DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI İLE NAZAL REKONSTRÜKSİYONDA KULLANILMAK ÜZERE BİYOPOLİMERİK DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

DİLEK ARSLAN

OCAK 2023

DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI İLE NAZAL REKONSTRÜKSİYONDA KULLANILMAK ÜZERE BİYOPOLİMERİK DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

BAHÇEŞEHİR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİLEK ARSLAN

DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE REJENERATİF TIP YÜKSEK LİSANS DERECESİ İÇİN GEREKLİ ÇALIŞMALAR YERİNE GETİRİLMİŞTİR

OCAK 2023

BAHÇEŞEHİR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAY FORMU

Program Adı:	DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE REJENERATİF TIP YÜKSEK LİSANS
Öğrencinin Adı Soyadı:	DİLEK ARSLAN
Tezin Adı:	DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI İLE NAZAL REKONSTRÜKSİYONDA KULLANILMAK ÜZERE BİYOPOLİMERİK DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLİMESİ
Tez Savunma Tarihi:	12.01.2023

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları yerine getirmiş olduğu Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet ÖNCÜ
Enstitü Müdürü

Bu Tez tarafımızca okunmuş, nitelik ve içerik açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak yeterli görülmüş ve kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	**İmza**
Tez Danışmanı:	Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ	
2. Üye :	Dr.Öğr.Üyesi MEHMET OZANSOY	
3. Üye :	Dr. Öğr. Üyesi PELİN KILIÇ	

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.

Ad, Soyad : DİLEK ARSLAN

İmza

ÖZ

DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI İLE NAZAL REKONSTRÜKSİYONDA KULLANILMAK ÜZERE BİYOPOLİMERİK DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ARSLAN DİLEK

Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Ocak 2023, 36 sayfa

Burun kemiği ve kıkırdak patolojileri, sıklıkla karşılaşılan ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyen vakalardır. Burnun fonksiyonel ve estetik olarak yeniden yapılandırılması; uygun malzemenin seçilmesi ve gerekli tasarımın uygun bir şekilde yapılmasına bağlıdır. En çok kabul gören yaklaşım olan rekonstrüksiyon çalışmalarında otolog kıkırdak tedavileri, cerrahi komplikasyonlar ile sınırlı olmaktadır. Bu gibi sınırlamalar nedeniyle alloplastik uygulamalar (Gore-Tex ®, politetra-floroetilen, [PTFE] bazlı; Lactosorb ®, yüksek yoğunluklu polietilen [HDPE] esaslı gibi)ın kullanımı artmaktadır. Bu tür sistemler otolog tedavilerde yaşanan sınırlamaları minimize ediyorsa da alloplastiklerin de, özellikle implantasyonda meydana gelebilecek komplikasydan dolayı yeni nesil tedavi rejimlerine önemle ihtiyaç duyulmaktadır. Sağlıklı nazal hücrelerle dekore edilmiş, zamanla biyolojik olarak bozunabilen, biyolojik uyumlu doku iskelerinin geliştirilmesi olarak hücre ve doku mühendisliği temelli tedavi yaklaşımlarının önemi artmaktadır.

Sunulan tez kapsamında; değişik sebeplerle meydana gelen nazal olumsuzlukların giderilmesinde kullanılmak üzere nazal rekonstrüksiyon sistemlerinin biyolojik

olarak bozunabilen ve biyolojik uyumlu (doğal polimerlerden; polisakkarit, protein esaslı) malzemelerden yararlanılması planlanmıştır. Bu malzemelerden bazıları; suda çözünebilenler (örneğin; aljinat, ipek proteinleri vb.) ya da organik çözücüde çözünebilen yapılar(örneğin; polihidroksialkanoat[PHA]'lar vb.) şeklinde düşünülmüştür.

Doku iskelelerinin oluşturulmasında liyofilizasyon ve elektrostatik eğirme (*electrospinning*) teknikleri kullanılmıştır. İlk olarak suda çözünür polimerik yapılar kullanılarak önceden hazırlanan burun kalıpları uygun polimerlerle doldurularak 3 boyutlu doku iskelesinin bileşenlerinden biri olan süngerimsi tip yapı geliştirildi ve a liyofilize edildi. Mikro ve nano liflerden oluşan matrikslerin elektroeğirme tekniğiyle katmanlı yapılar halini alarak, taramalı elektron mikroskobu(SEM) sistemi ve makroskopik resimlerle morfolojik olarak analiz edildi. Hidrojel doğasına sahip yapıların kullanılması sebebiyle su alma davranışları incelendi.

Anahtar Kelimeler: Biyopolimer, Doku İskeleleri, Doku Mühendisliği Yaklaşımları, Nanofiberler, Nazal Rekonstrüksiyon.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BIOPOLYMERIC TISSUE SCAFFOLDS FOR NASAL RECONSTRUCTION WITH TISSUE ENGINEERING APPROACHES

ARSLAN DILEK

Medicine Master's Program

Supervisor: Prof. Dr. Emir Baki Denkbas

January 2023, 36 pages

Nasal bone and cartilage pathologies are cases that are frequently encountered and negatively affect the quality of life. Functional and aesthetic restructuring of the nose; It depends on the selection of the appropriate material and the proper design of the necessary design. In reconstruction studies, which is the most accepted approach, autologous cartilage treatments are limited to surgical complications. Due to such limitations, the use of alloplastic applications (such as Gore-Tex ®, polytetra-fluoroethylene, [PTFE] based; Lactosorb ®, high density polyethylene [HDPE] based) is increasing. Although such systems minimize the limitations experienced in autologous treatments, there is a strong need for new generation treatment regimens for alloplastics, especially due to the complications that may occur in implantation. The importance of cell and tissue engineering-based treatment approaches is increasing as the development of biocompatible tissue scaffolds decorated with healthy nasal cells, biodegradable over time.

