır.

3.1.1. Ekstrüzyon Bazlı Biyoyazıcılar

Ekstrüzyon bazlı biyoyazıcılar biyobaskı teknolojisinde sıklıkla kullanılan tekniktir. Bu teknikte, sıvı dağıtım sistemi pnömatik, mekanik ve selenoiddir. [54]. Bu sistem robotik kontrol ile kombine edilerek hareketi sağlanır. Biyobaskı esnasında bilgisayar destekli kontrol ile biyomürekkep biriktirme yöntemi ile katmanlar oluşturularak tasarlanan şeklin baskısı sağlanır. Ekstrüzyon bazlı biyoyazıcı yöntemi kullanarak birçok bilimsel çalışmalar yapılmıştır.

Naghieh ve Chen (2021) yaptıkları çalışmalarında, basılabilirliğin tanımı, basılabilirlik ölçümleri ve karakterizasyonu ve basılabilirliği etkileyen faktörlere odaklanarak, ekstrüzyon bazlı biyobaskılamanın basılabilirlik değerlendirmesindeki son gelişmeleri araştırmışlardır. Tabaka kalınlığı, gözenek boyutu ve şerit yönü, iskele tasarımının yazdırılabilirliği etkileyen önemli faktör olarak tanımlamışlardır [39].

Zhang ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışmalarında; hücre yüklü biyomürekkep üretimi yaparak ekstrüzyon bazlı biyoyazıcıda basılabilirliklerini araştırmışlardır.

Kullanılan pnömatik sistemde şırınga içindeki yüksek basıncın hücre yüklü biyomürekkepteki hücreleri olumsuz etkileyeceğini saptamışlardır. Biyomürekkebin çapraz bağlanmasını sağlayacak ek ajanlar hücre çoğalmasını da olumsuz etkilediğini göstermişlerdir [4].

Malekpour ve Chen çalışmalarında; ekstrüzyon biyobaskısının diğer teknolojilerle karşılaştırıldığında ana avantajı, baskı yapıları için hücreleri biyomateryallere dahil etme yeteneğinde yatarken, süreç kaynaklı kuvvetler hücre canlılığına zarar vereceğini öngörmüşlerdir. Biyobaskıda göz ardı edilemez bir başka konu ise uzama gerilimi ve kayma gerilimi, hücre hasarından sorumlu olduğunu söylemişlerdir. İğne tipi ve boyutu, biyomürekkep konsantrasyonu ve dağıtım basıncı gibi bazı parametreler hücre hasarında kilit rol oynamıştır. Basılabilirlik ve hücre canlılığı üzerine umut verici birçok araştırma ile bu alan hala erken aşamada olduğunu ve etkili parametreleri titizlikle belirlemek gelecekteki geliştirmeler için zorlu olmaya devam edeceğini söylemişlerdir [55].

Çalışmamızda kullanılan ekstrüzyon biyobaskısının, biyolojik baskı alanında nispeten yeni olmasına rağmen, makine öğreniminin gelecekte biyobaskıda ve dolayısıyla doku mühendisliğinde daha kullanışlı olabileceğini düşünmekteyiz.

3.1.2. Damlacık Bazlı Biyoyazıcılar

Damlacık bazlı biyoyazıcı ise, katman katman biriktirilen ve birleştirilen küçük biyomürekkep damlacıkları içinde kapsüllenmiş hücreleri yazdırmak için termal, akustik veya elektrik enerjisini gibi çeşitli enerji kaynaklarını kullanarak canlı hücrelerin ve kemik yapı iskelelerinin modellenmesine izin vermektedir. Mevcut tüm biyobaskı yöntemleri arasında, çeşitli hücre tiplerini doğru ve aynı anda biyobaskı yapabilme yeteneği ile doğal ve benzeri özelliklere sahip dokular üretilmektedir. Yaygın olarak kullanılan ekstrüzyon bazlı biyobaskıya ve yüksek hassasiyetli lazer bazlı biyobaskıya rağmen damlacık bazlı biyoyazıcılar basitliği, çevikliği, çok yönlülüğü ve biriktirme modeli üzerindeki büyük kontrolü nedeniyle çeşitli avantajlar sunmaktadır.

3.1.3. Lazer Tabanlı Biyoyazıcı

Lazer tabanlı biyoyazıcı, hücreleri bir alt tabaka üzerine seçici olarak yazdırmak ve hassas bir şekilde modellemek için lazer enerjisini kullanmaktadır. Yani kemik yapı iskelelerinin yüksek hassasiyette desenlenmesine veya lazer enerjisi kullanılarak doku yapılarının üretilmesine izin veren bir biyobaskı yöntemidir. Hücreler, büyüme faktörleri, genler, ilaçlar ve biyomateryaller dahil olmak üzere biyolojik maddelerin birikmesi üzerindeki hassas kontrolü nedeniyle daha büyük avantajlar sunmaktadır.

3.2. BİYOMALZEMELER

Biyomalzemeler, doğal olarak bulunan veya sentetik olarak üretilen malzemelerdir. Canlı vücudunda gerekli bölgelerde kullanılarak işlevlerinin yerine getirilmesini sağlamaktadır. Biyomalzemeler medikal ve sağlık alanında önemli bir yere sahiptirler. Biyoyumluluk; canlıların sisteminde doku oluşturacak, sisteme uyum sağlayacak, istenilen işlevin yerine getirilmesini sağlayabilecek, dokuların işlevlerine engel olmama ve iltihaplanma oluşturmaması yeteneği ile tanımlanmaktadır [56,57].

Doku mühendisliği, dokunun yenilenmesi, organ fonksiyonlarının düzenlenmesi ve devamlılığı için mühendislik ilkelerinin yaşam bilimlerine uygulandığı disiplinlerarası bir çalışma alanıdır [58]. Doku mühendisliği yaklaşımı, canlı hücrelerin in vitro ortamda biyomalzemelerden oluşan destek iskeleleri üzerinde çoğalması ve elde edilen hücreli biyomalzeme iskelesinin vücuttaki hasarlı bölgeye yerleştirilmesi prensibine dayanmaktadır [59]. Doku mühendisliği, işlevini yerine getiremeyen hasarlı organ yerine, hücre, doku iskelesi ve uyarıcı/düzenleyici faktörler kullanılarak üç boyutlu fonksiyonel yapay doku ve organların oluşturulmasıdır [60,61,62,63].

Biyomalzemeler; seramikler, metaller, polimerler ve kompozitler olarak sınıflandırılmışlardır. Biyomürekkep hazırlanmasında kullanılabilen biyomalzeme çeşitleri aşağıda sıralanmıştır.

3.2.1. Biyometaller

Biyometallerin vücuda uyumlu biyomalzeme olmasının yanı sıra sert yapıları ve yoğunluklarından vücutta kullanımında dezavantaj oluşturmaktadır. Yüksek mukavemeti ve kristal yapılarından dolayı eklem veya kemik protezlerinde kullanımı uygundur. Biyometaller olarak yaygın kullanılan metaller aşağıda sıralanmıştır.

3.2.1.1. Çelik

Biyomalzeme olarak da kullanılan çelik; alaşımlı, karbon ve paslanmaz çelikler olarak üç gruba ayrılmaktadır. Alaşımlı çeliklerde, yapısında alüminyum, krom, nikel, kobalt, bakır, mangan, molibden, fosfor, silisyum, kükürt, titanyum, tungsten ve vanadyum içerebilirler. Alaşıma eklenen krom, korozyon direncini ve ısı direnci artırır, alüminyum ise aşınmaya karşı direnci artırır. Karbon çeliği, yapısında demir, mangan, silisyum, karbon ve eser miktarda miktarda kükürt ve fosfordan oluşur. Paslanmaz çelik ise, yapısında az miktarda silisyum, fosfor, azot, mangan, molibden ve kükürt bulunur.

3.2.1.2. Titanyum (Ti)

Titanyum hafif bir metaldir, kırılmaya ve bükülmeye çok dayanıklıdır, çok kuvvetlidir, paslanmaz yapıdadır, çok yüksek derecede ısıya dayanıklıdır, birçok kuvvetli kimyasaldan etkilenmez ve insan vücudunda alerji yapmaz. Bu özelliklerinden dolayı bağlantı bölgelerinin yenilenmesi, kemik levhaları ve diş vidaları, implantları olarak kullanılabilir [57].

3.2.1.3. Dental Amalgam

Amalgam; bakır, gümüş, kalay ve çinko'dan oluşan alaşımın civa ile karıştırılması sonucu hazırlanan sert ve dayanıklı bir malzemedir. Diş dolgularında kullanılmaktadır. İlk karıştırıldığında yumuşak yapıda olması diş boşluğundaki hacmi alır. Sonrasındaki kimyasal tepkimeden dolayı sertleşerek bulunduğu hacmin şeklini alır.

3.2.1.4. Altın (Au)

Altın ve altın alaşımları kararlılık, korozyon direnci ve uzun ömürlü oluşlarından dolayı diş tedavisinde kullanılmaktadır. Altın alaşımları saf altına göre daha dayanıklı olduklarından tıbbi dental uygulamalarda kullanılmaktadır.

3.2.2. Biyoseramikler

Biyoseramikler kemik kaplama, kemik yapıştırma, kemik dokusuna girme özelliklerinden dolayı klinikte tercih edilen malzemelerdendir. Diş implantında dolgu malzemesi olarak kullanılan sert bağ dokusunun tamiri veya yenilenmesinde restoratif olarak sık kullanılan materyallerdendir.

Biyoseramikler, biyoinert ve biyoaktif olmak üzere iki grupta incelenir. Biyoaktif seramik, doku ve implant arasında kimyasal bağ oluşumuna izin verir. Bu biyoaktif seramiklerden biri alüminadır. Biyoinert seramikler ise doku ile etkileşimleri mekanik bağ şeklindedir. Örneğin, hidroksiapatit ve kalsiyum fosfat biyomalzemeleridir.

3.2.2.1. Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)

Hidroksiapatit; biyoyumluluğu yüksek bir malzemedir. Kemik ile implant edilen yüzeyinde çok kuvvetli bağlar oluşturabilmektedir ve kemiğin bu yüzeyde büyüebilmesini hızlandırmaktadır. Hidroksiapatit (HA) yüzeyinde diğer biyoseramiklere göre osteoblast hücrenin yapışması ve çoğalması çok daha iyidir ayrıca nano HA yüzeyindeki osteoblast hareketleri daha hızlıdır [64].

Kalsiyum fosfatların içerisinde HA bulunur. HA yüksek biyoyumluluğu, yavaş bozunması, kimyasal yapısının kemik mineraline en çok benzerlik göstermektedir. Nano HA'nın tane boyutlarının kemikte bulunan minerallerin tane boyutlarına yakınlığından dolayı, HA'nın zayıf olan mekanik özelliklerini güçlendirmek ve biyolojik özelliklerini daha yüksek seviyelere çıkartmak amacı ile nano kristalli HA üretilmesi konusunda yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır [64,65]. HA'nın

kimyasal yapısı içerisinde kemik ve dişin inorganik kısmında bulunan Ca ve P elementleri bulunmaktadır.

3.2.2.2. Trikalsiyum Fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Trikalsiyum fosfat vücut içerisindeki biyoyoumluluğu nedeni ile sağlık sektöründe sıklıkla kullanılmaktadır. Trikalsiyum fosfatın element bileşimi diş ve kemiklerde benzerliklerinden dolayı kullanılmaktadır. Yüksek kuvvetlere dayanımının az olduğundan dolayı fazla yük gerektirmeyen yerlerde kullanılmaktadır.

Kemik kalsiyum fosfat tuzları, organik kısım ve sudan oluşmaktadır. Kemik makroskopik olarak kortikal (sıkı yapılı) ve trabeküler (süngersi) kemikten oluşmaktadır. Kortikal (sıkı yapılı) kemiğin ağırlıkça %69'unu kalsiyum fosfat mineraller, %22'sini organikler ve %9'unu da su oluşturmaktadır [64,66].

3.2.2.3. Alümina (Al_2O_3)

Alüminanın yüksek sertlik, düşük yoğunluk, ısıl kararlılık ve korozyon dayanımı özelliklerinden ve düşük maliyetinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır [67]. Alümina oksit malzemelerden biridir. Alüminyum oksitten, yoğun ve gözenekli yapıda ürünler elde edilir. Laboratuvar malzemeleri olarak kullanılmaktadır. Alumina partiküllerin matris ile sağlam bir bağlanma gerçekleştirdiğinden aşınma dayanımları oldukça yüksektir [68].

3.2.2.4. Zirkonya (ZrO_2)

Yüksek dayanıklılıktaki oksit seramik materyallerinden biri olan zirkonyanın bu dayanım özelliklerinden dolayı materyalinin kullanımını çok yaygın hale getirmiştir. Bu mekanik özelliğe ek olarak, yüksek kırılma direnci, uzun dönem renk stabilitesi ve korozyona karşı dirençli olmasıdır [56].

3.2.2.5. Biyocam seramikler

Cam seramikler, lityum/alüminyum veya magnezyum/alüminyum kristalleri içeren camlardır. Silika gruplarının bazıları kalsiyum, fosfor veya sodyum ile yer değiştirmesi ile biyocam oluşturulmuştur. Kemik oluşumu yapısına uyumlu olmasına rağmen ağırlık taşıyan sistemlerde kullanılmamaktadır.

3.2.3. Biyopolimerler

Biyopolimerler iki temel kategori de tanımlanabilir. İlk olarak, mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi biyolojik sistemler tarafından üretilen polimerler, ikincisi ise aminoasitler, şekerler ve doğal yağlar gibi biyolojik başlangıç malzemelerinden kimyasal olarak sentezlenen polimerlerdir. En çok bilinen ve kullanılan biyopolimerler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler olarak sıralanabilir [50]. Polimer çeşitlerinden olan polietilen, poliüretan, politetrafloroetilen, poliasetal, polimetilmetakrilat, polietilenteraftalat, silikon kauçuk, polisülfon, polilaktik asit ve poliglikolik asit gibi malzemeler tıbbi uygulamalarda kullanılır. Lif, film, jel, boncuk, nanopartikül gibi malzemelerin hazırlanabilmeleri nedeniyle biyomalzeme olarak geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Ortopedik uygulamalarda düşük mekanik özelliklerinden dolayı tercih edilmemektedir. Polimerik malzemeler sterilizasyon işlemlerinden etkilendiklerinden tıbbi uygulama alanları da sınırlıdır [33].

3.2.1. Biyokompozitler

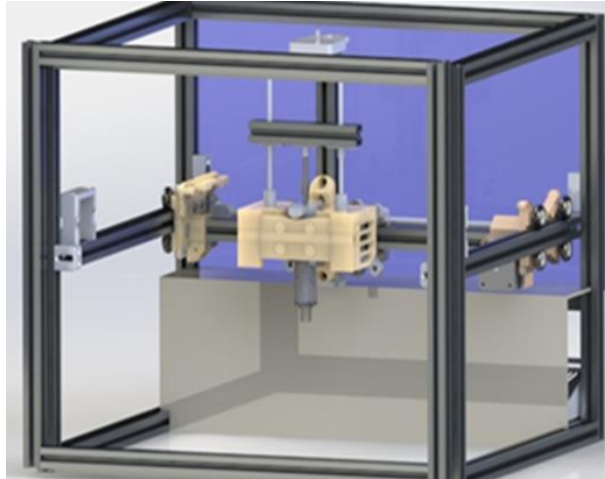
Biyokompozitler, belirli bir kimyasal ve fizyolojik özelliklere sahip en az iki biyomalzemenin karıştırılarak yeni bir malzeme oluşturulmasıdır. Bu karışımdaki kompozit malzemenin özellikleri, karışımı yapılan biyomalzemelerin özelliklerini de taşıyarak yeni üstün özellikli kompozit malzeme oluşturmasıdır. Örneğin, metal-seramik malzemelerden oluşan biyokompozitler hem vücuda olan biyoyumluluğu hem de dayanıklılığından dolayı ortopedik uygulamalarda kullanılabilir. [33].

BÖLÜM 4

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. BİYOYAZICI TASARIMI VE ÜRETİMİ

Bu çalışmada, kemik yapı iskelesinin baskısında kullanılan biyoyazıcı tasarımı ve imalatı yapılmıştır. Biyoyazıcı tasarımında X, Y, Z koordinat sistemin hareketini sağlamıştır [69]. Sistemde X ve Y koordinatları yazıcı kafasının yani baskı şırıngasının ileri-geri,sağ-sol hareketini sağlamıştır. Z koordinatı ise şırınga baskısını sağlamak için tasarlanmıştır. Z doğrultusu hareketi ile step motorlarının sigma profil ile şırıngaya baskı uygulayarak malzemenin akışını sağlamıştır. Kabin içi steril baskı yapılabilmesi için UV ışığı kullanılmıştır [70] ve baskı öncesinde kabin içinde dolaşarak steril hale getirilmiştir. Kabin ortamındaki havanın ısı dengesini sağlamak için ise aralıklarla çalışan pervane kullanılmıştır. Şekil 4.1’de tasarımı yapılan biyoyazıcının modellenmiş görüntüsü verilmiştir.



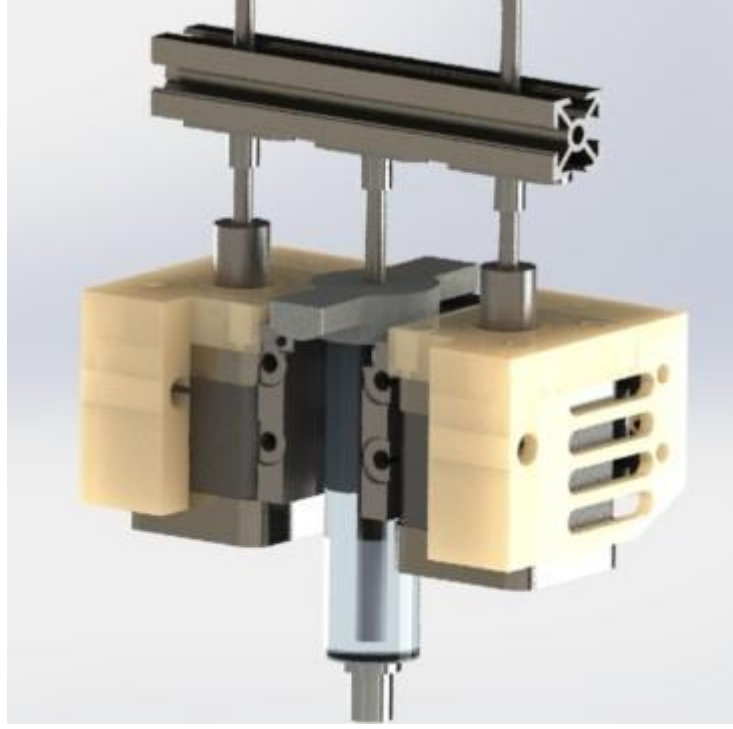
Şekil 4. 1. Modellemesi yapılan biyoyazıcı.

Çizelge 4.1’de üretilen biyoyazıcının teknik özellikleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. Biyoyazıcı teknik özellikler.

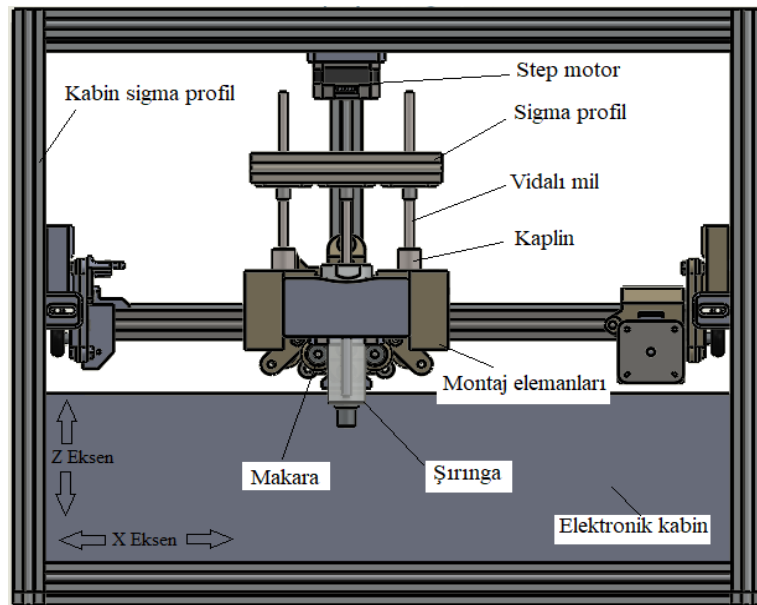
Sistem ölçüleri	450x350x400
Yazdırma alanı	350x250x100
Baskı iğne ucu	0.41 µm (istenilen ölçülerde iğne kullanılabilir)
Kabin türü	Kapalı kabin sistemi
Baskı kafası sayısı	Tek baskılı şırıngalı baskı kafası
Sıcak tabla	Var
Baskı hızı	400 mm/sn
Baskı malzemesi	Yoğun viskoziteli tüm biyoakışkanlar
Hareket eksenleri	X-Y ve Z koordinat sistemi
Tahrik sistemi	Makaralı ve kayış- kasnak sistemi
Kabin malzemesi	Sigma profil
Baskı hassasiyeti	400 µm
Kabin içi soğutucu fan	Var
UV ışık baskısı	Var
Baskıya harici malzeme püskürtme mekanizması	Var

Kemik yapı iskelesi baskısında biyomürekkebin katı kıvamda olması baskılamayı oldukça zorlaştırmıştır. Bu zorlamada şırınga ucunun 0.41 µm olması da etkilemiştir. Bundan dolayı step motorları üzerindeki baskı artmıştır. Bu baskıyı azaltmak için şırıngayı Z koordinat doğrultusunda baskılayan step motoru çift olarak kullanılmıştır. Bu step motorları vidalı mile kaplinler ile vidalı miller ise şırınganın baskısını yapabilmesi için sigma profil ile bağlantısı yapılmıştır. Step motoru çalıştığında vidalı miller sigma profili kendi tarafına doğru çekmesi ile şırınganın üst kısmına baskı yapılmıştır ve biyomürekkep akışı başlamıştır. Kabin içindeki hareketli elemanlar sigma profil üzerinde sabit tutulmuştur ve hareket iletim elemanları ile şırınga hareket ettirilmiştir. Şekil 4.2’de modellemesi yapılan şırınga sistemi gösterilmiştir.