Within the scope of the presented thesis; It is planned to use biodegradable and biocompatible materials (natural polymers; polysaccharide, protein-based) for nasal reconstruction systems to be used in the elimination of nasal problems caused by various reasons. Some of these materials are; are considered as either water-soluble (e.g. alginate, silk proteins, etc.) or organic solvent-soluble structures (e.g., polyhydroxyalkanoate[PHA]s, etc.).

Lyophilization and electrospinning techniques were used to form tissue scaffolds. First, the nose molds prepared in advance using water-soluble polymeric structures were filled with suitable polymers, and the spongy type structure, which is one of the components of the 3D tissue scaffold, was developed and a was lyophilized. Matrices consisting of micro and nano fibers became layered structures by electrospinning technique and were analyzed morphologically by scanning electron microscope (SEM) system and macroscopic pictures. Due to the use of structures with hydrogel nature, their water uptake behavior was investigated.

Key Words: Biopolymer, Nanofibers, Nasal Reconstruction, Tissue Engineering Approaches, Tissue Scaffolds.

Her daim güzel örnek olmak istediğim, iyi bir insan olmasına özen gösterdiğim canım kalbim oğlum KIVANÇ ve yaşasaydı gurur duyacağına inandığım muhteşem insan canım ağbim Dt. İbrahim ARSLAN ile.

TEŞEKKÜR

Bilimsel olarak sağlık ve teknolojik alanda faydalı olacağını düşündüğüm bu tez kapsamında tezin planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgisini, desteğini her daim sunan; engin bilgi ve tecrübelerinden faydalanabilmem için gerekli yönlendirmeleri ve bilgilendirmeleriyle çalışmalarımı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, bilimselliğine ek olarak çalışmaları koordine etme yeteneği ile tanıyan herkesi hayran bırakan, alanında duayen olan çok kıymetli hocam Başkent Üniversitesi Biyoteknoloji bölüm başkanı ve aynı zamanda Biyomedikal Mühendisliği hocası Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarımda mentörlüğümü yapan, tezin ilerleyişinde her daim danışabildiğim ve beni profesyonelce yönlendiren çok kıymetli arkadaşım, gelecekte bilim insanı olarak muhteşem yerlerde olacağına inandığım Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliğinden Ayşenur ACUNER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Başkent Üniversitesi BİYOTEK TEKMER biyomedikal laboratuarında tezimde kullanıdığım şablonların hazırlanmasını sağlayan Şeyma Nur YILMAZ'a çok teşekkür ediyorum. Laboratuvar çalışmalarında sonsuz desteğini esirgemeyen çok kıymetli hocam Başkent Üniversitesi BİYOTEK TEKMER müdürü Ali İhsan ÜNLÜ'ye çok teşekkür ediyorum. Laboratuvar kullanımında desteğinden ve güler yüzünden de mutlu olduğum Arzu GÖZAR'a teşekkür ediyorum. Elbette her daim desteklerini esirgemeyen canım annem Ümmiye ARSLAN ve canım babam Ali ARSLAN'a, kardeşim Mehmet ARSLAN'a tüm kalbimle teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

İNTİHAL.....iii
ÖZET.....iv-v
ABSTRACT.....vii-viii
İTHAF.....ix
TEŞEKKÜR.....x
İÇİNDEKİLER.....xi-xii
ŞEKİL/RESİM/ŞEMA LİSTESİ.....xıv
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ.....xv
Bölüm 1: Giriş 1
Bölüm 2: Genel Bilgiler.....2
2.1. Yumşak Doku Mühendisliği.....3
2.2. Burun Yapısı.....3
2.3. Polimerler.....5
2.3.1. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı polimerler….....5
2.3.1.1. Aljinat.....5
2.3.1.2. Jelatin.....7
2.3.1.3. İpek fibroin.....7
2.3.1.4. Polikaprolakton.....7
2.3.1.5. Kitosan.....8
2.4. Çapraz Bağlanma.....8
2.3.1. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı polimerler….....9
2.4.2. Hekzametilen diizosiyanat(HMDI) yapısı ve özellikler.....10
2.5. Nanofiber Yapılar.....11
2.5.1. İpek böceği(Bombyx mori)'den elde edilen ipek fibroinleri...11
2.6. Elektrostatik eğirme(Electrospinning).....13
2.7. Liyofilizasyon.....14
2.8. Üç boyutlu baskılama(*3D Printer)* Yöntemi.....15
2.9. Su Alma Davranışları.....16

Bölüm 3: Yöntem 17
3.1. Aljinat ve Jelatin Polimer Çözeltisi Hazırlanması.....17
3.2. İpek Fibroin Nanofiber Matların Üretimi.....17
3.2.1. İpek saflaştırma.....17
3.2.2. Elektrostatik eğirme ile çözelti hazırlama.....18
3.3. Üç Boyutlu Burun Şablon Hazırlama.....19
3.4. Üç Boyutlu Burun İskeleleri.....19
3.4.1. Üç boyutlu burun iskelelerinin oluşturulması.....19
3.4.2. HDMI ile çapraz bağlanmış polimerlerin su alma davranışları.....20
3.5. Doku İskeleleri Mekanik Testleri.....20
3.6. Biyolojik Uyumluluk-Sitotoksisite ve Proliferasyon Testleri.....21
Bölüm 4: Bulgular …….....23
4.1. Yapay Burun Doku İskelesi Tasarımında Kullanılan Kalıpların Üretimi…….....23
4.2. Aljinat/Jelatin/Fibroin Doku İskelesi Morfolojik Değerlendirmeler.....25
4.3. Aljinat/Jelatin ve İpek Fibroin Doku İskelelerinin Mekainik Testleri…….....29
4.4. HDMI ile Çapraz Bağlanmış Polimerlerin Su Alım Davranışları.....35
4.5. Biyolojik Uyumluluk-Sitotoksisite ve Proliferasyon Testleri.....35
Bölüm 5: Tartışma ve Sonuç …….....37
KAYNAKÇA.....38