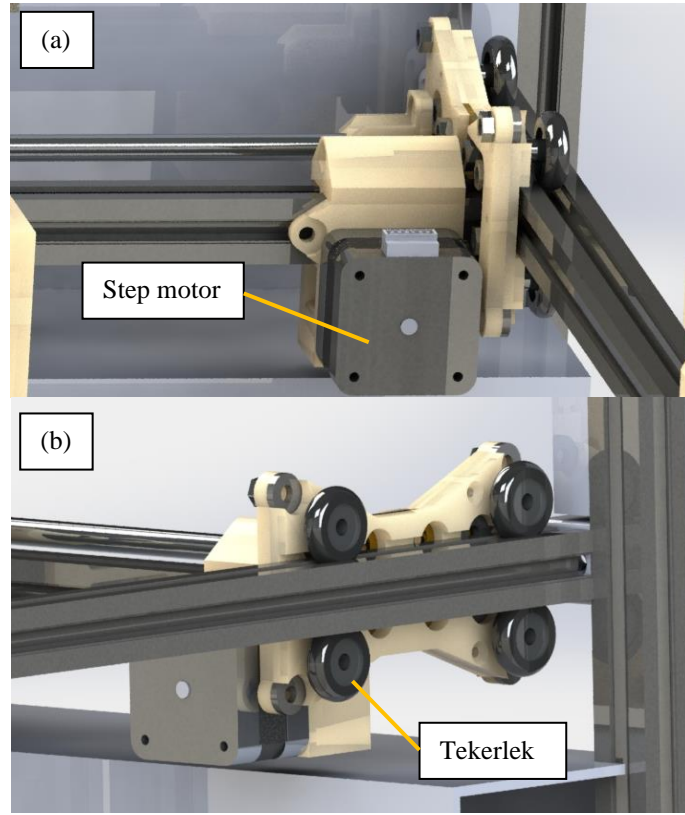
Şekil 4.2. Modellemesi yapılan şırınga sistemi.

Şırınga sisteminin bağlı olduğu mekanizma kendi hareketindedir. Biyoyazıcı X ve Y koordinat hareket sistemi kayış-kasnak, step motor bağlantısı ile oluşmuştur. Tekerlekler yardımı ile sigma profil üzerinden aynı doğrultuda hareket iletimi sağlanmıştır.



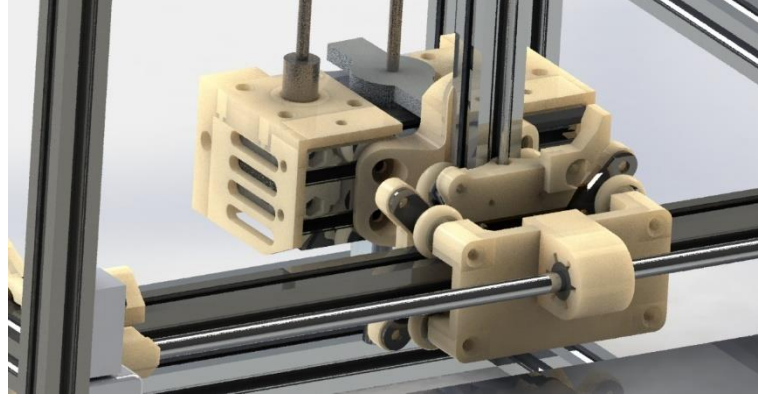
Şekil 4.3. Kabin sistemi elemanları.

Şekil 4.3. incelendiğinde biyoyazıcının tasarım ve hareket elemanlarını göstermiştir. Biyoyazıcının kabini sigma profil seçilerek tasarlanmıştır. Sigma profil hafif, montajlama işleminde somun kanallarının bulunması montajı kolaylaştırması ve sağlamlığından dolayı tercih edilmiştir. Tüm elektronik parçaların ise sistemden uzak tutulması için elektronik kabin kullanılarak içine yerleştirilmiştir. Step motorlar, biyoyazıcı sisteminin tüm hareketli elamanlarında hareketi sağlamak için kullanılmıştır. Biyoyazıcıda baskı yapılan tablaya hareket verilmemiştir. Sabit baskı alanı olarak kullanılmaktadır.



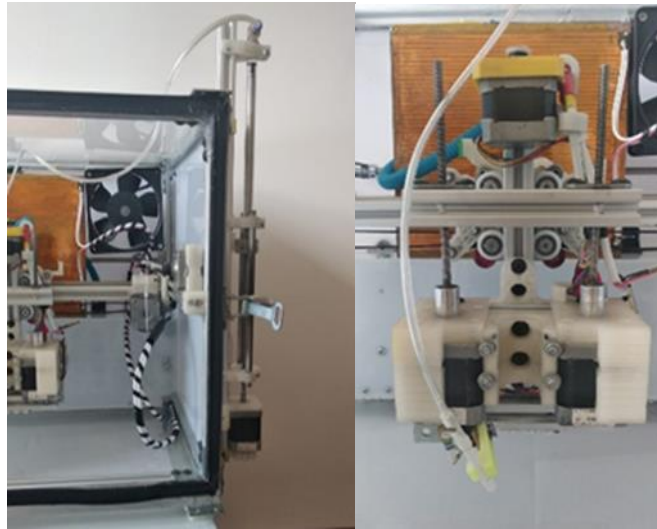
Şekil 4.4. Y eksen hareket sistemi (a) ön, (b) yan görünüşü.

Şekil 4.4.'de Y ekseninin hareket sisteminin ön ve yan görünüşü verilmiştir. Y ekseninde, step motorundan aldığı hareketi kayış kasnak sistemine vererek tekerlekler yardımı ile hareket etmesi sağlanmıştır.



Şekil 4.5. Z eksenli hareket sistemi.

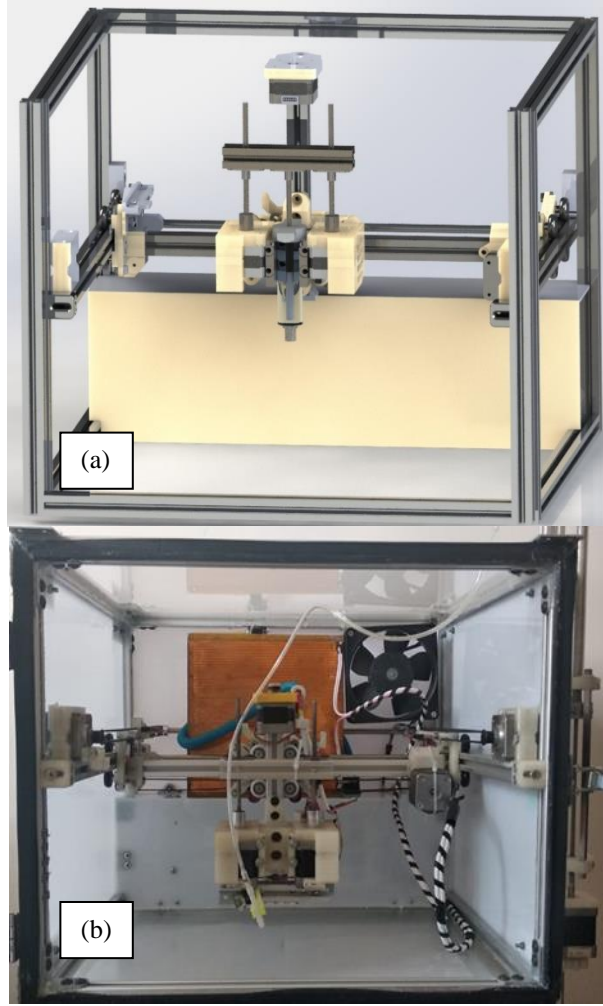
Şekil 4.5'te şırınganın Z eksenindeki hareket elemanlarının modellenmesi gösterilmiştir. Şırıngadaki biyomürekkebin baskılanması ve Z ekseninde şırınga mekanizmasının hareketini sağlamak için step motor kullanılmıştır. Step motordan aldığı hareketi kayış-kasnak mekanizmasına ileten ve Z eksenin boyunca tekerlekler yardımı ile hareketi sağlanmıştır.



Şekil 4.6. Tasarlanan biyoyazıcı mekanizma bölümleri.

Şekil 4.6'da çalışmada tasarlanan ve üretilen biyomürekkebin mekanizma bölümleri verilmiştir. Sistemde bulunan pervane ortamdaki havanın dağıtılmasını sağlamak için tasarlanmıştır. Biyoyazıcı tasarımı yaparken çok amaçlı ileriye yönelik bir tasarım yapılmıştır. Bunlardan ilki, yazıcı tablasında istenilen sıcaklıkta ayarlanabilecek ısıtıcı tabla kullanılmıştır. Hücre takviyeli biyomürekkep hazırlandığında hem ortamın ısısını

hem de tablanın ısını oda sıcaklığında tutabilmesi amaçlanmıştır. İkinci yenilik tasarım ise baskı esnasında kemik yapı iskelesinin üzerine farklı malzeme püskürtmeye yarayacak bir sistem kurulmuştur. Kabinin yan tarafında konumlandırılmıştır. Step motorundan aldığı hareket ile sistem çalıştırılmıştır.



Şekil 4.7. İmal edilen biyoyazıcı (a) model ve (b) gerçek görüntüsü.

Şekil 4.7.'de tasarlanan biyoyazıcının modellemesi ve gerçek görüntüsü verilmiştir. Bilgisayar destekli olarak tasarımı yapılan biyoyazıcının imalatı aşamasında elektronik bağlantı ve sistem kontrolü için açık kaynak programlarından olan Arduino kullanılmıştır. Sistemlerdeki motor hareketlerinin yön değişimini sağlamak için endstop switchleri kullanılmıştır. Biyoyazıcının biyobaskı parametreleri olarak; baskı hızı 400 mm/min, katman kalınlığı 0,25 mm, şırınga iğne çapı 0,41µm, katman sayısı 2 mm, doluluk oranları %10-%15 olarak belirlenmiştir.

4.2. MALZEME SEÇİMİ VE BİYOMÜREKKEP HAZIRLAMA

Biyoyazıcının imalatından sonraki işlem olan biyomalzeme seçimi literatür araştırması sonunda yapı iskelesinin hazırlanabilmesi için kullanılan biyomalzemelerin üzerinde hücre çoğalabilen, kemik dokusu oluşturan ve kolay baskı alınabilecek malzemeler seçilmiştir. Biyomalzeme olan sentetik hidroksiapatit (CSHA), koyun hidroksiapatit (SHA), magnezyum oksit (MgO), alümina (Al₂O₃), sodyum aljinat ((C₆H₇NaO₆)_n) ve distile su kullanılmıştır.

4.2.1. Koyun Hidroksiapatit (SHA)

Çalışmada kullanılan koyun hidroksiapatit malzemesi doğal koyun kemiklerinin işlenmesi ile elde edilmiştir. Bu yöntemde doğal koyun kemikleri kaynatılıp ilik ve yağ gibi yumuşak dokusundan ayrılmıştır. Bu dokularından arındırılan kemikler, hac. %4 NaOH çözeltisinde kaynatılmıştır. Kaynatılan kemikler akan su altında NaOH'dan arındırılmıştır. 350°C'de elektrikli fırında tutulan kemiklerden organik yapının uzaklaşması sağlanmıştır. Yakılan kemikler 750°C'lik fırında tüm yapının istenen apatit yapıya dönmesi sağlanmıştır. Hazırlanan kemiklere 24 saat bilyalı öğütücü değirmende yaş öğütme gerçekleştirilmiştir ve öğütme sonrasında 105°C sıcaklıktaki etüvde kurutulmuştur. SHA tozunun ortalama tane boyutu $\approx 10 \mu\text{m}$ olarak belirlemişlerdir [71,72].

4.2.2. Sentetik Hidroksiapatit (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂)

Sentetik hidroksiapatitin tane boyutunun kemik apatit minerallerine benzediğinden dolayı kullanılmıştır [73]. Bu çalışmada, biyoyumlu biyomalzeme [74] olan Nanografi Nano Teknoloji firmasından saflığı %99,5 ve tane boyutu 40-50 μm sentetik hidroksiapatit (CSHA) tedarik edilmiştir. CSHA kemik yapı iskelesi matrisi olarak kullanılmıştır [75].

4.2.3. Magnezyum Oksit (MgO)

Yüksek mekanik özellikleri, toksik olmama ve alkali metallere karşı yüksek direnci nedeni ile başta endüstriyel fırınlar olmak üzere, boya, çimento, kâğıt, plastik, kauçuk, ilaç, gübre ve hayvan yemlerinde katkı ve/veya dolgu maddesi olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, hidroksiapatitin dayanımını arttırmak için [40] Nanografi Nano Teknoloji firmasından saflığı %99,99 ve tane boyutu 325 µm olan MgO tedarik edilerek kullanılmıştır.

4.2.4. Alüminyum Oksit (Al₂O₃)

Alüminyum oksit yüksek dayanımından dolayı sert dokularda kullanılmıştır [76]. Bu çalışmada, Nanografi Nano Teknoloji firmasından saflığı %99,5 ve tane boyutu 1-10 µm olan Al₂O₃ tedarik edilmiştir.

4.2.5. Sodyum Aljinat ((C₆H₇NaO₆)_n)

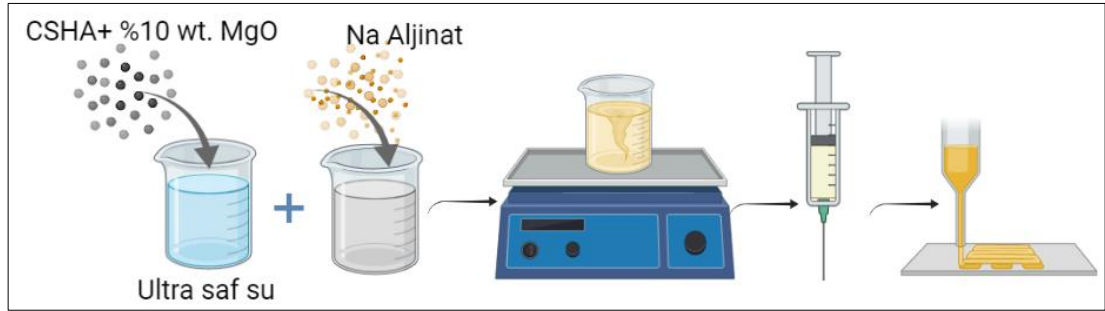
Kimyasal formülü (C₆H₇NaO₆)_n olan sodyum aljinatın molekül ağırlığı yüksektir. Kıvam arttırıcı özelliği ile jelleştirici ve viskozite arttırıcı olarak gıda sanayinde kullanılmıştır. Sodyum aljinatın suda çözünmesi, su tutma kapasitesi, jelleşme hızı, yüksek ısıya dayanıklılık, geriye dönüştürülemeyen özellikte jel oluşturma özellikleri bulunmaktadır. Bu çalışmada biyomürekkebin jelleştirme işlevi için Tito firmasından Sodyum Aljinat Gıda Tipi kullanılmıştır. Fakat hücre yıkımının olmaması için sodyum aljinat %5 ve altındaki yüzdede karışıma eklenmiştir. Sodyum aljinat çok yönlülükleri ve mekanik özelliklerini uyarlama olasılıkları nedeniyle, kök hücreler, fibroblastlar, nöronlar ve hepatositler dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerini yazdırmak için kullanılmıştır. Sodyum aljinat biyomalzemesinin jelleşme özelliğinde olduğundan kemik yapı iskelesi üretilebilme kolaylığı, hücre büyümesi ve davranışı üzerinde bir etkiye sahip olduğundan kullanılmıştır [77].

CSHA ve SHA ana biyomalzemelerine %10 w/v oranında MgO ve Al₂O₃ eklenerek iki farklı biyomürekkep oluşturulmuştur. Bu iki karışımın ayrıntılı karışım değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Biyomürekkep için karışımların malzeme ve oranları.

KOD	Karışımlar	Karışım içeriği (w/v)
CSHA+MgO	1 nolu numune içeriği; (CSHA+%10 w/v MgO+(C ₆ H ₇ NaO ₆) _n)	%7,4 (w/v) (CSHA+%10 w/v MgO) %3,8 (w/v) (C ₆ H ₇ NaO ₆) _n 25 mL distile su
SHA+MgO	2 nolu numune içeriği; (SHA+%10 w/v MgO+(C ₆ H ₇ NaO ₆) _n)	%7,4 (w/v) (SHA+%10 w/v MgO) %3,8 (w/v) (C ₆ H ₇ NaO ₆) _n 25 mL distile su
CSHA+Al ₂ O ₃	3 nolu numune içeriği; (CSHA+%10 w/v Al ₂ O ₃ +(C ₆ H ₇ NaO ₆) _n)	%7,4 (w/v) (CSHA+%10 w/v Al ₂ O ₃) %3,8 (w/v) (C ₆ H ₇ NaO ₆) _n 25 mL distile su
SHA+Al ₂ O ₃	4 nolu numune içeriği; (SHA+%10 w/v Al ₂ O ₃ +(C ₆ H ₇ NaO ₆) _n)	%7,4 (w/v) (SHA+%10 w/v Al ₂ O ₃) %3,8 (w/v) (C ₆ H ₇ NaO ₆) _n 25 mL distile su

Jel oluşturmak için aljinatların derişimleri %0,5-2 arasında kullanılmıştır.[78]. Biyomürekkebin eklenen aljinattan dolayı kemik yapı iskelesi baskısı sonrasında iskele üzerine çapraz bağlayacak olan kalsiyum klorür (CaCl₂) sıvısı ayrı bir şırınga ile dışarıdan püskürtülmüştür.



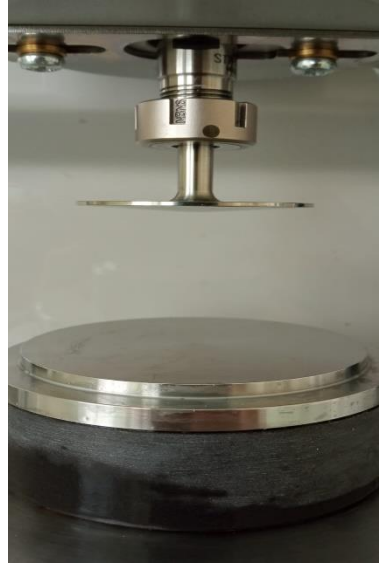
Şekil 4.8. Biyomürekkep karışımlarının şematik gösterimi.

Şekil 4.8.' de verilen karışımlardan toz halindeki iki malzeme olan sentetik hidroksiapatit ve ağırlıkça %10 w/v magnezyum oksit karışımı kendi aralarında karıştırılmıştır. Bu toz karışım bir kap içerisine koyulmuştur, üzerine distile su eklenerek 90 dk boyunca manyetik karıştırıcı ile 60°C de karıştırılmıştır. Karışımın üzerine sodyum aljinat eklenerek kıvam alınca kadar 120 dakika karıştırılmıştır. Hazırlanan biyomürekkep istenilen özellikteki kıvama geldiğinde şırınga içerisine

alınarak baskıya hazır hale getirilmiştir. Bu teknik diğer üç karışım içeriği için de tekrar edilmiştir.

4.3. REOLOJİK ÖLÇÜM

Çalışmada biyomürekkep için sentetik hidroksiapatit (CSHA), koyun hidroksiapatit (SHA), magnezyum oksit (MgO), alümina (Al₂O₃), sodyum aljinat ((C₆H₇NaO₆)_n) ve distile su kullanılarak farklı oranlarda karışım yapılmıştır (Çizelge 4.2). Üretilen biyomürekkeplerin viskozite değerlerini belirlemek için reometre cihazı kullanılmıştır. Bu analizler için Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünde (HUBTUAM), Malvern / Gemini II reometre cihazı kullanılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Reometre cihazı.

Depolama Modül (G') (elastik gerilimin gerinime oranı) bir malzemenin enerjiiyi elastik olarak saklayabilmesini temsil eder. Kayıp Modül (G'') (viskoz gerilimin gerinime oranı) bir malzemenin enerjiiyi dağıtabilmesini temsil eder;

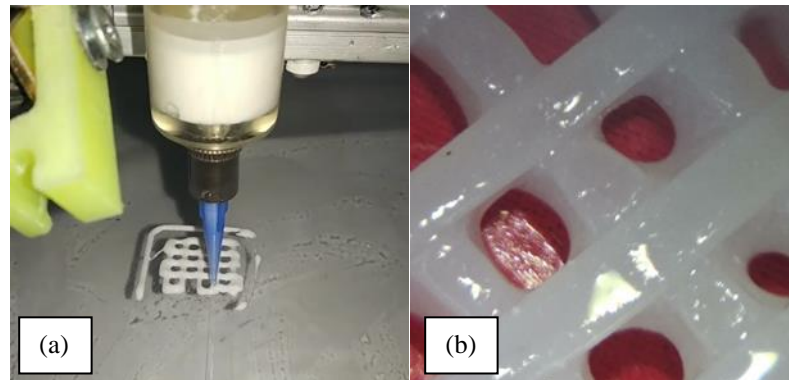
1. $G'' > G'$, viskoz davranış;
2. $G'' = G'$, jel noktası;
3. $G' > G''$, elastik katı davranış olduğunu temsil eder [79].