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1 Alar burun kanat genişliği 3-4mm'dir.....5
Şekil 2 İpek fibroin ve serisin.....13
Şekil 3 Liyofilizatör cihazı.....15
Şekil 4 İpek saflaştırma basamakları.....18
Şekil 5 Elektrostatik eğirme cihazı ve düzeneği.....19
Şekil 6 Mekanik Test Deney Düzeneği.....20
Şekil 7 Mekanik Testlerde Kullanılan Numunelerin Hedef Geometrileri…….21
Şekil 8 3B Yazıcı ile Basılmış Yapay Burun Doku İskelesi Kalıp Örneği.....23
Şekil 9 3B Yazıcı ile Basılmış Yapay Burun Doku İskelesi Kalıp Örneği (İçKalıp).....24
Şekil 10 3B Yazıcı ile Basılmış Yapay Burun Doku İskelesi Kalıp Örneği (DışKalıp).....24
Şekil 11 İç ve Dış Kalıplar Arasında Oluşturulan Kompozit Esaslı Burun DokuİskelesiŞekil 12 Aljinat/Jelatin Doku İskelesi SEM Görüntüsü.....25
Şekil 13 Aljinat/Jelatin Doku İskelesine Katman Katman Yerleştirilmiş FibroinMikrofibriler Tabaka.....26
Şekil 14 Aljinat/Jelatin Doku İskelesine KatmanKatman Yerleştirilmiş FibroinMikrofibriler Tabaka.....27
Şekil 15 Aljinat/Jelatin Doku İskelesine KatmanKatman Yerleştirilmiş FibroinMikrofibriler Tabaka.....27
Şekil 16 Aljinat/Jelatin Doku İskelesine KatmanKatman Yerleştirilmiş FibroinMikrofibriler Tabaka.....28
Şekil 17 Aljinat/Jelatin Doku İskelesine KatmanKatman Yerleştirilmiş FibroinMikrofibriler Tabaka.....28

Şekil 18 Mekanik Testler için Numune Hazırlama İşlem Basamakları (ÇekmeTestleri).....29
Şekil 19 Mekanik Testler için Numune Hazırlama İşlem Basamakları (ÇekmeTestleri).....30
Şekil 20 Uygun Fiziksel Büyüklüklerde Numunelerin Hazırlanması (BasmaTesti).....30
Şekil 21 Uygun Fiziksel Büyüklüklerde Numunelerin Hazırlanması (ÇekmeTesti).....31
Şekil 22 Uygun Fiziksel Büyüklüklerde Numunelerin Hazırlanması (ÇekmeTesti).....31
Şekil 23 Uygun Fiziksel Büyüklüklerde Numunelerin Hazırlanması (ÇekmeTesti).....32
Şekil 24 Uygun Fiziksel Büyüklüklerde Numunelerin Hazırlanması (BasmaTesti).....32
Şekil 25 Uygun Fiziksel Büyüklüklerde Numunelerin Hazırlanması (BasmaTesti).....33
Şekil 26 Hazırlanan Doku İskelelerinin Çekme Testleri.....33
Şekil 27 Hazırlanan Doku İskelelerinin Çekme Testleri (tekrar deneyi).....34
Şekil 28 Hazırlanan Doku İskelelerinin Basma Deneyi Sonucu.....34
Şekil 29 Derişime Bağlı Olarak Zamanla Su Alma Kapasitesinin Değişimi.....35
Şekil 30 Yapı İskelelerinin MTT Test Grafiği.....36

KISALTMALAR LİSTESİ

PHA	Polihidroksialkanoat
ECM	Ekstraselüler Matriks
PLA	Poli(laktik asit)
PGA	Poli(glikolik asit)
PCL	Poli **(** -ε- kaprolakton)
PHB	Poli(hidroksi bütirat)
Alj	Aljinat
RGD	Arg-Gly-Asp (arjinin-glisin-aspartik asit)
Gly	Glisin
SF	İpek Fibroin(Silk Fbroin) (SF)
Ala	Alanin
Ser	Serin
B. mori	Bombyx mori
HMDI	Heksametilen Diizosiyanat
TFA	Trifloroasetik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu(Scanning Electron Microscope)
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
DMSO	Dimetil Sülfoksit

Bölüm 1

Giriş

Burun, yüzün orta bölümünde ve göze ilk çarpan organ olması nedeniyle dikkat çekicidir. Bu nedenle malfarmasyonlar, travma ve burun bölgesindeki kanser cerrahisi gibi durumlar kişinin sadce nazal fonksiyonunu değil kendi vücut algısını olumsuz etkilemesi ve normal günlük aktivite ve sosyal etkileşimini olumsuz etkileyebilmesi nedeniyle son derece önemlidir (Oseni, Butler, ve Seifalian,2013, ss. 238-244). Burun kıkırdağı, avasküler doku olması sebebiyle kendini tek başına yeniden inşa edemez. Bu nedenle üç boyutlu yapı iskelelerinin geliştirilmesi; doku mühendisliğinde hasarlı dokuları onarmak, yeniden inşa etmek ve yenilemek için çok önemlidir (Govindan, Gu, Karthi, ve Girija, 2019; Zare, Pezeshki-Modaress, Davachi, Chahsetareh, Simorgh, Asgari, ve Farhadi, 2022, ss. 1199-1209; Wang, Wang, Liu, Liu.ve Wang, 2022). Günümüzde aljinat, kitosan, jelatin gibi doğal polimerle; polikaprolakton (PCL), poli (etilen oksit), poli(hidroksimetil metakrilat) gibi doğal olmayan polimerler doku mühendisliğine ait çalışmalarda, organların rejenerasyonunda yapı iskelesi olarak oldukça fazla olarak kullanılmaktadır. Hidrojeller, yüksek su oranları ve dokulara benzeyen elastik yapılarından dolayı doğal ekstraselüler matriks (ECM)'e benzer olup doku mühendisliği çalışmalarında avantajlara sahiptir. Doku mühendisliği yapı iskelesi olarak tasarlanan hidrojeller; canlı hücrelerin tutunabileceği, kolaylıkla işleyebileceği ve üreyebileceği gözeneklere sahip, biyolojik olarak bozunabilir, ve biyolojik olarak uyumlu özellikte olmalıdır. Doku mühendisliğindeki gelişmeler ışığında, izole edilen fonksiyonel hücrelerin doğrudan veya çeşitli polimerik matriksler içinde canlıya implantasyonu, bütün bir organ ve dokunun transplantasyonuna tercih edilmektedir (Chen , Ushida ve Tateishi , 2002, ss. 67-77; Akgüner ve Öztürk, 2021, ss. 842-850).

Sunulan tez kapsamında; değişik sebeplerle meydana gelen nazal olumsuzlukların giderilmesinde kullanılmak üzere nazal rekonstrüksiyon sistemlerinin biyolojik olarak bozunabilen ve biyolojik uyumlu (doğal polimerlerden; polisakkarit, protein esaslı) malzemelerden yararlanılması planlanmıştır. Bu malzemelerden bazıları; suda çözünebilenler (örneğin; aljinat, ipek proteinleri vb) ya da organik çözücüde çözünebilen yapılar(örneğin; polihidroksialkanoatlar ([PHA]'lar) vb.) şeklinde

düşünülmüştür. Bu amaçla öncelikle suda çözünebilen polimerik yapılar kullanılarak önceden hazırlanan nazal kalıpların uygun polimerik yapılar ile doldurulması ve ardından liyofilize edilmesiyle 3 boyutlu doku iskelesinin bileşenlerinden biri olarak süngerimsi yapı geliştirilmiştir. Sonrasında ektrostatik eğirme (electrospinning) tekniği ile mikro ve nanofiberlerden oluşan matriksler hazırlanarak tabakalı bir yapı şeklinde son halini alması amaçlanmıştır.

Bölüm 2

Genel Bilgiler

2.1 Yumşak Doku Mühendisliği

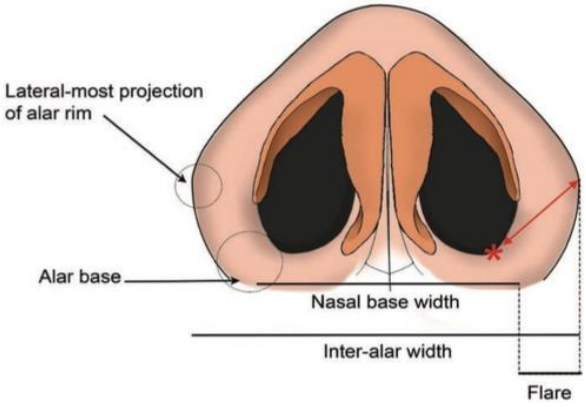
Doku mühendisliği, fonksiyonunu yitirmiş hastalıklı doku ya da organların onarılması ya da yenilenmesi amacıyla hastalıklı organların yeni biyolojik benzerlerinin geliştirilmesini hedefleyen, disiplinlerarası bir alandır. Doku mühendisliği, hastalıklı doku ya da tedavisi için temel tıp bilimlerini kullanmaktadır (Khan ve Tanaka, 2018, ss. 1-14; Rahmani ve Mooney, 2018, ss. 247-256). Doku mühendisliğinin amacı, ECM özelliklerini taklit eden, hücre büyümesi ve çoğalması için doğal bir ortam sağlayan yapı iskeleleri üretmektir. İskelelerin başarısı, fiziksel ve biyolojik özelliklerini yöneten hidrojellerin özelliklerine bağlıdır (Indurkar, Bangde, Gore, Agrawal, Jain ve Dandekar, 2020; Akgüner ve Öztürk, 2021, ss. 842-850). Birçok biyomateryal formu, farklı malzeme ve özelliklere sahip doku iskeleleri kıkırdak doku mühendisliği için geliştirilmiştir. Geçmiş on yılda; nanolifli doku iskelelerinin fiziksel ve topografik özellikleri nedeniyle ilgi bu yönde artmıştır. Morfolojik olarak doğal ECM'e benzeyen ultra ince, biyolojik olarak parçalanabilen polimerik liflerden oluşan nanofiber doku iskeleleri, kıkırdak doku mühendisliği için potansiyel iskeleler olarak yaygın Ar-Ge konusudur (Mahboudi, Soleimani, Enderami, Kehtari, Hanaee- Ahvaz, Ghanbarian ve Kazemi, 2017, ss. 1-9).