Reaksiyon boyunca G' in, G'' ye eşit olduğu zamana jelleşme zamanı denir. Bu noktadan önce malzeme yapı gereği viskoelastik likit özellikte iken bu noktadan sonra viskoelastik katı özelliğindedir. Viskoz davranış, cisme dış kuvvet uygulanınca gösterdiği gecikmeli şekil değişimi davranışdır.

Deney parametreleri olarak 4° 'lik konik açılı 40 mm çapındaki paralel plakalarda 25°C sabit sıcaklık uygulanmıştır. Deneyler yapılmadan önce çözeltilerin 1 dakika boyunca denge sıcaklığına ulaşmasına izin verilmiştir ve 0.000 -1000.000 1/s kesme hızında ve 1,5 f(Hz) frekansında biyomürekkebin ölçümleri yapılmıştır. G' , elastik gerilimin gerinime oranı ile belirlenir. G' malzemenin elastik özelliği ve malzeme yapısında ne kadar enerji depolandığı hakkında bilgi verir. G'' , viskoz gerilimin gerinime oranı olup malzemenin viskoz özellikleri ile bir döngü boyunca malzeme yapısından kaybedilen enerjiyi verir [79,80]. Yapılan deney sonuç değerleri vizkosite (Pa.s), kesme hızı (s^{-1}), depolama modül (G'), kayıp modülü (G''), Tan δ değerleri karşılaştırılmıştır. Reometre sonuçları Bölüm 5.1'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

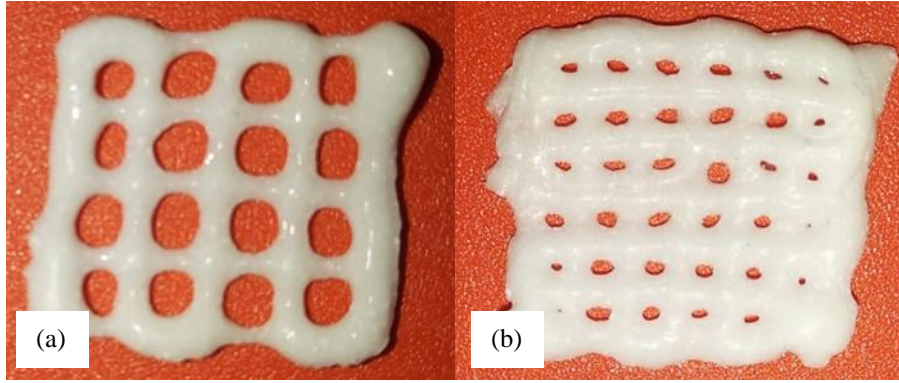
4.4. KEMİK YAPI İSKELESİ ÜRETİMİ

Kemik yapı iskelesi üretimi için hazırlanan dört farklı parametrelerde biyomürekkep hazırlanmıştır. Hazırlanan bu biyomürekkeplerin baskısının sağlandıktan sonra viskozite değerleri reometre cihazı ile analiz edilerek belirlenmiştir.



Şekil 4.10. (a) Baskı düzeneği ve (b) basılan kemik yapı iskelesi.

Şekil 4.10'da gösterilen baskı düzeneğinde hazırlanan biyomürekkep şırınga içine eklenmiştir. Konik uçlu 0,41 µm iç çapındaki şırınga ucu kullanılarak 10x10x1 mm boyutlarında %10-%15 doluluk oranları ile baskısı yapılmıştır. Kemik yapı iskele boyutlarının bu oranlarda seçilmesi hem literatürde [81] sıklıkla kullanılan bir boyut olmuştur hem de malzeme boyutlarının ne kadar az olursa o kadar hücrelerin ekimindeki sayılarını ve maliyetini azaltmıştır.



Şekil 4.11. (a) %10 ve (b) %15 kemik yapı iskelesi baskısı.

Bu çalışmada deney parametreleri olarak, hücre kültürü sonuçlarında kıyaslama yapılabilecek değerde belirlenen kemik yapı iskelelerinin %10-%15 doluluk oranları seçilmiştir. Yapılan baskı deneylerinde baskı esnasında %10-15 olan doluluk oranlarının baskı esnasında biyomürekkep yayıldığından dolayı gözeneklerinde boyutsal azalma sorun teşkil etmeye başlamıştır. Fakat bu sorunun giderilmesi için bir yöntem daha devreye koyulmuştur. Biyomürekkep içinde jelleşmeyi sağlayan aljinat CaCl_2 ile birleştiğinde çapraz bağlanmaktadır. Bu özelliğinden dolayı biyoyazıcı ile baskısı yapılan kemik yapı iskeleleri her iki katman üzerine %2'lik derişimle distile su ile hazırlanan CaCl_2 çözeltisi biyoyazıcı sistemindeki püskürtme mekanizması kullanılarak püskürtülmüştür. Bu durum baskı esnasında malzemenin çapraz bağlanmasını sağlayarak katı hale geçmesini sağlamıştır. Bu yöntem tekrar edilerek tüm baskılarda başarı sağlanmıştır.

4.5. YAPAY VÜCUT SIVISI HAZIRLAMA VE İN VİTRO BİYOAKTİVİTE DENEYİ

Yapay vücut sıvısı (SBF) solüsyonları polimerler, metaller ve seramikler üzerinde, apatit kalsiyum fosfat oluşumuna sebep olmaktadır [82].

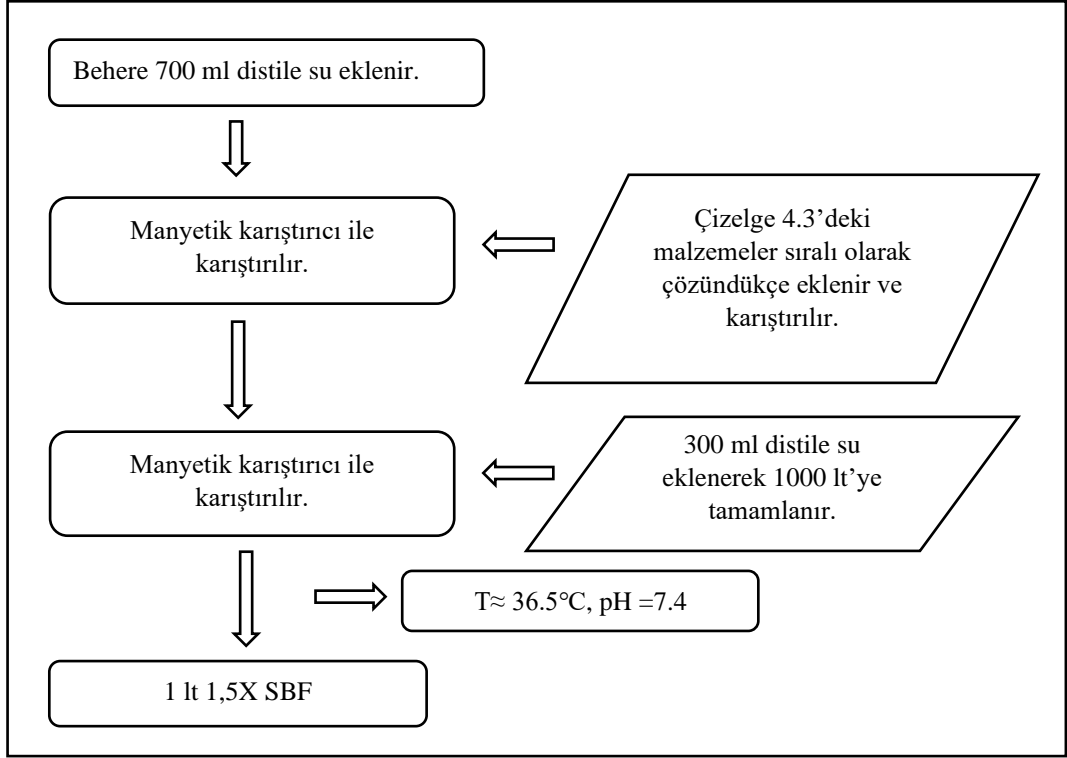
Bu çalışmada, SBF'de kemik yapı iskelelerinin bekletilmesi ile yüzeyler üzerine kalsiyum iyonu birikmesi ve fosfat tabakası oluşması, kemik benzeri apatitin büyümeye başlaması için önemli bir adım olduğundan bu yöntem seçilmiştir [83].

Çizelge 4.3. 1,5X SBF hazırlamada kullanılan kimyasallar ve miktarları (1000ml) [80].

Sıra	Malzeme	Miktar
1	NaCl	11,994 g
2	NaHCO ₃	0,525 g
3	KCl	0,336 g
4	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0,342 g
5	MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,458 g
6	1.0M-HCl	60 ml
7	CaCl ₂	0,417 g
8	Na ₂ SO ₄	0,107 g
9	Tris (Hydroxymethyl)	9,086 g

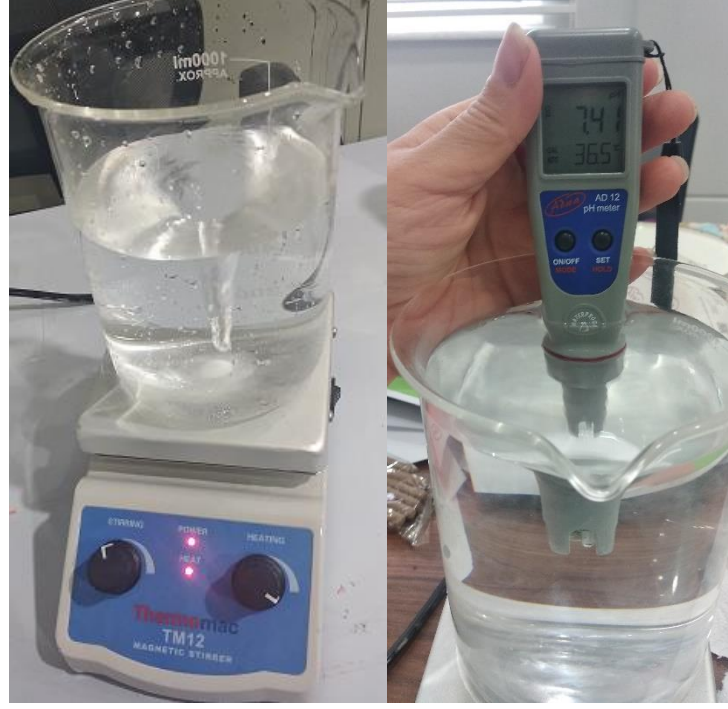
Çizelge 4.3.'de 1000 ml de 1,5X SBF hazırlamada kullanılan kimyasallar ve miktarları verilmiştir.

1000 ml'de 1,5X SBF hazırlamak için aşağıdaki akış diyagramı basamakları kullanılmıştır.



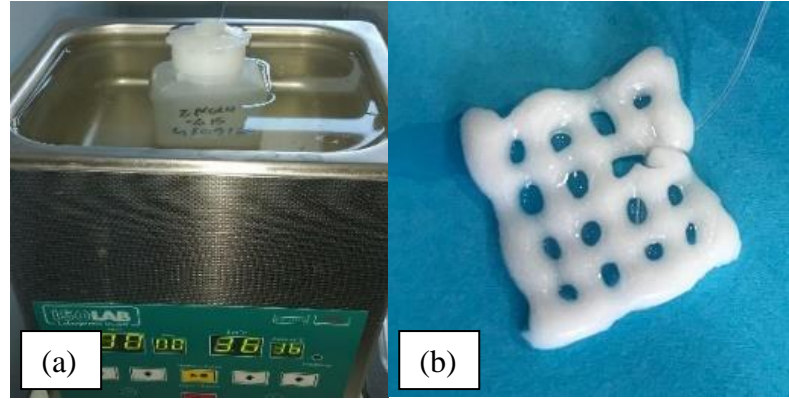
Şekil 4.12. 1000 ml de 1,5X SBF hazırlamak için akış diyagramı basamakları.

Şekil 4.12'de akış diyagramı verilen deney düzeneğinin baskısı yapılan kemik yapı iskelelerinin bekletilmesi için hazırlanan SBF deney düzeneği verilmiştir. Şekil 4.13'te hazırlanan SBF deney düzeneği verilmektedir.



Şekil 4.13. SBF deney düzeneği.

Apatit oluşumu için statik biyoaktivite testi uygulanmıştır. SEM görüntülerinde bu apatit oluşumunun SBF solüsyonunda 2 ve 4 haftalık kontrolleri yapılmıştır.



Şekil 4.14. (a) SBF’de bekletilen deney düzeneği, (b) 4 haftalık SBF sonrası kemik yapı iskelesi görüntüsü.

Tüm karışımlardan oluşturulan kemik yapı iskeleleri SBF solüsyonu hazırlanarak 2 ve 4 haftalık sürelerde daldırma yöntemi kullanılmıştır. Şekil 4.14(a)’de verilen SBF düzeneğinde HDPE malzemesinden olan 100 ml hacimli conta kapaklı şişe kullanılmıştır. Şişe içerisine SBF doldurularak iskelesi daldırılmıştır 2 ve 4 hafta

36°C’de bekletilmiştir. Bekleme süreleri boyunca, kemik yapı iskelesi numunelerinin içinde bulunduğu SBF çözeltileri üç günde bir değiştirilerek tazelenmiştir. Şekil 4.14(b)’de 4 hafta bekletilen %10 doluluk oranlı SBF sonrası kemik yapı iskelesinin şeklinde bozulma olmadığı görülmüştür. Bu deney sonucunda SEM ile apatit oluşumunu incelemeye başlamadan önce vücutta dağılmadan durabileceği sonucuna varılmasına öngörü sağlamıştır.

4.6. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOP (SEM)- ENERJİ DAĞITICI SPEKTRUM (EDS) DENEYİ

Kemik yapı iskelesi numuneleri hem SBF ortamına koyulmadan (SBF’siz) hem de 2 ve 4 hafta SBF’de bekletilmiştir. Bekletilen bu numuneler kurutma cihazında kurumaya bırakılmıştır. Tüm nemi alınarak uygun kuruluğa gelen numuneler platin ile kaplanarak SEM ve EDS sonuçları için cihaza yerleştirilmiş ve analizleri yapılmıştır. SEM ve EDS analizleri Sakarya Üniversitesi Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (SARGEM) tarafından FEI Quanta FEG 450 modeli cihazı kullanılarak görüntüleri çekilmiştir.

4.7. MTT (3-4,5-DİMİTİL-TİYAZOLİL-2,5-DİFENİLTETRAZOLYUM BROMÜR) SİTOTOKSİSİTE TESTİ

MTT testi, hücre canlılığını, hücre aktivasyonunu ve hücre büyümesini ölçen güvenilir bir test olarak bilinmektedir [51]. MTT Sitotoksosite canlılık testleri Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi (HUBTUAM) tarafından yapılmıştır. Hücre canlılığı testi için L-929 (fare subkutanöz bağdokusu), osteoblast hücre hattı, kültür ortamı için DMEM+ L-Glutamin, Fetal Bovine Serum ve Penisilin- Streptomisin kullanılmıştır.

4.8. KONFOKAL MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜ

Konfokal mikroskop testi Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre Merkezinde Leica DMI SP8 Konfokal mikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiştir. L929 Fare Fibroblast hücre hattı, hücre kültürü ve WST-1 Sitotoksosite/Hücre canlılığı tahlili için kullanılmıştır. Hücreler, steril koşullar altında kültürlenerek çoğaltılmıştır. Hücrelerin Mycoplasma

içermediği floresan teknikleri ile araştırılmıştır. Hücreler 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında kültürlenmiştir. Hücre kültürünün yapıldığı ortam %10 FBS ve %1 Pen/Strep içeren L-DMEM'den oluşmuştur. WST-1 analiz ölçümleri için bir spektrofotometre kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir. Fallodin değerlendirilmesi, 3B örnekler üzerine hücre tohumlanmış ve sabitlenmiştir ve örneklerden konfokal mikroskopi ile görüntüleri alınmıştır. Fikse örnekler üzerinde doku takibi yapılmış ve mikrotom ile parafin kesitleri alınmıştır. Deparafinizasyon işlemlerinden sonra örnekler Fallodin boyaması için floresanla boyanmıştır.

BÖLÜM 5

DENEYSEL SONUÇLAR

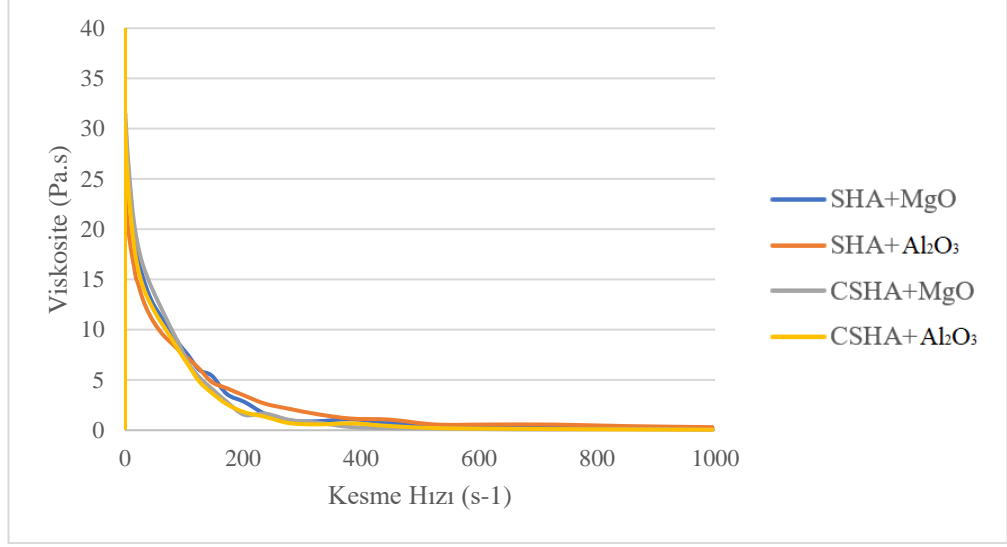
5.1. REOMETRE CİHAZI İLE VİSKOZİTE ÖLÇÜM SONUÇLARI

Çalışmada biyomürekkep için sentetik hidroksiapatit (CSHA), koyun hidroksiapatit (SHA), magnezyum oksit (MgO), alümina (Al_2O_3), sodyum aljinat ($(C_6H_7NaO_6)_n$) ve distile su kullanılmıştır. Matris malzemesi olarak CSHA ve SHA kullanılmıştır. Bu matris malzemelerine %10 w/v MgO ve Al_2O_3 eklenerek dört farklı oranlarda karışımlar elde edilmiştir.

Viskozitenin yanı sıra, biyomürekkep hazırlamada kullanılan malzemelerin reolojik özelliklerinin bilgisi, baskı sırasında biyomürekkep davranışını tahmin etmeye yardımcı olmuştur [84].

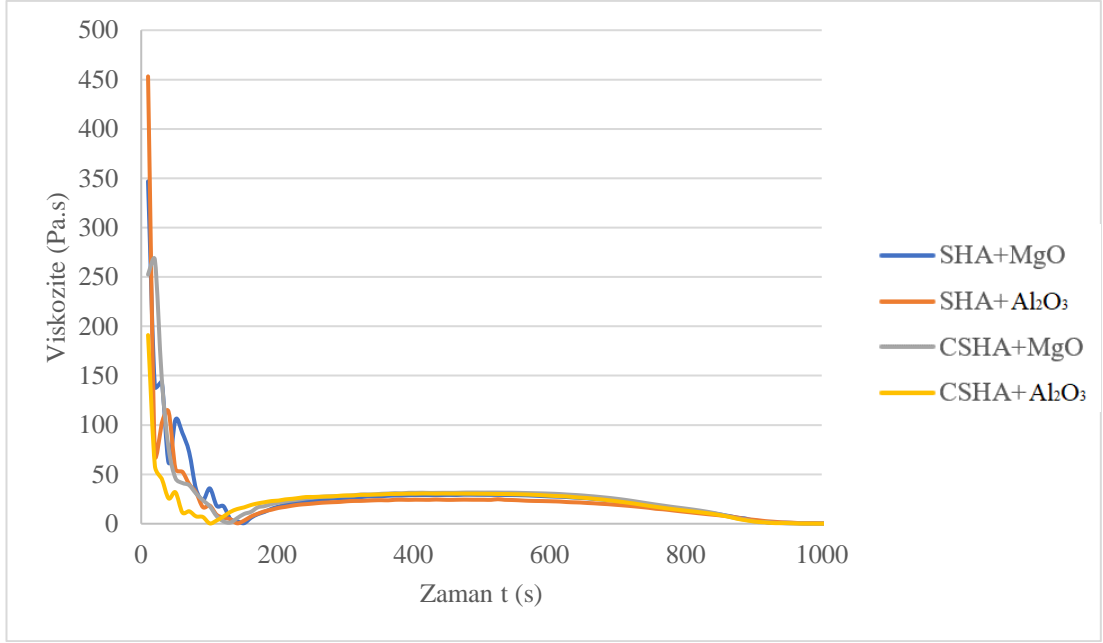
Reolojik araçlara rağmen, yeni biyomürekkeplerin karakterizasyonu, uygun deformasyon nedeniyle belirli bir formül için kuvvet değeri önceden bilinemediğinden deneme-yanılma yaklaşımı gerektirmiştir [85].

Test sonuçlarında viskozite (Pa.s), kesme hızı (s^{-1}), depolama modülü (G'), kayıp modülü (G''), $\tan \delta$ değerleri karşılaştırılmıştır [86]. Tüm biyomürekkeplerin baskılanabilirliği grafiklerdeki bölgesel oranların karşılaştırılması ile belirlenmiştir.



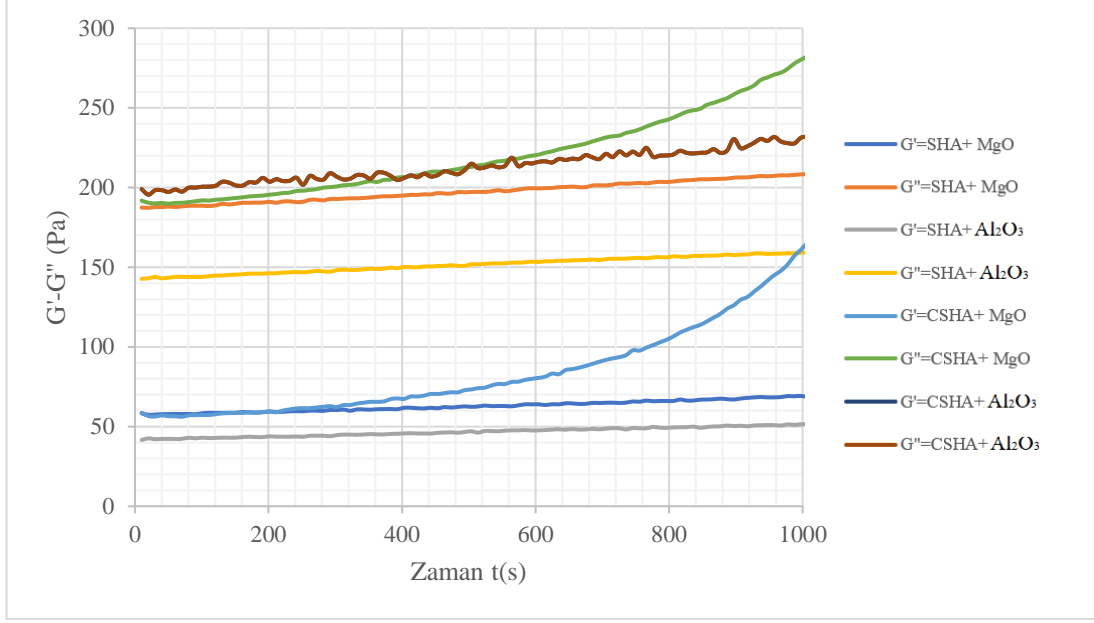
Şekil 5.1. Viskozite (Pa.s) ve kesme hızı (s⁻¹).

Şekil 5.1’de viskozite ve kesme hızı arasındaki kesme hızının bir fonksiyonu olarak biomürekkep viskozite ilişkisi verilmiştir. Biyobağın yayılmamasını ve büyük yapıların çökmesini önlemesini sağlamak için düşük kesme hızında yüksek viskozite gerekmiştir. Tüm karışımlarından elde edilen biyomürekkep 0-350s zaman aralığında viskozite- kesme hızı grafiğinde kesme hızı arttıkça viskozite oranı azalarak ilerlediği görülmüştür. 0-5 yoğunluk aralığında doğrusal harekete dönüşerek kararsız halden kararlı hale dönüşmüşlerdir. Bu oran baskı esnasında biyomürekkeplerin kopma eğiliminde olmadığını tüm karışımların sürekliliğini sağladığı ve baskının yapılabileceği belirlenmiştir [38].



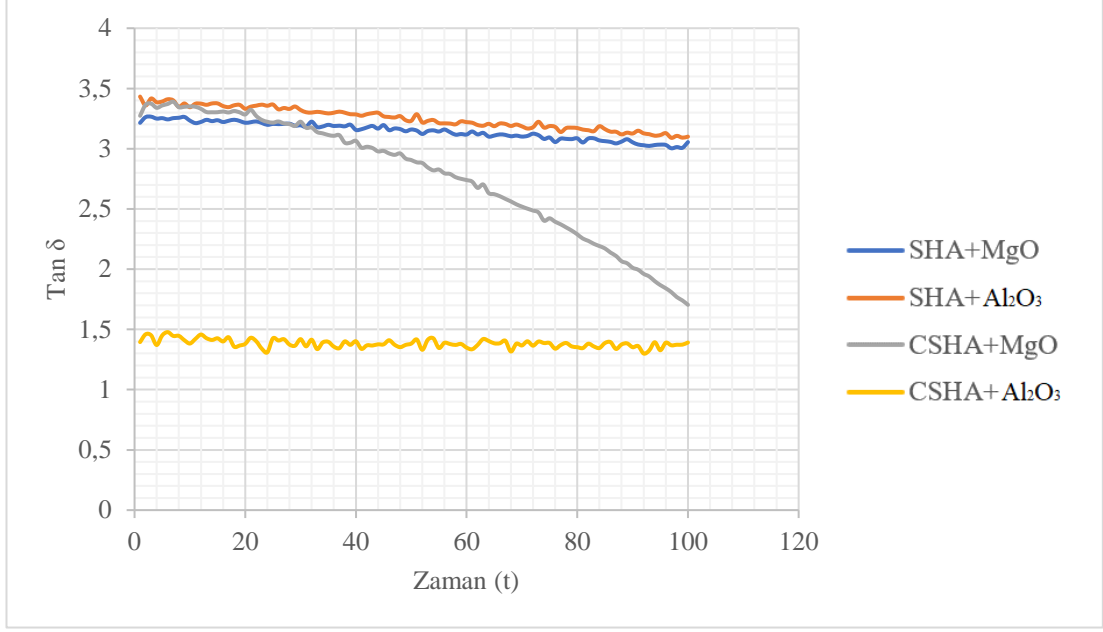
Şekil 5.2. Viskozite (Pa.s)- zaman t(s).

Sol-jel geçişi zamana veya sıcaklığa bağlıdır [87]. Viskozite davranışında 0-200s zaman aralığında azalma meydana gelmiştir. Tüm biyomürekkeplerin 450s zamanındaki veriler karşılaştırıldığında aralığında CSHA+MgO (31,292 Pa.s), CSHA+Al₂O₃ (30,505 Pa.s), SHA+MgO (29,184 Pa.s), SHA+Al₂O₃ (24,162 Pa.s) çıkan değerler benzer değerlerde belirlenmiştir. Tüm biyomürekkeplerin viskozun kararlı davranışında ilerlediği görülmüştür. 850s zamanından sonra ise viskozitenin azaldığı ve tekrar kararlı viskoz davranışı ile ilerledikleri görülmüştür [38,88].



Şekil 5.3. $G'' - G'$ (Pa) zaman (s).

Şekil 5.3'teki grafik değerleri karşılaştırılırsa; herbir biyomürekkebin $G' - G''$ değerleri kendi aralarında kıyaslandığında kayıp modülünün depolama modülünden büyük olduğu ($G'' > G'$), jelleşmenin oluşmadığı ve viskoz davranış gösterdiği görülmüştür [89]. Grafik incelendiğinde, 600s zamanında viskoz davranışları; CSHA+MgO ($G''=220,71$ ve $G'=80,567$), CSHA+Al₂O₃ ($G''=216,17$ ve $G'=160,29$), SHA+MgO ($G''=199,47$ ve $G'=63,984$), SHA+Al₂O₃ ($G''=153,3$ ve $G'=47,605$) karışımları göstermiştir.

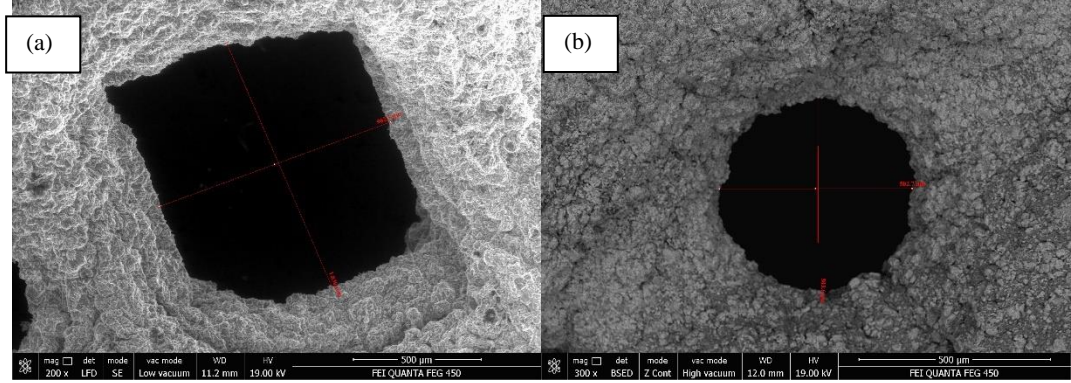


Şekil 5.4. Tan δ -zaman t(s).

Şekil 5.4'te bulunan Tan δ , elastik kısım Tan ile ilişkili olarak viskoz kısmı temsil etmektedir. Gerilme ve gerinim eğrileri arasındaki gecikme açısı olarak da bilinmektedir. Deformasyon döngüsü esnasında kaybedilen enerjinin depolanan enerjiye oranıdır. $Tan \delta = G''/G'$, bu oran numunenin elastik (küçük değerler) veya viskoz (yüksek değerler) davranışını gösterir [46]. Düşük Tan δ değerleri ağırlıklı olarak katı elastik davranışı yansıtır [90]. Biyomürekkepler 100s zamanında aralarında kıyaslandığında CSHA+Al₂O₃ biyomürekkebi diğer biyomürekkeplere göre $tan \delta=1,383$ en düşük değerler çıkmıştır. Bu değerler ile elastik davranış gösterdiği belirlenmiştir. CSHA+MgO biyomürekkebi ise en yüksek $tan \delta=3,35$ değerinde olduğu belirlenmiştir. 0,25-0,45 arasındaki Tan δ değerleri yazdırma için uygun olduğundan [84] biyomürekkeplerin tablaya basılabilirliği değerlere göre uygun olmadığı belirlenmiştir. Çünkü katı davranış sergilememişlerdir. Bu davranışları baskı esnasında biyomürekkeplerin baskı tablası üzerinde yayılmaya yol açtığından ek takviye olarak CaCl₂ çözeltisi baskılanan kemik yapı iskelelerine püskürtülmüştür. Böylece kararlı yapı oluşumu sağlanmıştır.

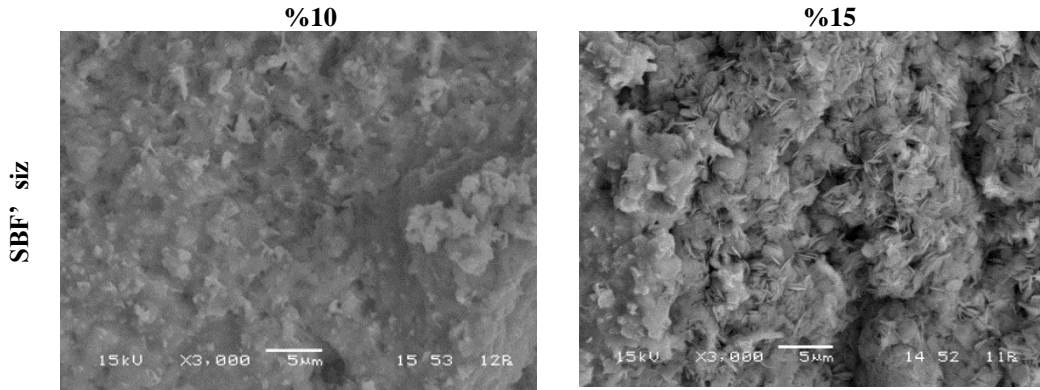
5.2. SEM-EDS GÖRÜNTÜ ANALİZİ

Şekil 5.5'te %10 ve %15 doluluk oranındaki kemik yapı iskelelerinin yaklaşık aralık boyutları 900 ve 500 μm olarak belirlenmiştir. Kemik yapı iskeleleri, apatit kümelerinin oluşumunu görselleştirmek için SEM kullanılarak karakterize edilmiştir.



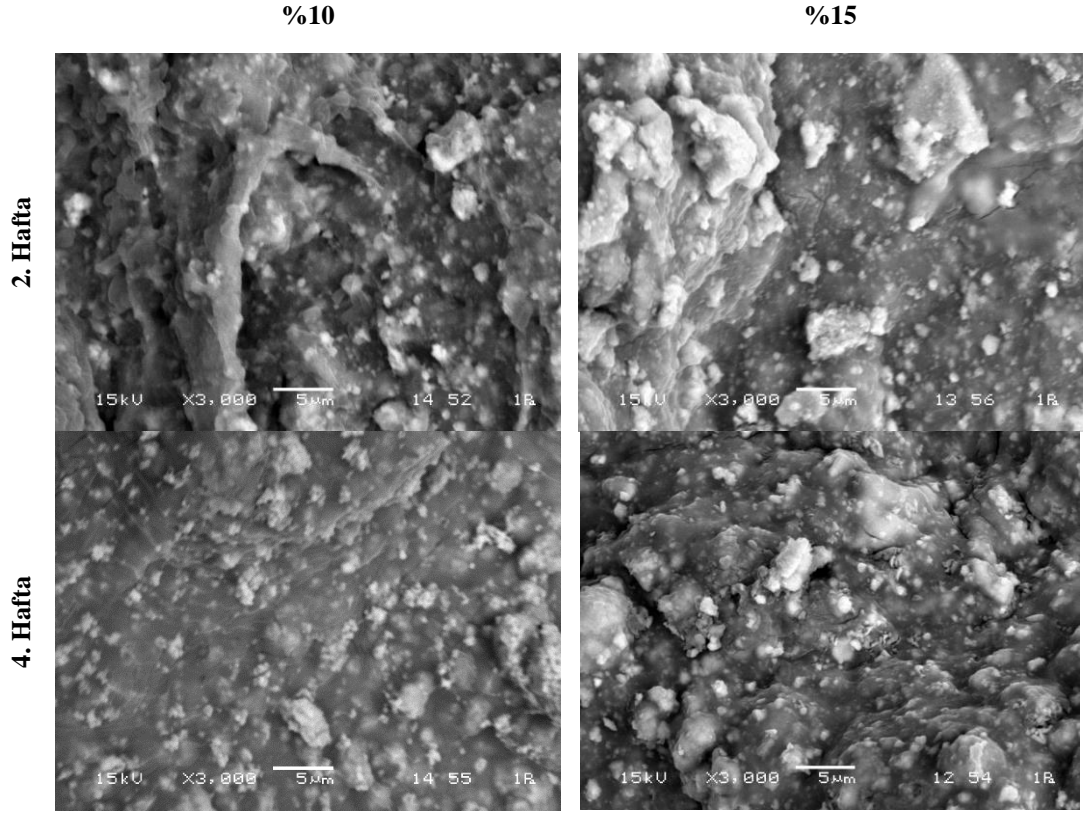
Şekil 5.5. (a) %10, (b) %15 doluluk oranlı kemik yapı iskeleleri SEM görüntüsü.

Apatit kümelerinin in vitro biyoaktivite görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 5.6. CSHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF'siz %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.

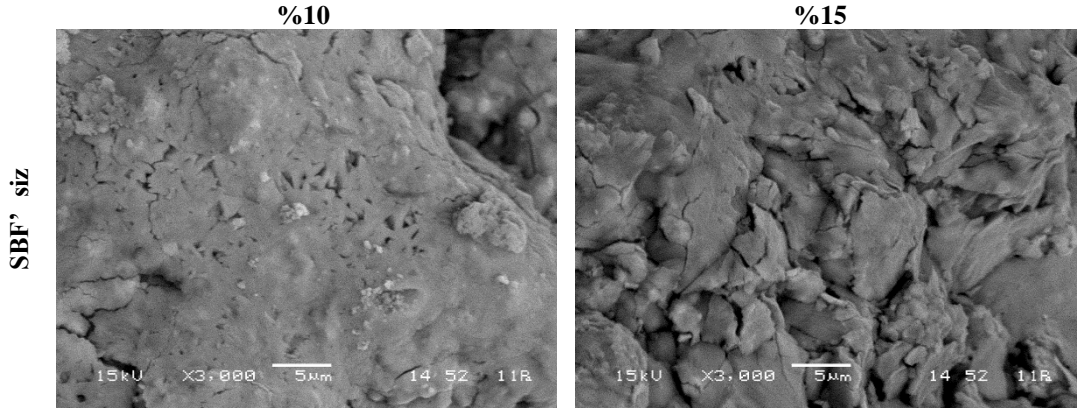
CSHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin %10- %15 doluluk oranlı 2 ve 4 hafta SBF'de bekletildikten sonraki SEM görüntüleri Şekil 5.7'de verilmiştir.



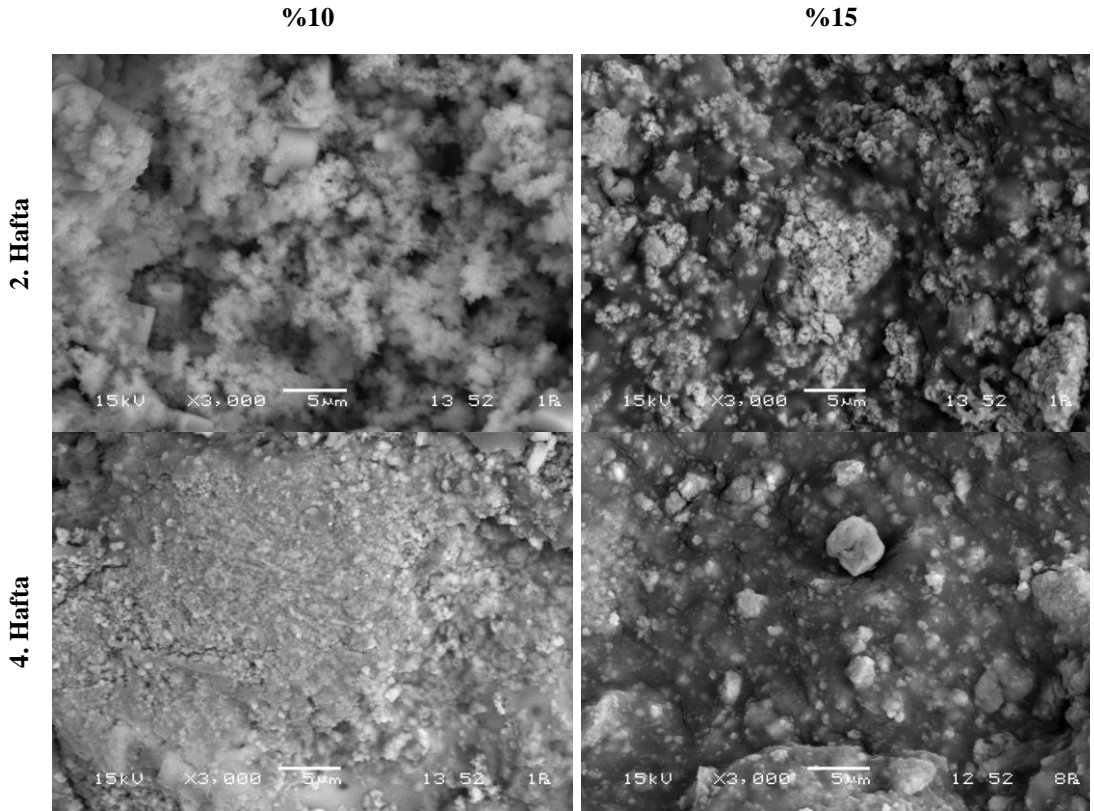
Şekil 5.7. CSHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin 2 ve 4 hafta SBF’de bekletilen %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.

Şekil 5.7 incelendiğinde, CSHA+MgO mürekkebinin kemik yapı iskelesinin 2 ve 4 haftalık SBF’de bekletilmiş numune ile farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir. 2 haftalık Ca/P oranı, %10 doluluk oranında 1,22 ve %15 doluluk oranında 1,13 çıkmıştır. 4 haftalık Ca/P oranı, %10 doluluk oranında 1,56 ve %15 doluluk oranında 0,64 çıkmıştır. 4 haftalık %10 ve %15 doluluk oranlarından çıkan Ca/P sonucu karşılaştırıldığında %10’luk doluluk oranlı kemik yapı iskelesinde apatit öbekenme kümelenmesinin fazla olduğu görülmüştür.

SHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF’siz, 2 ve 4 haftalık %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 5.8. SHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF'siz %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.

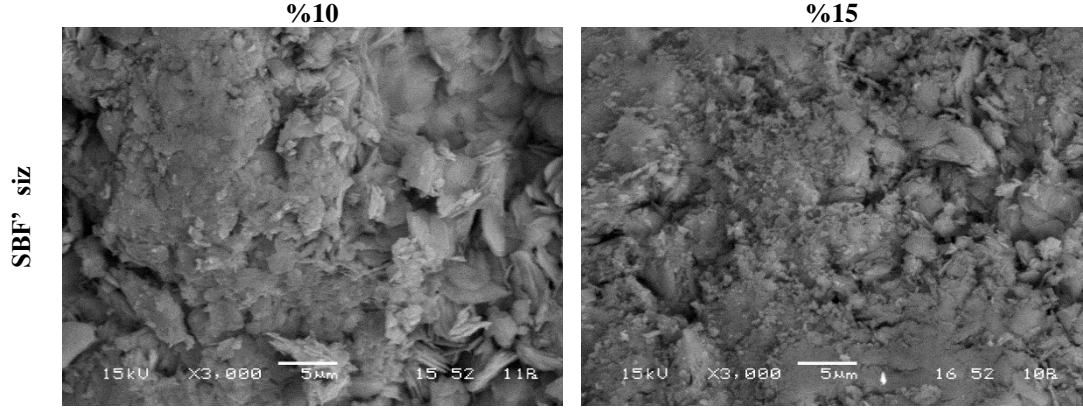


Şekil 5.9. SHA+MgO mürekkebi kemik yapı iskelesinin 2 ve 4 hafta SBF'de bekletilen %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.