2.2 Burun Yapısı

Burun, yüzün orta bölümünde bulunması ve göze ilk çarpan organ olması nedeniyle yüzün çekiciliği açısından önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle malfarmasyonlar, travma ve burun bölgesindeki kanser cerrahisi oldukça rahatsız edicidir (Oseni, Crowley, Lowdell, Birchall, Butler ve Seifalian, 2011, ss. 757-768; Bora, Kurt, Durmuş ve Altuntaş, 2019, ss. 37-42; Oseni vd., 2013,ss. 238-244). Burun, karmaşık yapısı ve bağlı bulunduğu anatomik ilişkiler nedeniyle rekonstrüksiyonu zor bir bölgedir. Burun, altında bulunan iskelet desteğine göre üç parçaya ayrılır. Burnun 1/3 üst kısmı nazal kemik ve maksillanın frontal kısmı tarafından desteklenirken, 1/3 orta kısmı üst lateral kıkırdaklar ve 1/3 alt kısmı yani nazal bölüm ise alar kıkırdaklar tarafından desteklenmektedir. Burnun üst kısmı kemikten, alt kısmı ise kıkırdak yapılardan oluşur. Alar kıkırdaklar burun görüntüsünün oluşmasında ve desteğinin sağlanmasında oldukça önemlidir. Solunum fonksiyonunun doğru sağlanabilmesi açısından da nazal valvi oluşturmaktadır (Bora vd, 2019, ss. 37-42). Nazal onarımda burun derisi oldukça önemlidir. Burnun 2/3 üst kısmı yaklaşık olarak 1300 mikron kalınlığında olup hareketli olan ince bir deri ile kaplıdır. Alt 1/3 kısmı ise yaklaşık 2400 mikron kalınlığındadır ve yoğun sebase bezler ile doludur. Buradaki deri alar kıkırdaklara çok sıkı bir şekilde yapışmıştır (Esabil, Tellioğlu, Menevşe ve Uvegen, 2010, ss. 64-70).

İdeal burun genişliği; interkantal mesafeye(her iki gözün iç köşeleri arası mesafe; 31 -33mm)veya palpebral fissür genişliğine(göz iç ve dış köşesini birleştirengöz aksı) yaklaşıktır. Ancak burnun alt genişliğinin 1/3'ü diğer yüz özellikleriyle dengelenmelidir. Biraz daha geniş bir burun erkekler için uygun olabilir. Burun genişliği, interalar mesafe ile belirlenir. Flare; alar kenar, alar tabanından yanal olarak daha uzağa çıkıntı yaptığında ve interalar mesafe taban genişliğinden daha büyük olduğunda ortaya çıkar. Flare yoksa, interalar taban mesafe genişliğine eşittir. Bu durumda burun genişliği, alar tabanın konumu ile belirlenir. İdeal flare sınırı genellikle 2mm olarak kabul edilir. Alar lobül, dış ve vestibüler cilt arasındaki fibromüsküler dokunun 'sandviçi' gibi düşünülebilir. Kıkırdak yoktur. Bunun yerine; kas tabakasının altındaki dermiste bulunan yoğun fibröz doku, lobül şeklini ve kıkırdak benzeri yapısal bütünlüğü verir. Vücudun iki ana kas lobülü, *nazalis* ve dilatör *naris vestibularisin* alar parçasıdır. Her ikisi de burun deliğini kasılarak genişletir. *Nazalisin* alar kısmı maksilladan başlayıp anteromedial olarak hareket

ederek konumlanır (Rohrich, Malafa, Ahmad ve Basci, 2017, ss. 910-919). Alar bölgede oluşabilecek bozuklukların tamirinde ayrıca bu bölgenin anatomik yapısını, nazal fonksiyonunu e estetik görünüşünü korumak önemlidir (Mısırlıoğlu, Gideroğlu, Akan ve Aköz, 2015, ss. 191-195; Copcu, Sivrioğlu, Koç, Er ve Öztan, 2005, ss. 77-85) (Şekil 1).



Şekil1. Alar burun kanat genişliği 3-4mm'dir (Oseni, 2013)

2.3 Polimerler

Birden fazla sayıda molekülün (monomerin) kimyasal bağlarla oluşturduğu düzenli bağlanmasıyla oluşan, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklere polimer denir. Yani makromoleküller karışımıdır. Polimerlerin erimiş hallerinin ve çözeltilerinin viskoziteleri oldukça fazladır (Beşergil, 2003, ss. 470). Yaralanmaların ardından rejenerasyon süreci için eklem kıkırdağı, zayıf intrinsik kapasiteye sahip olduğu için kendi kendine onarımı zordur. Doğal bazlı polimerler, ECM benzerliği, kimyasal adaptasyon ve biyolojik uyum davranışı nedeniyle doku mühendisliğinde önemli bir seçenektir. Ayrıca doğal bazlı polimerler, şekillendirme için mükemmel esnekliğe sahiptir. Doku iskelelerinin oluşturulmasında doğal ve sentetik polimerler tercih edilmektedir. Doğal olmayan ve biyolojik olarak kullanılabilen polimerler; poli(-laktik asit)(PLA), poli(-glikolik asit)(PGA), (PCL), poli(-hidroksi bütirat)(PHB) polimerlerini içermektedir. Doğal olan biyopolimerler ise; nişasta, aljinat, kitosan,

hyalüronik asit türevleri içeren polisakkaritleri ve soya, kollajen, fibrin, jel, ipek proteinleri içermektedir (John ve Thomas, 2008, ss. 343-364).

2.3. 1 Doku mühendisliğinde kullanılan bazı polimerler.