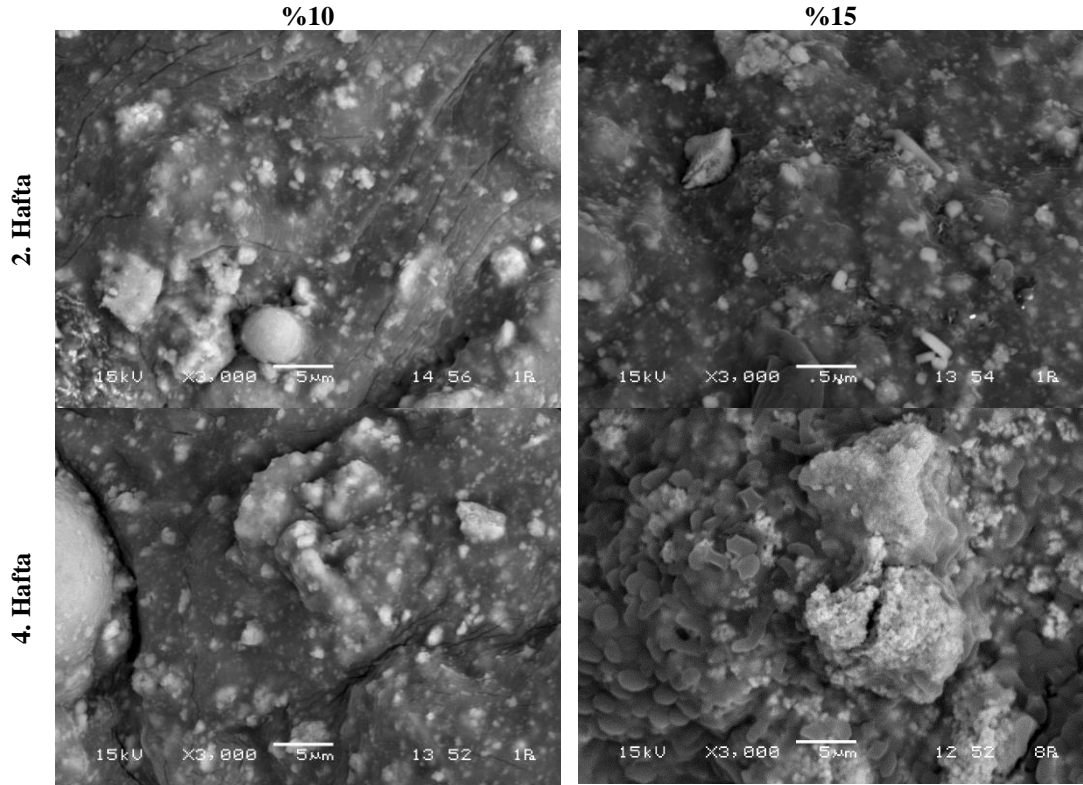
Şekil 5.9 incelendiğinde, 2 haftalık Ca/P oranı, %10 doluluk oranında 1,28 ve %15 doluluk oranında 1,4 çıkmıştır. 4 haftalık Ca/P oranı, %10 doluluk oranında 1,57 ve %15 doluluk oranında 1,56 çıkmıştır. 4 haftalık %10 ve %15 doluluk oranlarının Ca/P

değerleri karşılaştırıldığında HA değeri olan 1,67'ye yakın sonuçta ve benzer öbekenme kümelenmesinin olduğu görülmüştür.

CSHA+Al₂O₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF'siz, 2 ve 4 haftalık %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



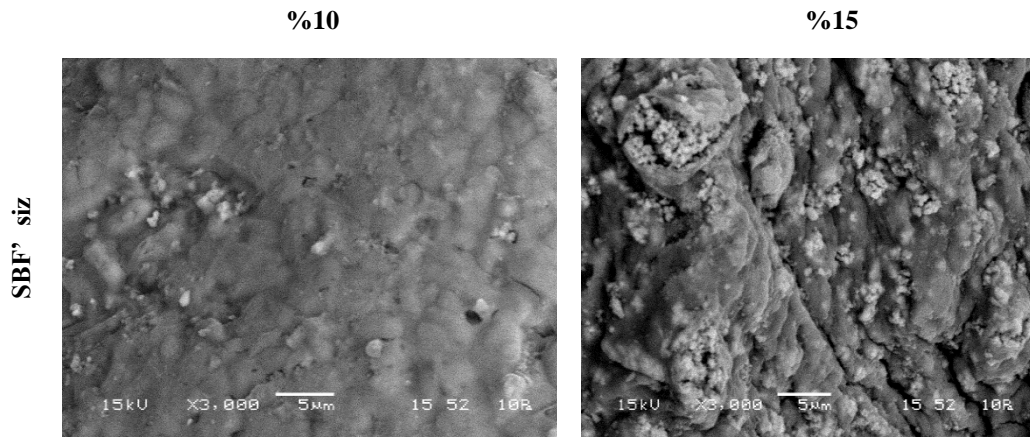
Şekil 5.10. CSHA+Al₂O₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF'siz %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.



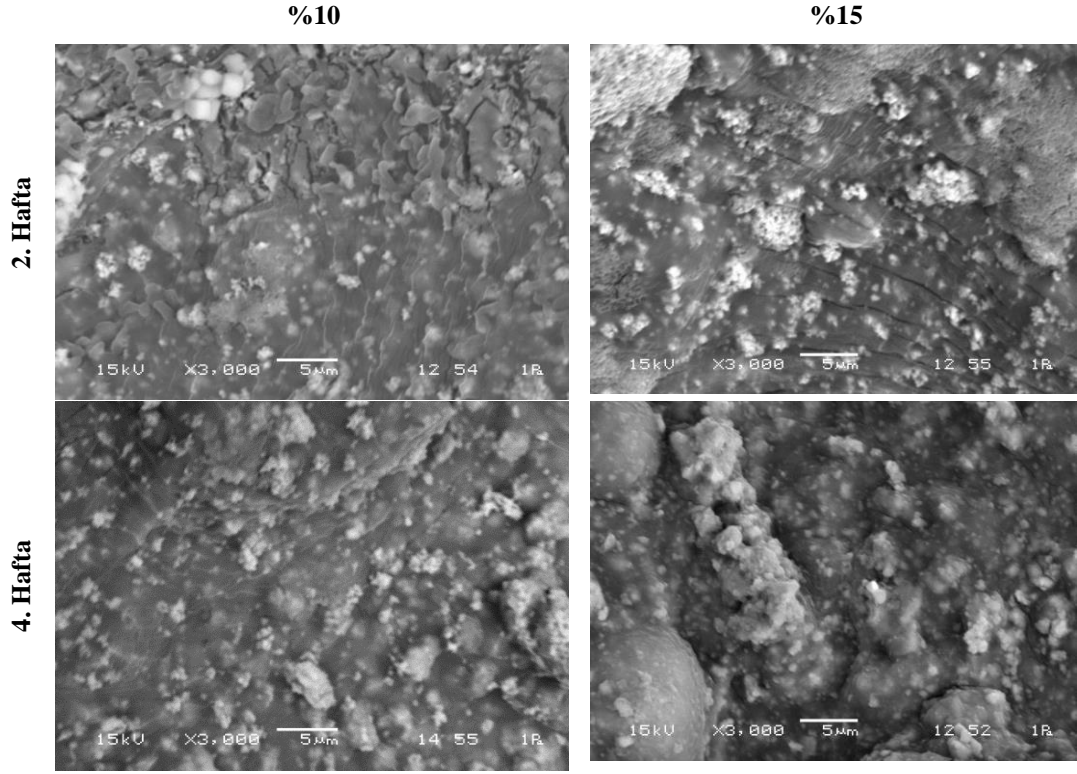
Şekil 5.11. CSHA+Al₂O₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin 2 ve 4 hafta SBF'de bekletilen %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.

Şekil 5.11 incelendiğinde, 2 haftalık Ca/P oranı, %10 doluluk oranında 1,12 ve %15 doluluk oranında 1,2 çıkmıştır. 4 haftalık Ca/P oranı, %10 doluluk oranında 2,20 ve %15 doluluk oranında 1,03 çıkmıştır. 4 haftalık %10 ve %15 doluluk oranları karşılaştırıldığında %10'luk doluluk oranlı kemik yapı iskelesinde kemiğe yakın değerde öbekenme kümelenmesinin fazla olduğu görülmüştür.

SHA+Al₂O₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF'siz, 2 ve 4 haftalık %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 5.12. SHA+Al₂O₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin SBF'siz %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.



Şekil 5.13. SHA+Al₂O₃ mürekkebi kemik yapı iskelesinin 2 ve 4 hafta SBF’de bekletilen %10- %15 doluluk oranlı SEM görüntüsü.

Şekil 5.13 incelendiğinde, 2 haftalık Ca/P oranı, %10 doluluk oranında 1,13 ve %15 doluluk oranında 1,22 çıkmıştır. 4 haftalık Ca/P oranı, %10 doluluk oranında 0,71 ve %15 doluluk oranında 0,68 çıkmıştır. 4 haftalık %10 ve %15 doluluk oranları karşılaştırıldığında %10’luk doluluk oranlı kemik yapı iskelesinde öbekenme kümelenmesinin 2 haftalıklara göre azalma olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.1. Karışımların kemik yapı iskelelerinin 4 haftalık %10 doluluk oranlı EDS analizleri.

Element	CSHA+MgO Kemik yapı iskelesi		SHA+MgO Kemik yapı iskelesi		CSHA+Al ₂ O ₃ Kemik yapı iskelesi		SHA+Al ₂ O ₃ Kemik yapı iskelesi	
	Ağırlık [%]	Atom [%]	Ağırlık [%]	Atom [%]	Ağırlık [%]	Atom [%]	Ağırlık [%]	Atom [%]
C	16,72	29,90					15,41	27,13
O	25,12	33,72	15,82	29,32	8,38	17,26	11,90	15,73
Na	5,91	5,53	4,38	5,65	2,37	3,39	42,38	38,99
P	14,87	10,31	22,99	22,02	20,88	22,21	2,76	1,88
Cl	7,28	4,41	9,87	8,26	8,82	8,20	25,03	14,93
Ca	30,10	16,13	46,93	34,74	59,55	48,94	2,54	1,34
Ca/P	2,02	1,56	2,04	1,57	2,85	2,20	0,92	0,71

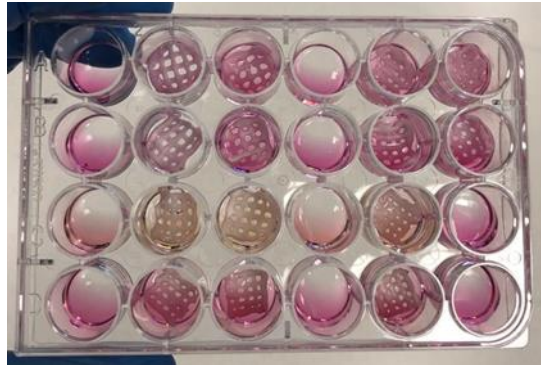
Çizelge 5.2. Karışımların kemik yapı iskelelerinin 4 haftalık %15 doluluk oranlı EDS analizleri.

Element	CSHA+MgO Kemik yapı iskelesi		SHA+MgO Kemik yapı iskelesi		CSHA+Al ₂ O ₃ Kemik yapı iskelesi		SHA+Al ₂ O ₃ Kemik yapı iskelesi	
	Ağırlık [%]	Atom [%]	Ağırlık [%]	Atom [%]	Ağırlık [%]	Atom [%]	Ağırlık [%]	Atom [%]
C	31,92	41,92	61,90	19,586	16,36	29,67	24,78	37,81
O	49,11	48,41	148,74	42,330	8,21	11,18	26,24	30,05
Na	4,45	3,05	59,69	5,445	38,44	36,43	23,90	19,05
P	7,23	3,68	159,15	10,148	1,38	0,97	5,31	3,14
Cl	1,33	0,59	73,82	5,344	33,76	20,75	15,09	7,80
Ca	5,96	2,35	176,15	15,807	1,84	1,00	4,69	2,14
Ca/P	0,82	0,64	1,11	1,56	1,33	1,03	0,88	0,68

İnsan vücudunda kalsiyumdan sonra en fazla bulunan kimyasal element fosfordur. İnsan vücudu kemik ve diş oluşumu için fosfora ihtiyaç duymaktadır. HA tabakasının oluşması için öncelikle Ca/P oranının 1,67 ve üzerinde olması gerekmektedir [91]. 4 hafta %10 doluluk oranında olan CSHA+MgO, SHA+ MgO, CSHA+Al₂O₃ kemik yapı iskeleleri Ca/P>1,67 değerinin üzerinde çıkmıştır ve kemiğe benzer yapıda apatit oluşmuştur. %15 dolulukta tüm kemik yapı iskelesi Ca/P oranının 1,67'den düşük olması kemik yapı iskelelerinin kemiğe benzer dokular oluşturmadığı belirlenmiştir.

5.3. MTT SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ

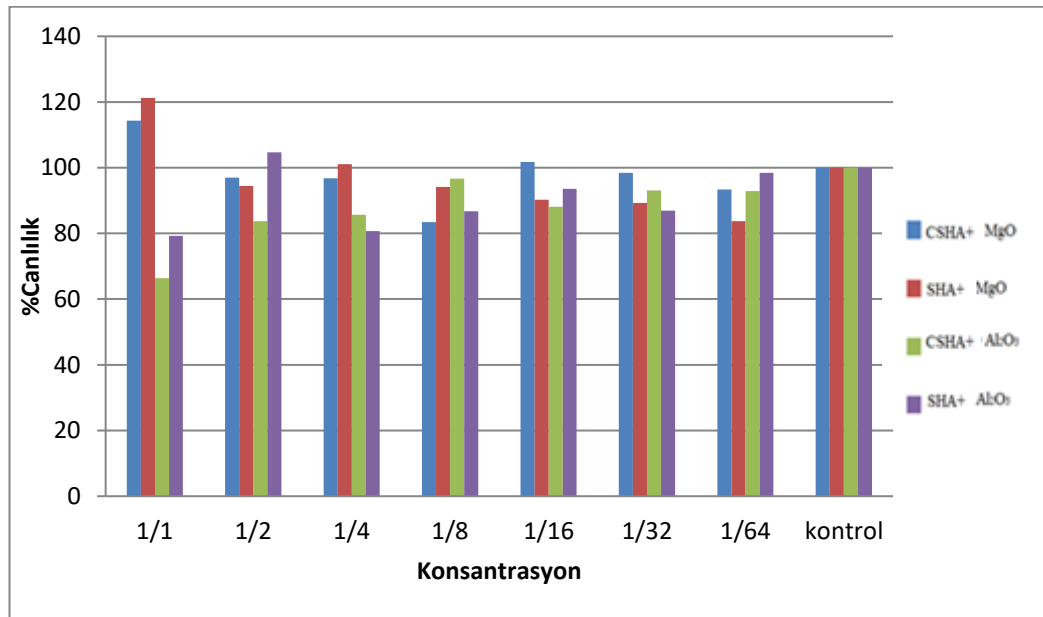
Sitotoksosite test analizinde numunelere özütleme işlemi yapılmıştır; %10 serumlu hücre kültürü ortamı içerisinde 24 sa, 37° C'de, 50 rpm hızda salınım yapan su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra özütleme sonlandırılarak elde edilen özüt 24 saat içinde kullanılmıştır [92,93].



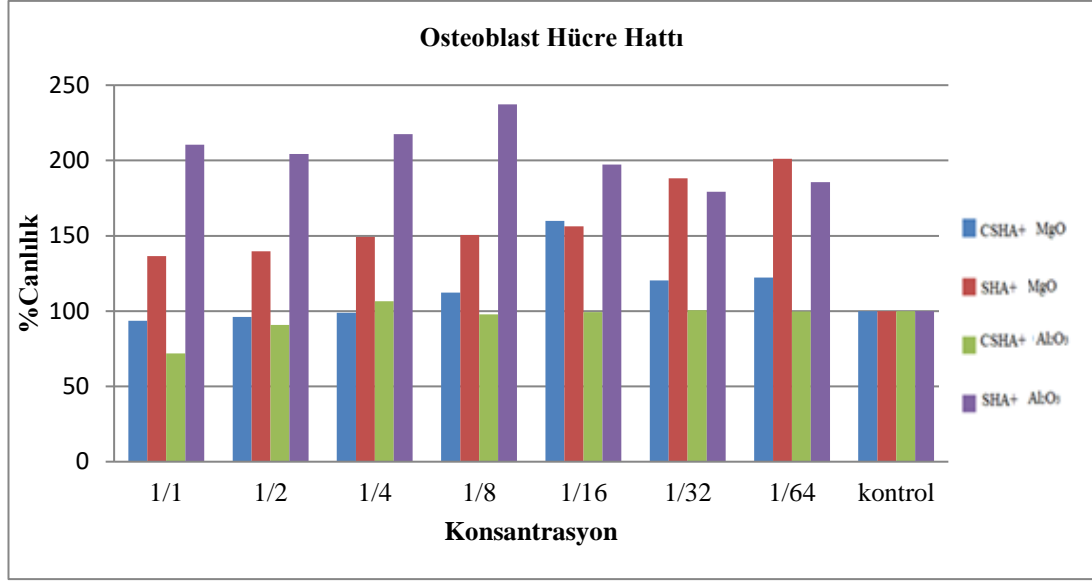
Şekil 5.14. Kuyucuklu plaka.

Nitel Değerlendirmede, hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilerek konfluent hale gelmesi beklenmiştir. Daha sonra, 37°C, %5 CO₂ etüvde 24 saat boyunca negatif, pozitif kontrol ve numune özütlerine maruz bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler mikroskopik olarak incelenmiştir.

Nicel Değerlendirmede, 96 kuyucuklu plakalara 10000 hücre/kuyucuk olarak sayılarak ekilen hücreler 24 saat inkübe edilerek %80 konfluensi sağlanmıştır. Daha sonra hücreler, numune özütünün 1/1 – 1/64 arasındaki dilüsyonlarına 24 saat süresince maruz bırakılmıştır. Süreç sonunda 1 mg/mL olarak hazırlanan MTT kuyucuklara eklenerek plakalar 3 saat, 37° C, % 5 CO₂ etüvde bekletilmiştir. Deney, kuyucuklara isopropil alkol eklenerek sonlandırılarak plakalarda oluşan renk değişikliği spektrofotometrede (570nm) ölçülerek % canlılık değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 5.15. Konsantrasyona bağlı L929 fare fibroblast hücre hattında % canlılık grafiği.

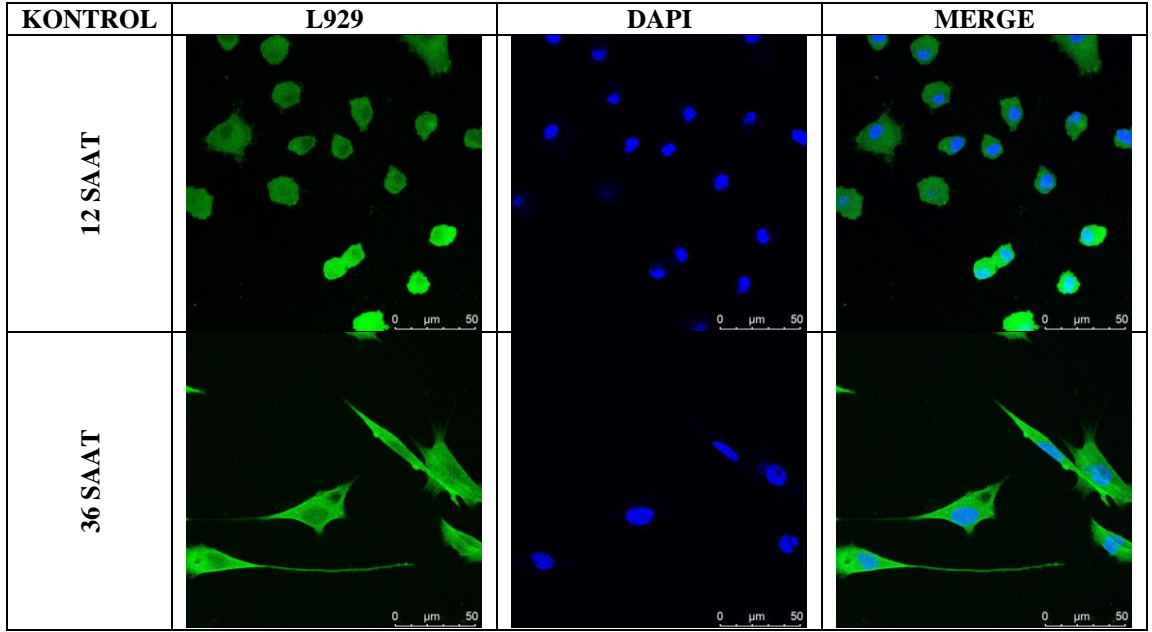


Şekil 5.16. Konsantrasyona bağlı osteoblast hücre hattında % canlılık grafiği.