2.3.1.1 Aljinat. Aljinat(Alj), alglerin hücre duvarında; azotobakteri ve *Pseudomonas sp.* gibi bakterilerin kapsülünde bulunan bir polisakkarittir. Bakterilerde koruyucu kapsül yapısı ile bakteri kolonizasyonuna imkan sağlayan biyofilm oluşturmaktadır. Kahverengi alglerin hücre duvarında aljinat bulunması ise, onların derin dalgalara karşı esnek ve güçlü olmalarını sağlamaktadır. Özellikle *Laminaria hyperborea, L. digitata, L. japonica, Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera* gibi kahverengi alglerden aljinat ekstresi çıkartılmaktadır. Aljinatın doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmesinin en önemli üç sebebi vardır. Bunlardan ilki; hidrofilik yapısı sayesinde, kullanıldığı çözeltinin kıvamını artırabilmesi, ikincisi ise suda hazırlanan sodyum aljinat çözeltisi içine kalsiyum tuzunun ilavesi ile Na^{+} iyonlarının Ca^{+2} iyonları ile yer değiştirmesi sonucu uzun aljinat zincirlerinin bir arada tutulmasıyla jel oluşturabilmesi ve üçüncü olarak da film formuna getirilebilmesidir. Aljinat hem hidrofobik hem hidrofilik gruplarla uyumlu olan amfoterik maddelerden birisidir. Karboksil grupları sayesinde çok değerlikli katyonlarla reaksiyon verme ve jel oluşturabilmektedir (Ahmad ve Khuller, 2008, ss. 1323-1334; Gentile, Ghione, Ferreira, Crawford ve Hatton, 2017, ss. 1922-1931; Akkuş, Günaydın ve Üstündağ, 2020, ss. 285-294; Raus, Nawawi ve Nasaruddin, 2020). Aljinik asit; 1,4- β-D-mannuronik asit (M) ve 1,4-α-L-gluronik asit (G) zincirlerinden oluşmuştur ve bu iki monomerden sadece birinin yada her ikisinin bir araya gelmesiyle lineer doğal polisakkarit olan aljinat meydana gelir (Raus vd., 2020; Ahmad ve Khuller, 2008, ss. 1323-1334; Rollo, Raghunath, Sales, Butler ve Seifalian, 2007, ss. 73; Afjoul, Shamloo ve Kamali, 2020). Bu bloklar ardışık M zincirlerinden (MMMMMM), ardışık G zincirlerinden (GGGGGG) ya da hem G hem M zincirlerinden meydana gelmektedir (GMGMGM). Genel olarak Ca^{+2}, Mg^{+2} gibi iki değerlikli katyonlar ile çapraz bağlanma sonucu G içeriğine sahip aljinat molekülünde daha sert hidrojel yapıları oluştururken, yüksek M içeriğine sahip aljinatlar daha yumşak ve elastik hidrojel yapıları oluşturmaktadır. Biyouyumlu ve biyolojik çözünmeleri dışında yüksek M içeriğine sahip aljinatlar yüksek G içeriğine sahip olanlara göre daha immunojeniktir (Raus vd., 2020). Ayrıca molekül ağırlığı

32000-400000 g/mol arasında değişen aljinatın moleküler ağırlığı ne kadar yüksek olursa, jel preparasyonunda o kadar viskoz olur (Ziv, Nuhn, Ben-Haim, Sasportas, Kempen, Niedringhaus ve Gambhir, 2014, ss. 3736-3743). Aljinatın fiziksel özelliklerini geliştirmek için kollajen, kitosan ve jelatin gibi doğal polimerler; polilaktid, polipirol gibi sentetik polimerler ya da tetraetilortosilikat, hidroksiapatit gibi inorganik bileşikler eklenerek kompositler oluşturulmaktadır. Hem aljinat hem de aljinat kompozitin oluşturulması için fiber, boncuk, hidrojel, 3D gibi farklı formlarda biyomedikal uygulamalar başvurulmaktadır (Ziv vd., 2014, ss. 3736-3743).

2.3.1.2 Jelatin. Jelatin; hayvanaların deri, kemik, kıkırdak, tendon gibi bağ dokularında bulunan kollajenin kısmi olarak hidrolizi ve denatürasyonu sonucuyla oluşan proteindir. Düzenli üçlü sarmal yapı gelişigüzel jelatin bobinlerini oluşturmak için bozunur. Bu gelişigüzel jelatin yapısına geçiş için olan denatürasyon işleminde ısıl işlem ve hidrolitik kovalent bağların olduğu iki temel işlem yer alır. Termal ısı işlemi suyun varlığında, hidrojen ve elektrostatik etkileşimleri yok etmek için kullanılır. Daha sonra kollajenin hidrolitik bozunması, asidik veya bazik ortamda gerçekleşir ve sırasıyla A ve B tipi jelatin oluşumu meydana gelir (Huesca-Urióstegui vd., 2022, ss. 191). Doğal bir polimer olan jelatin, kollajenin kısmi hidroliz ürünüdür ve toksik olmaması, karsinojenik etki potansiyeli taşımaması, biyouyumluluğu ve biyolojik olarak bozunabilirliği ile karakterizedir. ECM'de bulunan -Arg-Gly-Asp (RGD) dizilerini içeren jelatin doku mühendisliği iskeleleri ve ilaç taşıyıcılar gibi farmasötik Ar-Ge alanlarında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Afjoul vd., 2020; Yang, Xiao, Long, Ma, Zhang, Ren ve Zhang, 2018; Akgüner ve Öztürk, 2021, ss. 842-850; Govindan, Gu, Karthi ve Girija, 2019).