Nicel değerlendirme metodu olarak “TS EN ISO 10993-5/ Ekim-2010- EK-C MTT Sitotoksosite Deneyi” kullanılmış olup elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Testlerde kullanılan negatif ve pozitif kontrollerden alınan sonuçlarda test geçerlilik kriterlerinin sağlandığı görülmüştür. Standartta belirtilen %70 üzeri sonuçlar ile test kabul kriterleri sağlanmış olduğundan geçerlidir. Tüm veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak da sunulmuştur. Anlamlılığı test etmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Kemik yapı iskelelerinde MTT analizi 24 saatte yapılmıştır. MTT testi kullanılarak, kontrol hücrelere göre hücrelerin canlılık oranlarının istatistiksel anlamlılığı belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık oranı 0,05 olarak tanımlanmıştır. Fibroblast hücre hattı konsantrasyonlarında 1 ve 2 nolu kemik yapı iskelelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0.05$). 3 ve 4 nolu kemik yapı iskelelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0.05$) [94]. Osteoblast hücre hattı konsantrasyonlarında 1 ve 2 nolu kemik yapı iskelelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0.05$). 3 ve 4 nolu kemik yapı iskelelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0.05$) [95]. Bu çalışmanın sonuçlarına göre test edilen kemik yapı iskeleleri standartta belirtilen test kabul kriterleri karşılandığından in-vivo ve in-vitro çalışmalarda kemik yapı iskelelerinin kullanılması uygun olabildiği düşünülmüştür. Bu çalışmanın daha detaylı hücre kültür testleri ve klinik testler ile desteklenmesi gerekmektedir.

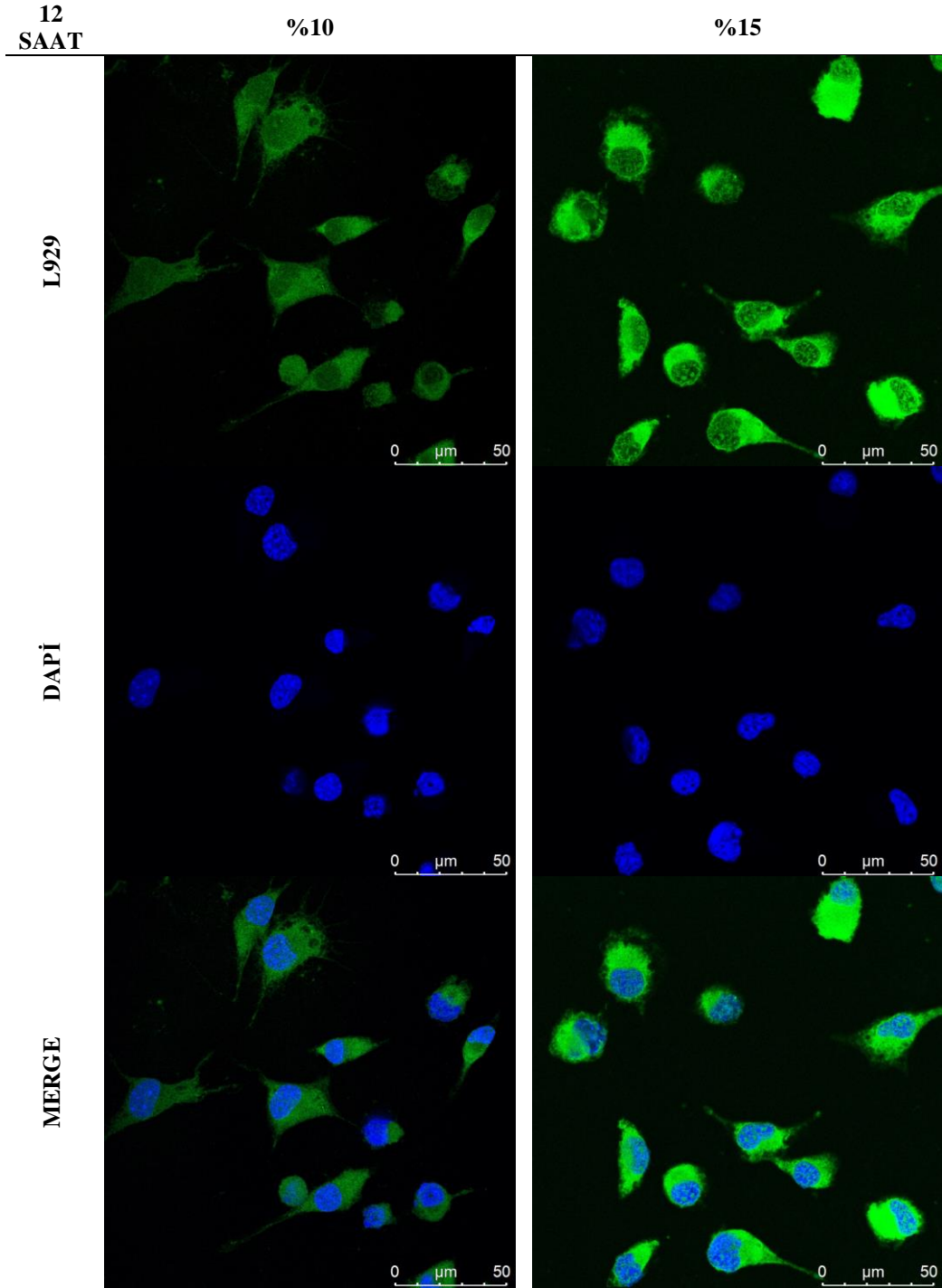
5.4. KONFOKAL MİKROSKOP ANALİZİ

Hazırlanan biyomürekkeplerin kemik yapı iskelelerinin falkonlara konularak kapağın sızdırmazlığını sağlayarak 20 dakika boyunca otoklavda bekletilmiş ve steril hale getirilmiştir. 12 ve 32 saat boyunca L929 fare fibroblast hücre hattı, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri (0-50µm) aşağıdaki şekillerde verilmiştir [96].



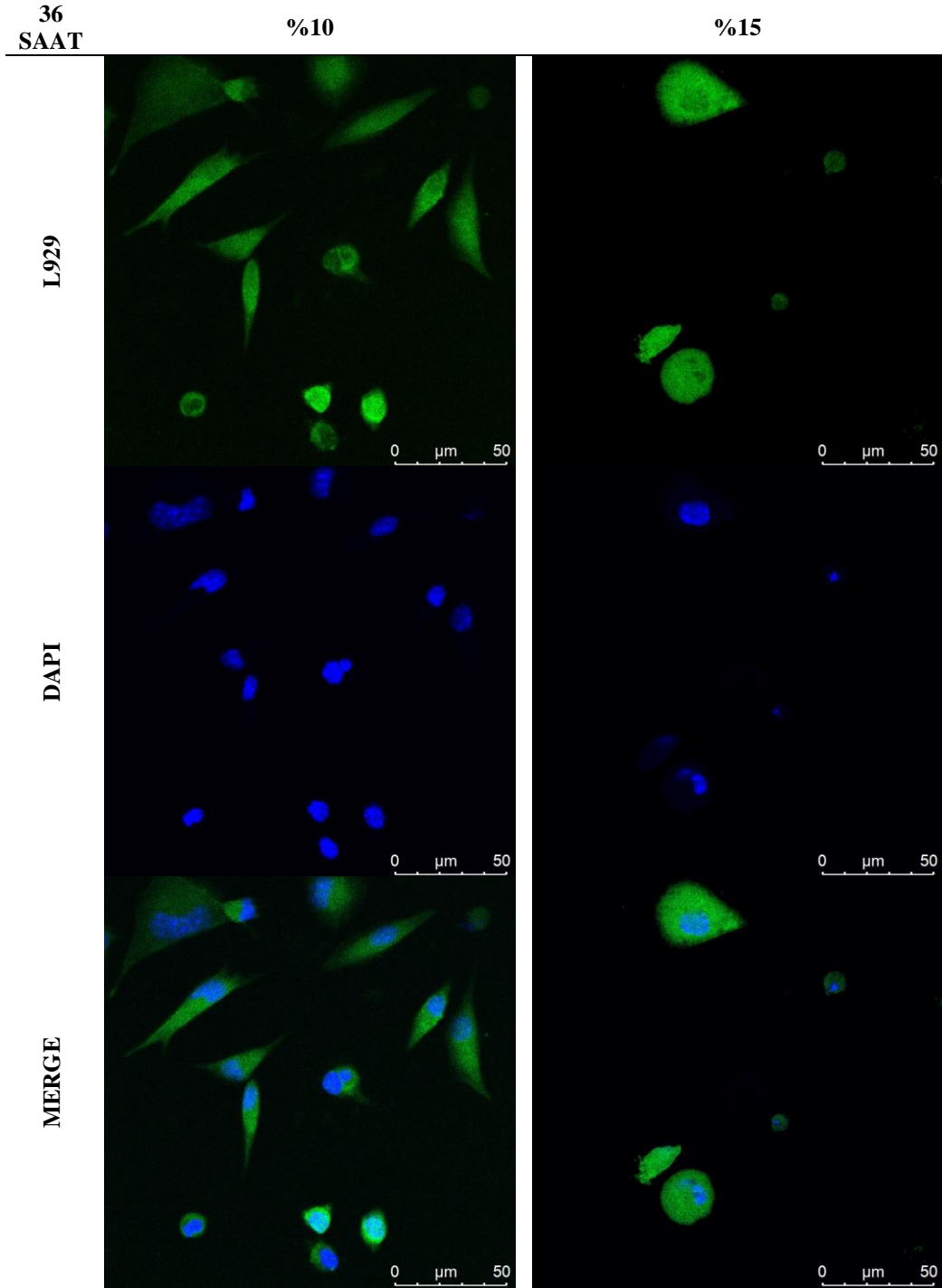
Şekil 5.17. Kemik yapı iskelelerinin 12 ve 32 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskoptaki kontrol grubu görüntüleri.

CSHA+MgO biyomürekkep kemik yapı iskelesinin 12 ve 32 saatlik L929 fare fibroblast hücre hattı, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.



Şekil 5.18. CSHA+MgO biyomürekkebin 12 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.

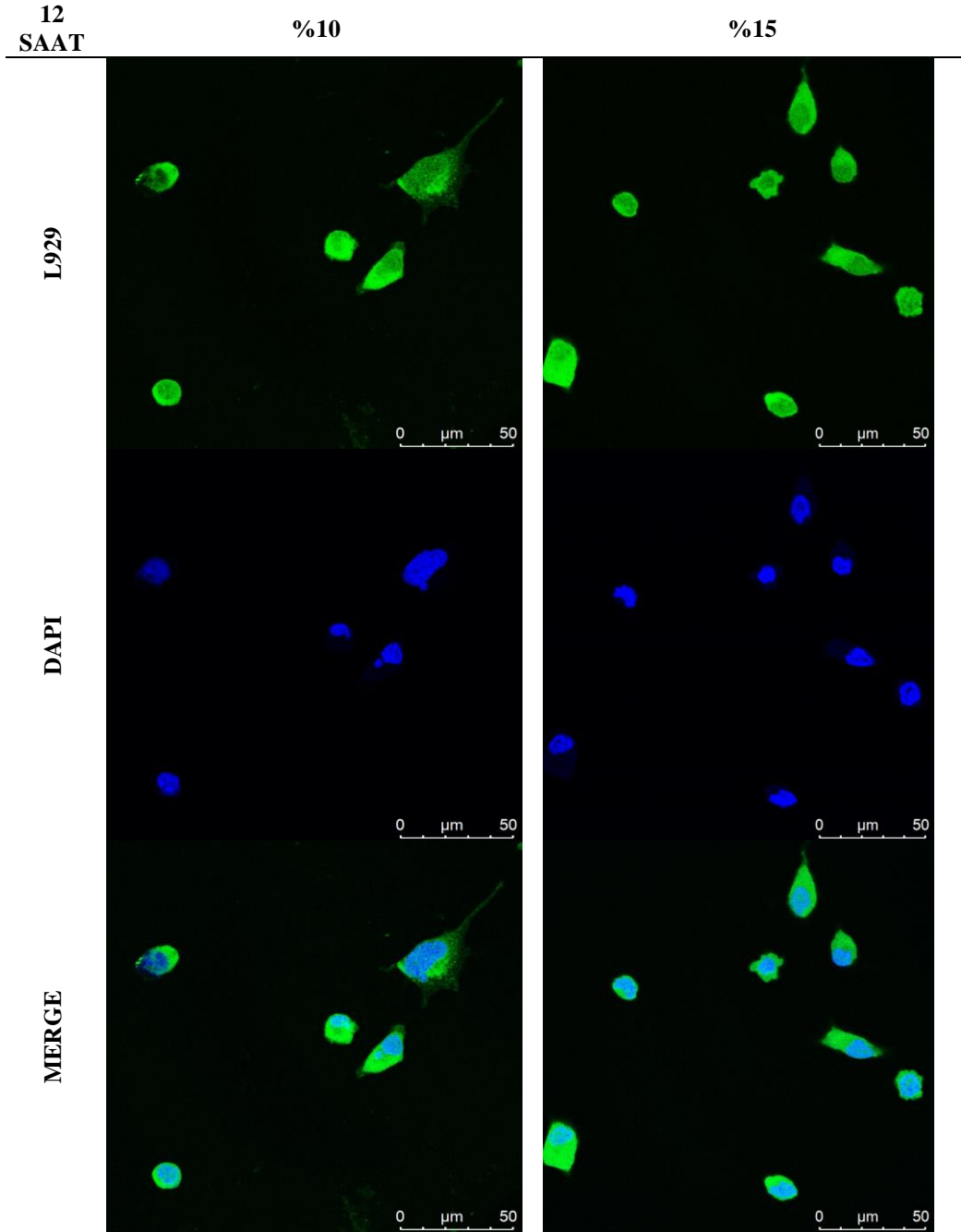
CSHA+MgO biyomürekkep kemik yapı iskelesinin %10 ve %15 doluluk oranlarındaki hücre canlılığı karşılaştırıldığında %10 doluluk oranlarındaki hücre canlılığı ağ yapısı gelişmekte ve canlılığın olumlu yönde ilerlediği görülmüştür.



Şekil 5.19. CSHA+MgO biyomürekkebin 36 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.

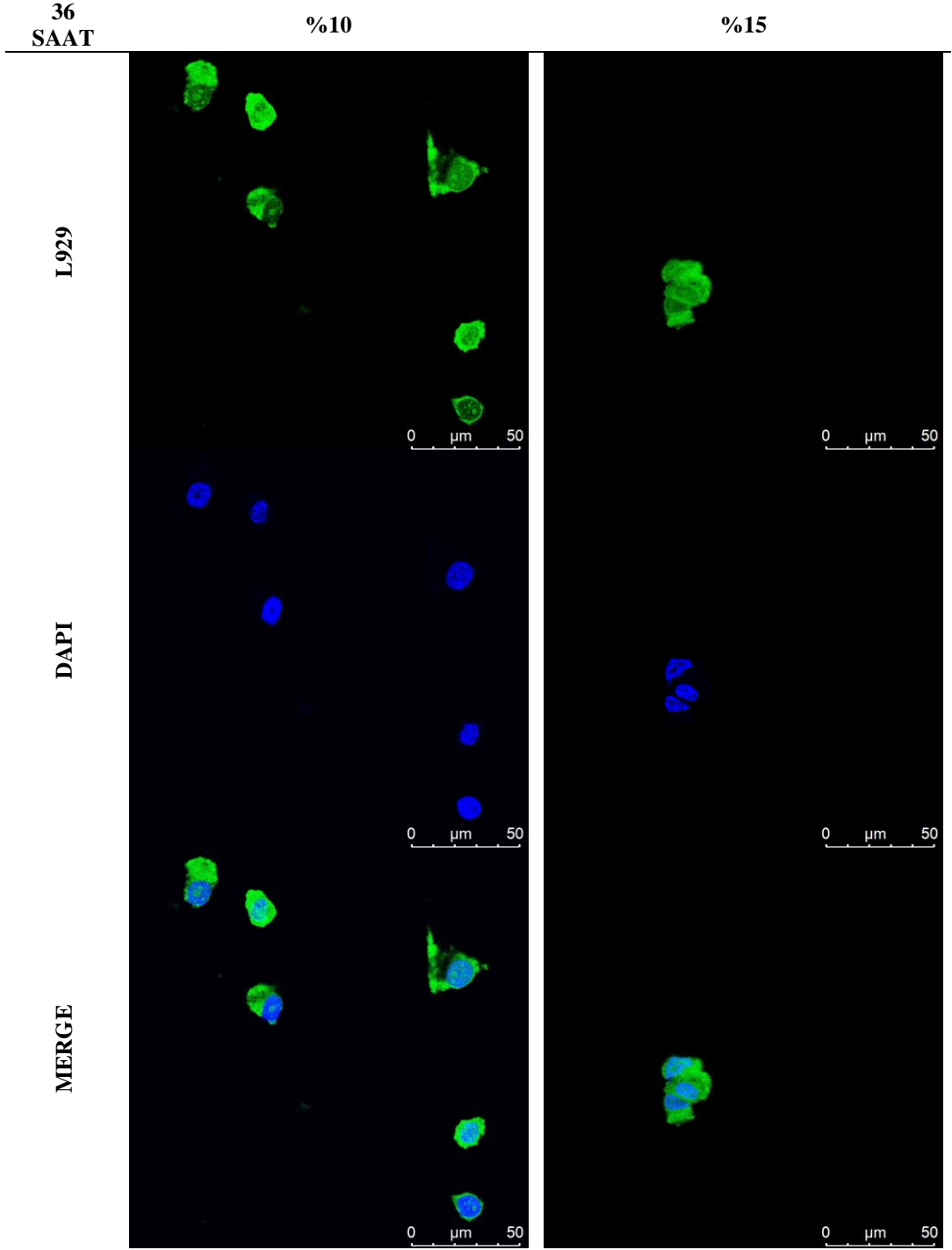
CSHA+MgO biyomürekkebin 36 saat sonunda %10 doluluk oranlı kemik yapı iskelesinde ağ yapısında olduğu ve hücrelerin geliştiği görülmüştür.

SHA+MgO biyomürekkep kemik yapı iskelesinin 12 ve 32 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



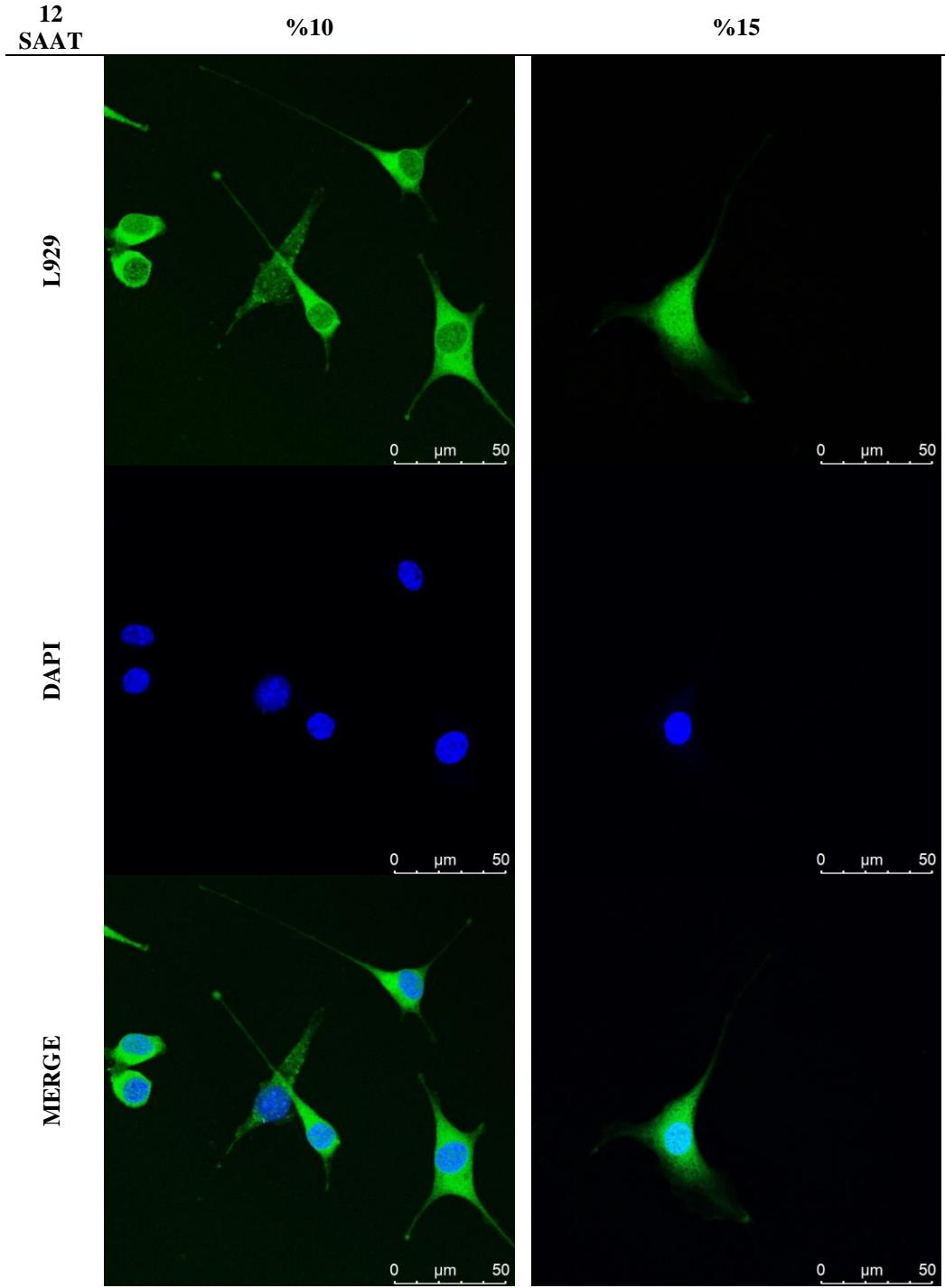
Şekil 5.20. SHA+MgO biyomürekkebin 12 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.