2.3.1.3 İpek fibroin. İpekler genellikle ipekböcekleri, örümcekler gibi eklembacaklıların bezlerine bulunan protein polimerleridir ve daha sonra liflere dönüşürler. Farklı kaynaklardan toplanan ipeklerin bileşimi, yapısı ve özellikleri çeşitlilik göstermektedir. En verimli ipek kaynakları Nephila clavipes ve Araneus diadematus örümcekleri, *Bombyx mori(B. mori)*'dir. *B. mori* kozalalarından elde edilen ipek fibroin, yüksek biyouyumluluğu, geçirgen yapısı, işleme ve tedarik kolaylığı, biyolojik olarak bozunabilmesi, düşük inflamasyon potansiyeli ve

morfolojik elastikiyet gibi üstün özellikleriyle biyomedikal uygulamalarda kullanılan önemli bir polimerdir (Qi, Wang, Wei, Yang, Zheng, Kim ve Zhang, 2017, ss. 23; Grabska-Zielińska ve Sionkowska, 2021, ss. 1510).

2.3.1.4 Polikaprolakton. PCL; biyolojik olarak bozunabilmesi, biyolojik olarak uyumlu ve yarı kristal yapıda camsı geçiş sıcaklığı çok düşük olan bir polimerdir. PCL'nin; mikroküre, nanoküre ve implantasyon şeklinde farklı uygulama alanları bulunmaktadır. Pek çok endikasyona yönelik olarak geliştirilen ilaçlar; hedeflenmiş ilacın yüklemesi ve ilaç salınımı için PCL içerisinde taşınmaktadır. PCL bozunma ürünü, insan vücudunda kendiliğinden bulunan hidroksiheksanoik asittir. PCL içeren dikişler, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından, yan etkileri olmaması nedeniyle onaylanmış olup her türlü cerrahi işlemde de kullanılmaktadır (Loh, Colin Sng, ve Li, 2008, ss. 3185-3194).

2.3.1.5 Kitosan . Deniz kabuklularının kabuklarında, mantarların hücre duvarlarında ve eklemnbacaklıların dış iskeletinde yaygın olarak bulunan kitosan, kitinin deasetillenmiş türevi olup N-asetil D-glikozamin ve D-glikozamin birimlerinden oluşan lineer polisakkarittir. Kitosanın biyouyumluluğu, biyolojik olarak bozunabilirliği, antimikrobiyal özellikleri, makrofajları uyarma kapasitesi, kemik oluşumunu indükleme ve glikozaminoglikan (GAG)'lar ve proteoglikanlar gibi negatif yüklü moleküllerle etkileşime girmesi biyomateryal iskele olarak yaygın kullanımına sebep olmaktadır (Georgopoulou, Papadogiannis, Batsali, Marakis, Alpantaki, Eliopoulos ve Chatzinikolaidou, 2018; Rodríguez-Rodríguez vd., 2018). Bununla birlikte kitosan hidrojelleri yoğun bir polimerik ağa, zayıf mekanik özelliklere ve kontrolsüz çözünme hızına sahiptir (Rodríguez-Rodríguez vd., 2018).

2.4 Çapraz Bağlanma

Genipin, Gardenya bitkisinden elde edilen doğal çapraz bağlama maddesidir ve gluteraldehite göre daha düşük toksisiteye sahiptir. Ancak genipinin esas çarpraz bağlanması arjinin ve lizine bağlıdır. Bu aminoasitler ise ipek fibroin içinde sadece %1,2'dir. Bu da genipinin çapraz bağlayıclıktaki beklenilen sonucunu azaltacaktır. Genel mekanik mukavemeti artırarak ve yetersiz termodinamik durumu geliştirerek çapraz bağlayıcı olarak etanol de yaygın olarak kullanımdadır. Etanol ile çaparaz bağlanan ipek fibroin, zincirlerinin amorf halden beta yaprağı ikincil yapısına

dönüşümünü de indükleyerek mekanik özelliklerini de artıracaktır. Ultraviyole ışıması, ışığın nüfuz etme derinliğinin sınırlandırılması nedeniyle malzemenin derin kısımlarına pek ulaşamaz ve düzensiz çapraz bağlantı ile sonuçlanır. Ayrıca reaksiyonu başlatmak için ekstra fotolaştırıcılara ihtiyaç vardır ve yüksek etkili elektron ışını, radyasyonla körleme için etkili bir enerji kaynağıdır ancak kalın numuneler için enerji penetrasyon yeteneği sınırlıdır. Gamma ışını (γ-ray) ile radyasyon yöntemi ise yüksek yoğunluklu nüfuz etme yeteneği ile enerjinin homojen iletimini sağlayabilmektedir. Yüksek enerjili gamma(γ), polimer zincirleri arasında serbest radikallerin üretimini tetikleyebilir, böylece tek tip üç boyutlu ağ oluşturabilir. Polimerin çapraz bağlanması ve sterilizasyonu, herhangi bir kimyasal çapraz bağlayıcı ve başlatıcı kullanılmadan aynı anda gerçekleşebilecektir (Wu, Yu, Sun, Li, Zhao, Ao ve Chen, 2020, ss. 721-734).

2.4.1 Kullanılan malzemelerin çapraz bağlanmaları. Bir polimer zincirinin diğer polimer zincirine koalent ya da iyonik bağlanması yöntemine çapraz bağlama denilmektedir. Çapraz bağlayıcı ve monomer derişimini değiştirerek farklı büyüklükte gözenek içeren polimerik kafesler oluşturulabilinir. Polimerleşme hem kolay hem hızlıca gerçekleşir (Naslıyan, 2012).