12 saat sonunda %10 doluluk oranlı kemik yapı iskelesindeki hücrelerdeki ağ yapısı başlangıcı görülmüştür.

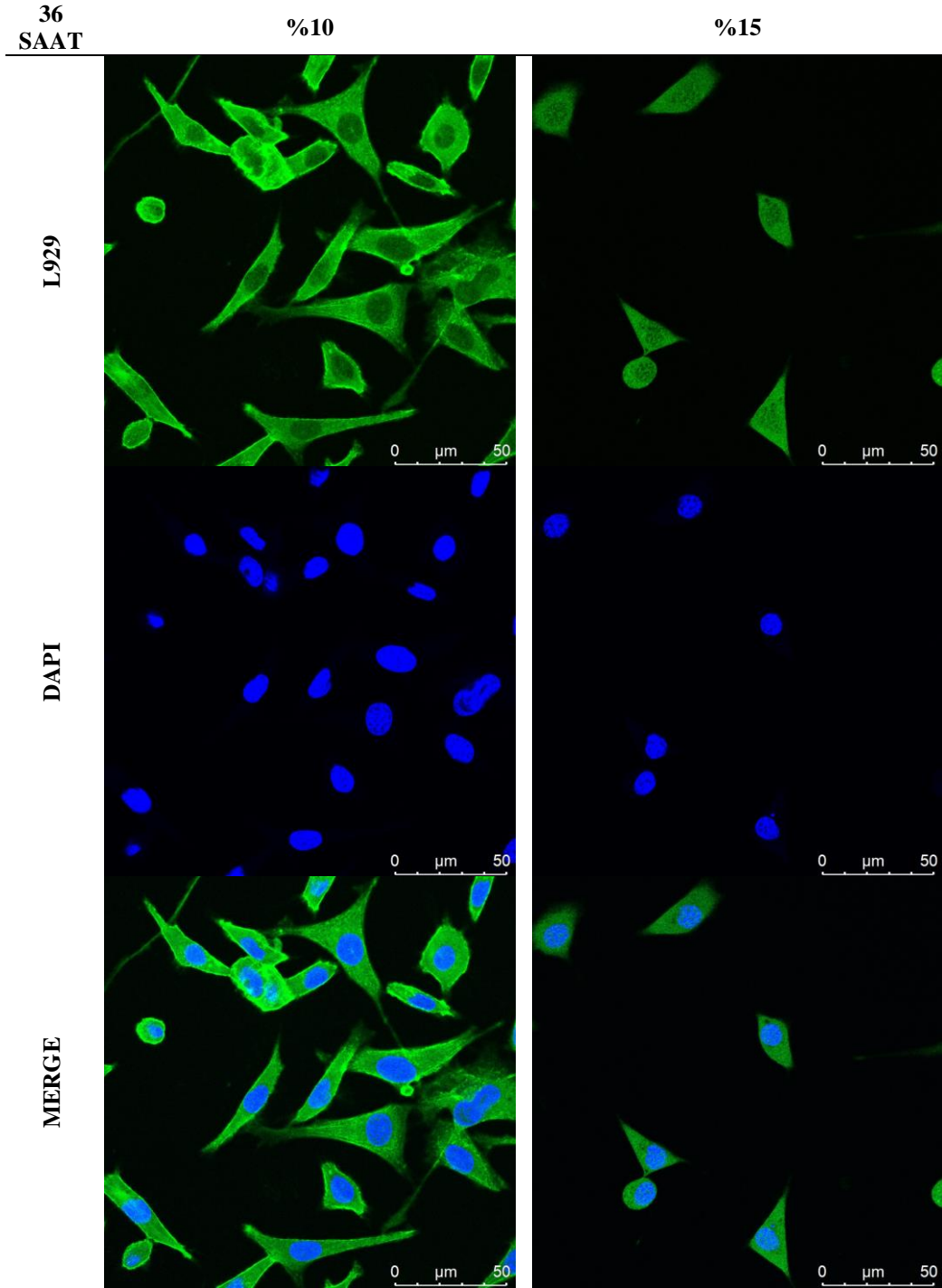


Şekil 5.21. SHA+MgO kemik yapı iskelesinin 36 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.

36 saat sonunda ise 12 saatten farklı bir hücre gelişmesi gözlemlenmemiştir. 3 nolu karışım olan CSHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinin 12 ve 32 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 5.22. CSHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinin 12 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.

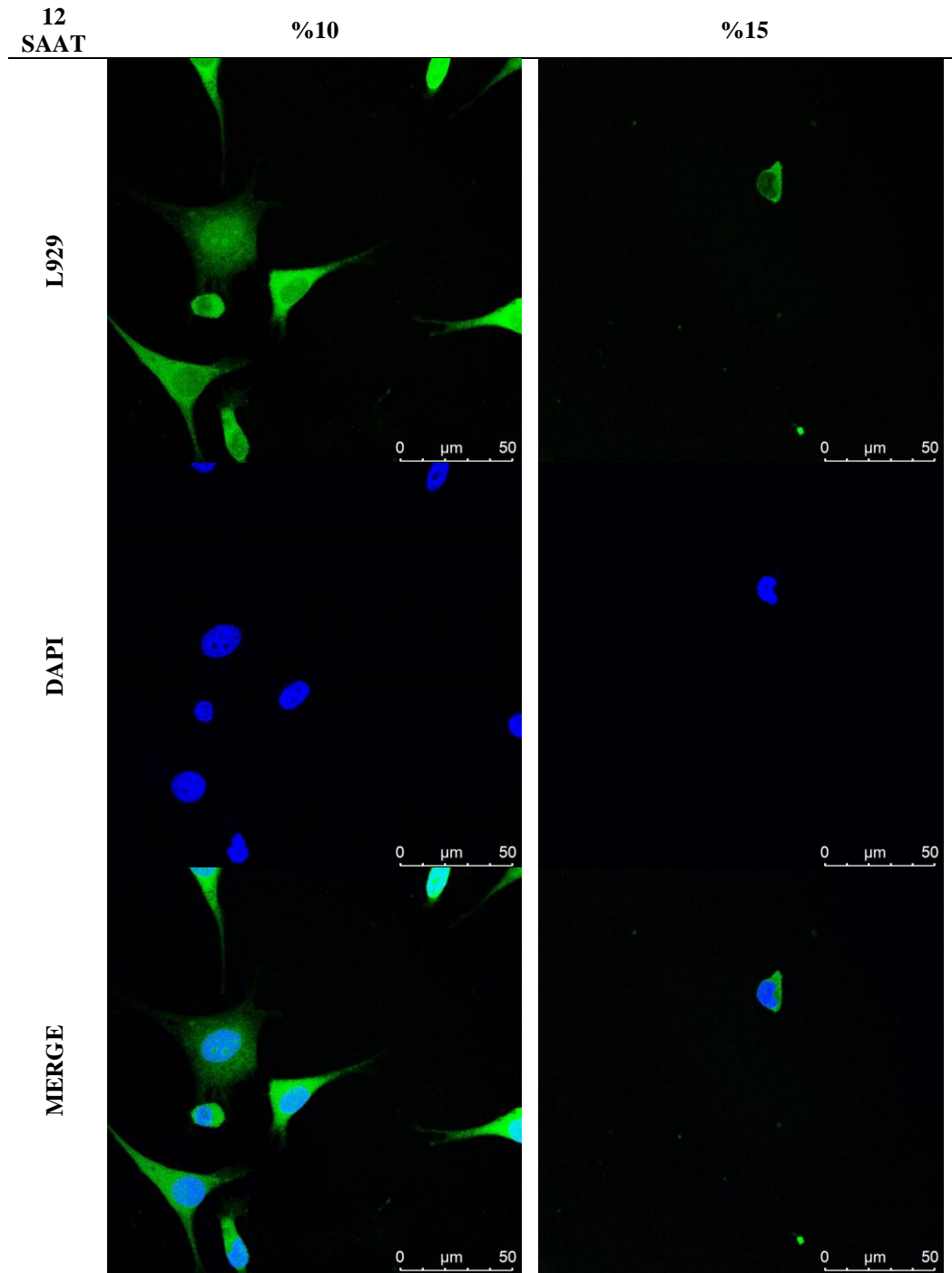


Şekil 5.23. CSHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinin 36 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.

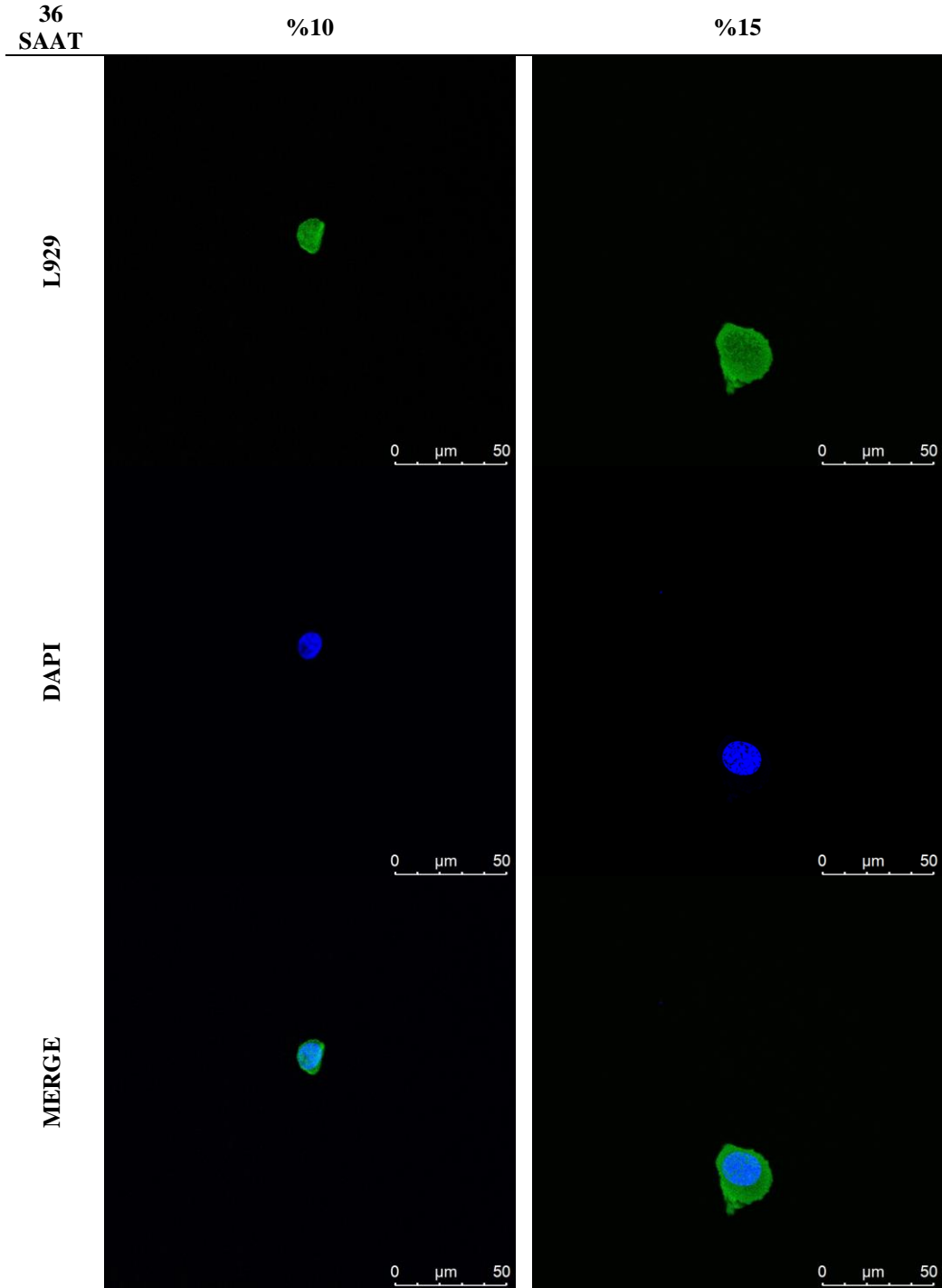
En belirgin hücre çoğalması ve ağ yapısının oluşması 12 saat sonunda diğer üç karışımın kemik yapı iskelesine göre CSHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinde %10 ve %15 doluluk oranda görülmüştür. 36 saat sonunda iki oran karşılaştırıldığında %10

doluluk oranlı kemik yapı iskelesi oldukça belirgin hücre çoğalması ve ağ yapısının çoğaldığı görülmüştür.

SHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinin 12 ve 32 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 5.24. SHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinin 12 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.



Şekil 5.25. SHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinin 36 saatlik L929, DAPI ve MERGE konfokal mikroskop görüntüleri.

SHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinin 12 saatte hücrelerin ağ yapısı oluşmasına karşın 36 saat sonunda bu yapı giderek azalmıştır.

Cao ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarında Polycaprolactone (PCL), poly(ethylene glycol) (PEG) ve %75-%90 (w/t) içeren HA kullanmışlardır. HA gözenekli yapı olduğundan %70 ve %90 karşılaştırıldığında; Tutarlı bir şekilde, %72'lik iskelelere kıyasla %90'lık iskelelerin desteklerine daha fazla hücre sızdığı gözlemlenmiştir. %90 HA içeren biyomürekkebin %72 HA kemik yapı iskelelerin göre daha gözenekli olmasının muhtemel neden olduğunu düşünmüşlerdir [96]. Belirlenen sonuç doğrultusunda kemik yapı iskelelerinin HA yapısında var olan gözenekliliklerin yoğun olması hücre çoğalmasında en büyük etken olduğu [23,24,25,26,46,48,49], buna ek olarak kemik yapı iskelesinin yüzey alanının büyüklüğü hücrelerin oksijen alışverişi ve hücre çoğalmasını sağlayacağını düşünmüşlerdir.

Falloidin boyama tekniği ile hücre canlılığının belirlenmesi için konfokal mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması sonucunda CSHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinin 12 ve 36 saat sonucunda hücre çoğalması ve ağ yapısının oluşması daha belirgin olması hem gözeneklerinin geniş yüzey alana dağılması ve hücre canlılığını koruması hem de takviye malzemesi olan Al₂O₃ ve CSHA biyomalzemelerinin hücre çoğalmasına daha uygun olduğunu bu karışımın deneylerde kullanılabilirliği öngörülmüştür.

BÖLÜM 6

SONUÇLAR

Tasarlanan ve üretilen biyoyazıcının baskı parametrelerinin uygunluğu ve kullanılabilirliği bu çalışma ile doğrulanmıştır.

1. Biyoyazıcının biyobaskı esnasında titreşimini engelleyecek tasarım yapılmıştır.
2. Şırıngadaki biyomürekkebin 0,41 μm iç çapındaki konik yapılı iğne kullanılarak uygun baskı yapılmıştır.
3. Biyobaskının kuvvetini arttırabilmek için iki step motoru kullanılmasının uygun olduğu belirlenmiştir.
4. Baskı hızı (400 mm/s) ve X,Y,Z koordinat hareketleri kemik yapı iskelesinin basılabilirliğine uygun olarak ayarlanmıştır.
5. Vücutla uyumlu biyomalzemeler olan; sentetik hidroksiapatit (CSHA), koyun hidroksiapatit (SHA), magnezyum oksit (MgO), alümina (Al_2O_3) ve sodyum aljinat kullanılmıştır. CSHA ve SHA'ya ağırlıkça %10 w/v MgO ve Al_2O_3 eklenmiştir. Bu karışıma sodyum aljinat ve distile su eklenerek dört farklı karışımda biyomürekkep elde edilmiştir.
6. Biyobaskılanabilir biyomürekkebin viskozitesi bir Reometre cihazı ile ölçülmüştür. Tüm biyomürekkeplerin Şekil 5.2'de 450s zamanındaki veriler karşılaştığında aralığında CSHA+MgO (31,292), CSHA+ Al_2O_3 (30,505 Pa.s), SHA+MgO (29,184 Pa.s), SHA+ Al_2O_3 (24,162 Pa.s) değerleri çıkmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda baskı esnasında malzemenin belirli hız ve sıcaklıkta

ilerlemesi malzemenin viskozitesinde azalma oluşturduğu fakat kesme gerilmesinden etkilenmediği görülmüştür. Böylece baskı esnasında tüm biyomürekkeplerde kopma meydana gelmemiş ve kararlı süreklilikte baskı oluşturulmuştur.

7. Kemik dokusu iskeleleri yapay vücut sıvısında (SBF) daldırılma yöntemi ile 2 ve 4 hafta bekletildikten sonra Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ile görüntüleri çekilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde, 4 hafta SBF’de bekletilen %10 doluluk oranlı CSHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelesinin Şekil 5.11’de apatit yoğunluğunda kümelenme gözlemlenmiş ve Ca/P oranının 2,85 olması kemik oluşumunun olumlu olabileceğini göstermiştir.
8. Kemik dokusu iskelelerine Nicel değerlendirme için TS EN ISO 10993-5/ Ekim-2010- EK-C MTT Sitotoksitlik Testi standardı kullanılarak MTT testi uygulanmıştır. Kemik yapı iskeleleri 24 saat boyunca L929 fare hücre hattında ve Osteoblast hücre hattında tutularak mikroskopik olarak incelenmiştir. Hücrelerin %70’inden fazlası kemik dokusu iskelelerinde çoğaldığı için geçerlilik kriterlerini karşılamış ve vücut üzerinde sitotoksik bir etki olmadığı tespit edilmiştir.
9. MTT testinde tüm kemik yapı iskelelerinin laboratuvar çalışmalarında kullanılması uygun olabileceği öngörülmüştür.
10. L929 fare hücre hattı kullanılarak hücre canlılığının belirlenmesi için konfokal mikroskop görüntüleri 12 ve 36 saatlik hücre kültürü sonuçlarında %10 doluluk oranlı kemik yapı iskelesinin CSHA ve Al₂O₃ biyomalzemelerinin diğer biyomürekkeplere göre hücre çoğalma eğiliminin en yüksek olduğu ve kemik hücre ağına benzer sonuçlar elde edildiğinden çalışmalarda kullanılabilir olabileceği düşünülmektedir.
11. Belirgin hücre çoğalmasında CSHA+Al₂O₃ kemik yapı iskelelerin desteklerine daha fazla hücre sızdığı gözlemlenmiş diğer yapı iskelelerine göre daha gözenekli olmasının hücre çoğalmasında muhtemel neden olduğunu

düşünülmüştür. Buna ek olarak kemik yapı iskelesinin yüzey alanının büyüklüğü hücrelerin oksijen alışverişi ve hücre çoğalmasını sağlayacağı düşünülmüştür.

12. Çıkan sonuçlarda %10 doluluk oranlı kemik yapı iskelesi ve hücre çoğalmasına elverişli olan CSHA+Al₂O₃'nın diğer karışımlara göre literatür araştırmalarında ve deney aşamalarında umut verici sonuçlar oluşturacağı düşünülmüştür.

Hem biyoyazıcı hem de biyomürekkep geliştirilerek in-vitro ve in-vivo deneylerde daha umut verici sonuçlar alınabileceği kararına varılmıştır. Bu çalışma ile literatürdeki birçok çalışma için öngörü kazandıracak sonuçlar ortaya koyulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Çelik, İ., Karakoç, F., Çakır, M. C., & Duysak, A., “Hızlı prototipleme teknolojileri ve uygulama alanları.” *Journal of Science and Technology of Dumlupınar University*, (031), 53-70 (2013).
2. Yavaşoğlu, H. A. “Bir endüstriyel taşıyıcı ve servo mekanizmalı malzeme değiştirici mobil robotun gerçekleştirilmesi ve bulanık mantık temelli çizgi takip kontrolü”, Yüksek Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul (2005).
3. Sachlos, E., et al., “Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication”, *Biomaterials* 24 (8), 1487e1497 (2003).
4. Zhang, T., Zhao, W., Xiahou, Z., Wang, X., Zhang, K., & Yin, J. (2021). “Bioink design for extrusion-based bioprinting”, *Applied Materials Today*, 25, 101227 (2021).
5. Decante, G., Costa, J. B., Silva-Correia, J., Collins, M. N., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. “Engineering bioinks for 3D bioprinting”, *Biofabrication*, 13(3), 032001 (2021).
6. Pedroza-González, S. C., Rodriguez-Salvador, M., Pérez-Benítez, B. E., Alvarez, M. M., & Trujillo-de Santiago, G. Bioinks for 3D bioprinting: a scientometric analysis of two decades of progress. *International journal of bioprinting*, 7(2) (2021).
7. Lett, J. A., Sagadevan, S., Fatimah, I., Hoque, M. E., Lokanathan, Y., Léonard, E., ... & Oh, W. C., “Recent advances in natural polymer-based hydroxyapatite scaffolds: Properties and applications”, *European Polymer Journal*, 148, 110360 (2021).
8. Zhang, P., Liu, X., Guo, P., Li, X., He, Z., Li, Z., ... & Liu, S., “Effect of cyclic mechanical loading on immunoinflammatory microenvironment in biofabricating hydroxyapatite scaffold for bone regeneration”, *Bioactive materials*, 6(10), 3097-3108 (2021).
9. Cho, Y. S., Yang, S., Choi, E., Kim, K. H., & Gwak, S. J., “Fabrication of a porous hydroxyapatite scaffold with enhanced human osteoblast-like cell response via digital light processing system and biomimetic mineralization”, *Ceramics International*, 47(24), 35134-35143 (2021).

10. Shadianlou, F., Foorginejad, A., & Yaghoubinezhad, Y. "Fabrication of zirconia/reduced graphene oxide/hydroxyapatite scaffold by rapid prototyping method and its mechanical and biocompatibility properties." *Ceramics International*, 48(5), 7031-7044 (2022).
11. Alcalá-Orozco, C. R., Mutreja, I., Cui, X., Hooper, G. J., Lim, K. S., & Woodfield, T. B. "Hybrid biofabrication of 3D osteoconductive constructs comprising Mg-based nanocomposites and cell-laden bioinks for bone repair." *Bone*, 154, 116198 (2022).
12. Al Rashid, A., Khan, S. A., Al-Ghamdi, S. G., & Koç, M., "Additive manufacturing of polymer nanocomposites: Needs and challenges in materials, processes, and applications." *Journal of Materials Research and Technology*, 14, 910-941 (2021).
13. Doderò, A., Donati, I., Scarfi, S., Mirata, S., Alberti, S., Lova, P., ... & Castellano, M., "Effect of sodium alginate molecular structure on electrospun membrane cell adhesion." *Materials Science and Engineering:C*, 124, 112067 (2021).
14. Kouser, S., Prabhu, A., Sheik, S., Prashantha, K., Nagaraja, G. K., D'souza, J. N., ... & Manasa, D. J., "Poly (caprolactone)/sodium-alginate-functionalized halloysite clay nanotube nanocomposites: Potent biocompatible materials for wound healing applications." *International Journal of Pharmaceutics*, 607, 121048 (2021).
15. Aparicio-Collado, J. L., García-San-Martín, N., Molina-Mateo, J., Cabanilles, C. T., Quiles, V. D., Serrano-Aroca, A., & i Serra, R. S., "Electroactive calcium-alginate/polycaprolactone/reduced graphene oxide nanohybrid hydrogels for skeletal muscle tissue engineering." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 214, 112455 (2022).
16. Kouser, S., Sheik, S., Prabhu, A., Nagaraja, G. K., Prashantha, K., D'souza, J. N., ... & Manasa, D. J., "Effects of reinforcement of sodium alginate functionalized halloysite clay nanotubes on thermo-mechanical properties and biocompatibility of poly (vinyl alcohol) nanocomposites." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 118, 104441 (2021).
17. Doan, P., Nhi, T. T. Y., Nguyen, D. T., Nguyen, B. T., Nguyen, T. P., & Tran, N. Q., "Multifunctional injectable pluronic-cystamine-alginate-based hydrogel as a novel cellular delivery system towards tissue regeneration." *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 592-603 (2021).
18. Anitua, E., Zalduendo, M., Troya, M., Erezuma, I., Lukin, I., Hernáez-Moya, R., & Orive, G. "Composite alginate-gelatin hydrogels incorporating PRGF enhance human dental pulp cell adhesion, chemotaxis and proliferation." *International Journal of Pharmaceutics*, 617, 121631 (2022).

19. Łabowska, M. B., Cierluk, K., Jankowska, A. M., Kulbacka, J., Detyna, J., & Michalak, I. “A review on the adaption of alginate-gelatin hydrogels for 3D cultures and bioprinting.” *Materials*, 14(4), 858 (2021).
20. Shams, E., Barzad, M. S., Mohamadnia, S., Tavakoli, O., & Mehrdadfar, A. “A review on alginate-based bioinks, combination with other natural biomaterials and characteristics.” *Journal of Biomaterials Applications*, 08853282221085690 (2022).
21. Mallakpour, S., Tukhani, M., & Hussain, C. M. “Recent advancements in 3D bioprinting technology of carboxymethyl cellulose-based hydrogels: Utilization in tissue engineering.” *Advances in Colloid and Interface Science*, 292, 102415 (2021).
22. Mallakpour, S., Azadi, E., & Hussain, C. M. “State-of-the-art of 3D printing technology of alginate-based hydrogels—An emerging technique for industrial applications.” *Advances in Colloid and Interface Science*, 293, 102436 (2021).
23. M. Razavi, Y. Qiao and A.S. Thakor, “Three-dimensional cryogels for biomedical applications.” *J Biomed Mater Res A*, 107, 2736-2755 (2019)
24. T.M.A. Henderson, K. Ladewig, D.N. Haylock, K.M. McLean and A.J. O'Connor, “Cryogels for biomedical applications”, *J Mater Chem B*, 1, 2682-2695 (2013)
25. M. Bakhshpour, N. Idil, I. Perçin and A. Denizli, “Biomedical Applications of Polymeric Cryogels”, *Applied Sciences*, 9 (2019).
26. S. Pina, V.P. Ribeiro, C.F. Marques, F.R. Maia, T.H. Silva, R.L. Reis and J.M. Oliveira, “Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications”, *Materials* 12, 1824 (2019).
27. Yu, C. C., Chang, J. J., Lee, Y. H., Lin, Y. C., Wu, M. H., Yang, M. C., & Chien, C. T. “Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering.” *Materials Letters*, 93, 133-136 (2013).
28. Shaheen, T. I., Montaser, A. S., & Li, S. “Effect of cellulose nanocrystals on scaffolds comprising chitosan, alginate and hydroxyapatite for bone tissue engineering.” *International journal of biological macromolecules*, 121, 814-821 (2019).
29. Sundar, R., Joseph, J., Babu, S., Varma, H., John, A., & Abraham, A. “3D-bulk to nanoforms of modified hydroxyapatite: Characterization and osteogenic potency in an in vitro 3D bone model system.” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110(5), 1151-1164 (2022).
30. Poyraz, Ş. “Nanotopografik Fiber Matrikslerin Doku İskelesi Olarak Üretimi Ve İn-Vitro Etkinliklerinin İncelenmesi.”Yüksek Lisans tezi, *Hacettepe üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı* (2022).

31. Klebe, R., "Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues." *Experimental Cell Research* 179 (2), 362e373 (1988).
32. Odde, D.J., Renn, M.J., "Laser-guided direct writing for applications in biotechnology." *Trends in Biotechnology* 17 (10), 385e389 (1999).
33. L. Aydın, N. Demirkol, H. Kenar, "Kemik Doku Mühendisliği Uygulamalarında Kullanılabilecek Doğal Polimer-Seramik Temelli Kompozit Biyo Mürekkebin 3B Biyo-Basımı.", **3B Baskı Teknolojileri Uluslararası Sempozyumu** (2017).
34. Skardal, A., et al., "Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds." *Stem Cells Translational Medicine* 1, (11), 792e802 (2012).
35. Norotte, C., et al., "Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting." *Biomaterials* 30 (30), 5910e5917 (2009).
36. Di Giuseppe, M., Law, N., Webb, B., Macrae, R. A., Liew, L. J., Sercombe, T. B., ... & Doyle, B. J. "Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting." *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 79, 150-157 (2018).
37. Naghieh, S., Sarker, M. D., Izadifar, M., & Chen, X., "Dispensing-based bioprinting of mechanically-functional hybrid scaffolds with vessel-like channels for tissue engineering applications—a brief review." *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 78, 298-314 (2018).
38. Kim, M. H., Lee, Y. W., Jung, W. K., Oh, J., & Nam, S. Y. "Enhanced rheological behaviors of alginate hydrogels with carrageenan for extrusion-based bioprinting." *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 98, 187-194 (2019).
39. Naghieh, S., & Chen, X. "Printability—A key issue in extrusion-based bioprinting." *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(5), 564-579 (2021).
40. Wang, Z., Wang, Y., Yan, J., Zhang, K., Lin, F., Xiang, L., ... & Zhang, H. "Pharmaceutical electrospinning and 3D printing scaffold design for bone regeneration." *Advanced drug delivery reviews*, 174, 504-534 (2021).
41. Wu, R., Li, Y., Shen, M., Yang, X., Zhang, L., Ke, X., ... & Xu, S. "Bone tissue regeneration: The role of finely tuned pore architecture of bioactive scaffolds before clinical translation." *Bioactive materials*, 6(5), 1242-1254 (2021).
42. Allen, N. B., Abar, B., Johnson, L., Burbano, J., Danilkowicz, R. M., & Adams, S. B. "3D-bioprinted GelMA-gelatin-hydroxyapatite osteoblast-laden composite hydrogels for bone tissue engineering." *Bioprinting*, 26, e00196 (2022).

43. Lipton, J., Arnold, D., Nigl, F., Lopez, N., Cohen, D., Norén, N., & Lipson, H., “Multi-material food printing with complex internal structure suitable for conventional post-processing” *In 2010 International Solid Freeform Fabrication Symposium*. University of Texas at Austin (2010).
44. Bozkurt, Y., Özkan, H. G., & Karayel, E. “Eklemeli İmalat Teknolojilerinin Tıbbi Ekipmanların Üretiminde Kullanımı”, *El-Cezeri*, 8(2), 962-980 (2021).
45. Ulağ, S., “Üç Boyutlu Yazıcı ile Yapay Kornea Üretimi ve Elektroeğrilmış Nanofiber Yama ile Kornea Dokusunun Desteklenmesi”, Doktora Tezi, *Marmara Üniversitesi*, Turkey (2021).
46. Sarıkaya, B., “Poli (3-hidroksi bütirat)/Poli (bütülen adipat-ko-tereftalat)/İpek-Bazlı Tendon Doku İskeleleri: Karakterizasyon ve Tenojenik Aktivite”, Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim* (2022).
47. Murphy S.V., Atala A. “3D bioprinting of tissues and organs” *NatBiotechnol*, 32:773-85 (2014).
48. Çeper, B.” Metal katkılı bifazik kalsiyum fosfat/kitosan esaslı doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *BTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü* (2021).
49. Akguner, Z. P. “Kök hücre yüklü ipek fibroin-temelli nanohibrit kemik doku iskelelerinin geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstinye Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü* (2021).
50. Ataman, E., “Biyolojik Jellerde Difüzyon Mekanizmalar”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Lisansüstü Eğitim* (2006).
51. Çotur, B., ve K. SEZER, H. “Doku Mühendisliğinde Doku İskelesi Tasarımında Kullanılan Güncel 3 Boyutlu Yazdırma Teknolojileri”, *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(2), 548-564 (2017).
52. Ağırman, B. “Osteomyelit Tedavisi İçin Antibiyotik İçeren Doku İskelelerinin Hazırlanması ve in Vitro Karakterizasyonu”, Doktora Tezi, *Marmara Üniversitesi* (2021).
53. Ozbolat, I. T., & Yu, Y. “Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 60(3), 691-699 (2013).
54. Dababneh, A.B., Ozbolat, I.T., “Bioprinting technology: a current state-of-the-art review.” *Journal of Manufacturing Science and Engineering* 136 (6), 061016 (2014).

55. Malekpour, A., & Chen, X. "Printability and cell viability in extrusion-based bioprinting from experimental, computational, and machine learning views." *Journal of Functional Biomaterials*, 13(2), 40 (2022).
56. Güven, Ş. "Biyouyumluluk ve biyomalzemelerin seçimi", *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2(3), 303-311 (2014).
57. Toykan, D. "Biyomedikal Uygulamalar İçin Titanyum Takviyeli Hidroksiapatit Kompozitlerinin Geliştirilmesi" Doktora Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (2003).
58. Lanza R, Langer R, Vacanti JP. "Principles of tissue engineering", *Academicpress*; 14(3):88-95 (2011).
59. Huri, P. Y., Hasırcı, N., ve Hasırcı, V. "Kemik yapı mühendisliği", *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19(4), 206-219 (2010).
60. O'brien FJ. "Biomaterials and scaffolds for tissue engineering". *Mater Today*; 14:88-95 (2011).
61. Akdoğan E, Omay SB. "Organ Mühendisliğinde Kök Hücre Uygulamaları", *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci.*; 2:63-8 (2006).
62. Ergin, E., Ekici, Y., ve Ataç, F. B. "Doku mühendisliği ve uygulama alanları", *Türkiye Klinikleri. Tip Bilimleri Dergisi*, 38(1), 70-78 (2018).
63. Kim I-Y, Seo S-J, Moon H-S, et al. "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications", *Biotechnol Adv.*, 26:1-21 (2008).
64. Zafer, E. V. İ. S. "Çeşitli İyonlar Eklenmiş NanoHidroksiapatitler: Üretim Yöntemleri, İç Yapı, Mekanik ve Biyouyumluluk Özellikleri Yönlerinden İncelenmesi." *International Journal of Engineering Research and Development*, 3(1), 55-65 (2011).
65. Demirkol, N., Meydanoglu, O., Gökçe, H., Oktar, F. N., and Kayali, E. S. "Comparison of mechanical properties of sheep hydroxyapatite (SHA) and commercial synthetic hydroxyapatite (CSHA)-MgO composites", *In Key Engineering Materials*, 493, pp. 588-593 (2012).
66. Bhat, S.V. "Biomaterials", *Kluwer Academic Publisher*, Norwell, MA, A.B.D., ss.174-195. (2002).
67. Güngör, Koç. S. "B4C ve Al₂O₃ Seramik Plakaların Mekanik ve Balistik Özelliklerinin İncelenmesi." *Politeknik Dergisi*, 1-1 (2021).
68. Kelez, S. B. "Alüminyum Matrisli Farklı Oranlarda Grafen İçeren B4c Takviyesi İle Üretilen Kompozitlerin Tribolojik Özelliklerinin İncelenmesi", Doktora Tezi, *Karabük üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2021).

69. Mammadov, E., Aytaç, E., Türk, A., Akkaya, N., Say, G., Yılmaz, B., ... & Kırgül, E. “Üç boyutlu biyo-üretim: İlk izlenimlerimiz ve Çocuk Cerrahisindeki potansiyeli”, *Çocuk Cerrahisi Dergisi*, 34(3), 79-84 (2020).
70. Toprak, E. “Çeşitli mikroorganizmalar için uv-c inaktivasyon dozlarının floresan ve led ışık kaynakları ile belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü* (2020).
71. Yeşilay, S. “Sentetik hidroksiapatitin kemik porseleni bünyesinde kullanımı”, Doktora Tezi, *Anadolu Üniversitesi*, Türkiye (2014).
72. Demirkol, N., Oktar, F., and Kayali, E. “Sheep Hydroxyapatite(SHA)-Commercial Inert Glass(CIG) Composites”, *In AIP Conference Proceedings. American Institute of Physics, Ste. 1 NO 1 Melville NY 11747-4502 United States* (2012).
73. Turan, M. “Seramik oksit katkılı nano sentetik hidroksiapatit kompozitlerin üretimi ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü* (2020).
74. Şerbetçi, K., Orhun, S., Korkusuz, F., ve Hasırcı, N. “Hidroksi apatit içeren kemik çimentosunun in-vivo biyouyumluluğu”, *Artroplasti Artroskopik Cerrahi (Yeni Adı: Eklem Hastalıkları ve Cerrahisi)*, 13(4), 259-263 (2002).
75. Muratoğlu, M., Karip, E., Baydemir, S., ve Özcan, T. “Sentetik Hidroksiapatite Genleştirilmiş Perlit, ZrO₂, MgO ve P₂O₅ İlaveli Biyoseramik Kompozitlerin İncelenmesi”, *1 st International Symposium on Light Alloys and Composite Materials (ISLAC'18)*, 505-506 (2018).
76. Bulut, B., Demirkol, N., Erkmen, Z. E., and Kayali, E. S. “Comparison of microstructural and mechanical properties of hydroxyapatite-Al₂O₃ composites with commercial inert glass (CIG) addition”, *Acta Phys Pol A*, 127, 1094-1096 (2015).
77. Piras, C. C., & Smith, D. K. “Multicomponent polysaccharide alginate-based bioinks”, *Journal of Materials Chemistry B*, 8(36), 8171-8188 (2020).
78. Karakullukçu, O., “Manyetik Alana ve Sıcaklığa Duyarlı Sodyum Aljinat Filmlerin Sentezi ve Karakterizasyonu”, Yüksek lisans tezi, *İstanbul Üniversitesi, Kimya Mühendisliği ABD*, İstanbul (2018)].
79. S. Bom, R. Ribeiro, H. M. Ribeiro, C. Santos and J., “On the progress of hydrogel-based 3D printing: Correlating rheological properties with printing behaviour”, *Marzo, International Journal of Pharmaceutics*, 121506, DOI:10.1016/j.ijpharm.,121506, (2022).
80. Irmak, G., “Boyutlu Yazıcı İle Metakrilatlanmış Jelatin/Prp Hidrojel Ve Mezenkimal Kök Hücre İçeren Osteokondral Gradyan Sistemlerin Hazırlanması Ve İn-Vitro Etkinliklerinin Belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı* (2019).

81. Ávila, H. M., Schwarz, S., Rotter, N., & Gatenholm, P. "3D bioprinting of human chondrocyte-laden nanocellulose hydrogels for patient-specific auricular cartilage regeneration." *Bioprinting*, 1, 22-35 (2016).
82. GÜL C., Mutaf, S. ve Durmuş H. "Ti6Al4V Alaşımına Sol-Jel Yöntemi ile Yapılan Hidroksiapatit Kaplamalarda Dietanolaminin Kaplama Morfolojisine ve Korozyon Dayanımına Etkisi", *Dicle Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Dergisi*, 11.3: 1139-1147 (2020).
83. Baştan, F. E., "Termal Püskürtülebilir Stronsiyum İyon Değişimli Hidroksiapatit Tozunun Püskürtme Kurutma ile Üretilmesi ve Karakterizasyonu", Doktora tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Metalurji ve Malzeme Mühendisliği* (2018).
84. T. Gao, G. Gillispie, J. Copus, A. Pr, Y. Seol, A. Atala, J. Yoo, S. Lee, "Jelatin-aljinat kompozit biyomürekkep basılabilirliğinin reolojik parametreler kullanılarak optimizasyonu: sistematik bir yaklaşım" *Biyofabrikasyon*, 10 (2018).
85. Zuidema, C. Perçin, R. Gilbert, F. Morrison "Doku mühendisliği stratejileri için hidrojel reolojik karakterizasyonu için bir protokol", *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 102s. 1063 – 1073 (2014).
86. Cleymand, F., Poerio, A., Mamanov, A., Elkhoury, K., Ikhelf, L., Jehl, J. P., ... & Mano, J. F. "Development of novel chitosan/guar gum inks for extrusion-based 3D bioprinting: Process, printability and properties." *Bioprinting*, 21, e00122 (2021).
87. Kavzak, B. "Carrageenan jellerin UVV spektrometre ile incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı* (2005).
88. Macit, Ş. N. "Farklı yapıdaki yumuşak astar maddelerinin değişik sıcaklıklarda reolojik özelliklerinin değerlendirilmesi." Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2018).
89. Habib, M. A., & Khoda, B. "Rheological analysis of bio-ink for 3D bio-printing processes." *Journal of Manufacturing Processes*, 76, 708-718 (2022).
90. M. Bartnikowski, R. Wellard, M. Woodruff, T. Klein "Fiziksel ve kimyasal çapraz bağlama ile özel hidrojel viskoelastisitesi", *Polimerler*, 7, s. 2650-2669 (2015).
91. Demirkol, N. "Koyun Hidroksiapatit Esaslı Kompozitlerin Üretimi ve Karakterizasyonu" Doktora Tezi, *İTÜ FBE Metalurji ve Malzeme Mühendisliği ABD*, İstanbul, TÜRKİYE (2013).

92. Günay, K., & Leblebici, Z. “Nasturtium officinale R. Br. bitkisinin yaprak ekstraktı kullanılarak, çinko (Zn) nanopartikülünün (NP) biyosentezi ve nanopartikülün MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkisi“, Yüksek Lisans Tezi, *Neveehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi* (2021).
93. Demir, M. “İnsan Plasenta Ve Endotel Hücre Hatları İle 3b Kriyojel Ortak Kültür Sisteminin Oluşturulması Ve Etkinliğinin Araştırılması.”*Hacettepe Univ., Yüksek Lisans, Biyoloji Bölüm* (2022).
94. Çelik, A. C. T., & Kölüş, T. “3 Farklı Dentin Hassasiyeti Giderici Diş Macununun Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi.” *Selcuk Dental Journal*, 8(2), 460-466 (2021).
95. Akgüner, Z. P., & Öztürk, A. B. “Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere nanopartikül katkı doku iskelelerinin geliştirilmesi.” *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 27(7), 842-850 (2021).
96. Cao, C., Huang, P., Prasopthum, A., Parsons, A. J., Ai, F., & Yang, J. “Characterisation of bone regeneration in 3D printed ductile PCL/PEG/hydroxyapatite scaffolds with high ceramic microparticle concentrations.” *Biomaterials Science*, 10(1), 138-152 (2022).

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve ortaokulu Zonguldak Bahçelievler ilköğretim okulunda okudum. Anadolu kız meslek lisesi bilgisayar bölümde lise eğitimimi tamamladım. Zonguldak Karaelmas üniversitesi Karabük Teknik Eğitim Fakültesinde Tasarım ve Konstrüksiyon öğretmenliği mezunuyum. Yüksek Lisansı Karabük Üniversitesi Makine Eğitiminde tamamladım. Amasya üniversitesi teknoloji fakültesinde makine mühendisliğini bitirdim. 2011 de Amasya üniversitesi Merzifon meslek yüksekokulunda öğretim görevlisi olarak göreve başladım ve halen devam etmekteyim.