Jelatin, farmösitik ve tıbbi uygulamalarda biyouyumlu ve biyobozunur olarak kullanılabilen doğal bir polimerdir. Jelatin suda çözünmez; hidratlanır, şişer ve *in vivo* olarak hızla bozulur. Bununla birlikte, bu malzemelerin dayanıklılığı; aldehitler, karbodiimidler ve aldoz şekerleri ile çapraz bağlanma yoluyla uzatılabilir. Yapının çapraz bağlanması mekanik özelliklerini iyileştirir, stabiliteyi artırır ve dayanıklılığı uzatır

(Ulubayram, Aksu, Gurhan, Serbetci ve Hasirci, 2002, ss. 1203-1219; Liu, Su, W, Liu ve Huang, 2022, ss. 8449; Huesca-Urióstegui vd., 2022, ss. 191; Yang vd., 2018; Govindan, Gu, Karthi ve Girija, 2019; Rodríguez-Rodríguez vd., 2018; Rollo vd., 2007, ss. 73). Genel olarak fiziksel çapraz bağlanma ile 30-35◦C'nin altında hidrojel oluşturulabilir. Jelatin molekülleri agrege olur ve bir bobinden diğerine üçlü sarmalda konformasyonel değişikliğe uğrar. Bu nedenle jelatin hidrojeller, 37◦C'nin üzerinde zayıf mekanik özelliği ve düşük elastikiyet gibi biyomedikal uygulamalarda sınırlamalar getiren özelliklere sahiptir. Bu sebeple formaldehit, gluteraldehit, paraformaldehit, karbodiimid hidroklorür, genipin gibi

kimyasal ajanlarla kovalent çapraz bağlanarak stabilitesi ve mekanik özellikleri artırılabilinir. Ayrıca tirozinaz ve transglutaminaz gibi enzimatik çapraz bağlamalarla da jelatin çapraz bağlanabilmektedir. Plazma tedavisi gibi fiziksel çapraz bağlama malzemenin yüzeyinde çapraz bağlanmaya neden olacağı için zayıf jelatin makromolekül çapraz bağlanmasına neden olur. Foto çapraz bağlama ise kısa jelleşme süresi sunarlar; ayrıca, fotopolimerizasyon reaksiyonu için gereken foto başlatıcılar hücre ölümüne neden olmaktadır (Liu vd., 2022, ss. 8449; Yang vd., 2018). Rejeneratif ve farmositik olarak uygulama alanlarında kullanımda; ipek ve aljinatın kombinasyonu hızla jelleşen, fiziksel olarak kararlı hidrojellerin oluşmasını sağlar. Moleküler ağırlıklar, M ve G bloklarının oran değişimi ya da veya çapraz bağlamada kullanılacak iyon konsantrasyonu değişikliği ile aljinat hidrojellerinin mekanik ve fiziksel özellikleri için ayarlamalar yapılabilinir. Bununla birlikte aljinat jellerinin iki değerlikli maddenin yokluğunda yada iyonların, asitlerin , diğer iyonların varlığında hızla çözünmesi nedeniyle uzun vadeli uygulamalarda kullanışlıklarını sınırlamaktadır. Öte yandan makromoleküler bir protein olan ipek fibroin, çeşitli yöntemlerle jel haline getirilip kısmi veya tam dehidrasyon ile fiziksel olarak çapraz bağlandığında uzun süre stabil kalmakatdır. Yapılan çalışmalarda belirtildiği üzere; aljinat ve ipek fibroin hibrit jelleri ayarlanabilir mekanik ve morfolojik özelliklere sahiptirler. Çapraz bağlandıklarında artan fiziksel özellikleri vardır (Ziv vd., 2014, ss. 3736-3743).

2.4.2 HekzametilenDiizosiyanat (HMDI) yapısı ve özellikleri. İzosiyanatlar, polimer yapımında kullanılan reaktiflikleri yüksek kimyasallardır. En çok kullanılan izosiyanatlar; toluen diizosiyanat (TDI), 4,4’-metilen difenil diizosiyanat(MDI), 1,6-hekzametilen diizosiyanat (HMDI) ve 3,5,5,-trimetil sikloheksil izosiyanat(IPDI) gibi aromatik ve alifatik yapıda olanlardır. Hekzametilen diizosiyanat(HMDI), hidroksil gruplarıyla aromatik izosiyanatlara oranla daha yavaş reaksiyon veren alifatik izosiyanattır. Alifatik izosiyanatların rezonanslarına bakıldığında –N=C=O grubunun reaktivitesinin nükleofiller tarafından saldırıya uğrayan oksijen ve azot atomlarından kaynaklandığı görülmektedir, aromatik izosiyanatlara göre reaksiyonları daha yavaş gerçekleşmektedir (Aydın, 2018; Çalıkoğlu, 2017).

2.5 Nanofiber Yapılar

Nanofiberler hafif olup gözenekli ve geniş yüzey alanına sahip; işlevsel ve mekanik dayanıklılığı yüksek olan yeni nesil malzemelerdir. Nanofiber membranlar; filtrasyon, doku mühendisliği, koruyucu maske ve kıyafet yapımı, ilaç salınımı, yara kapatıcı, polimerik piller ve kompozit destekleyici olarak pek çok alanda uygulama alanına sahiptir. Tarihsel gelişimine göre çekme, kalıp sentez, faz ayrımı işlemi, kendiliğinden birleşme ve elektrostatik eğirme (*electrospinning*) yöntemleriyle üretilmektedir. Çekme yöntemiyle mikro manipülatör yardımıyla bir mikro pipet, çözeltinin yüzeyle temas ettiği çizgiye daldırılır ve mikropipet sıvıdan belirli bir hızla çekilir. Bu yöntemle fiberlerin çapları 100nm'den büyüktür. Kalıp sentez yönteminde nanofiberler nano gözenekli zarların gözeneklerinden geçirilen çeşitli özel malzemlerle elde edilir ve fiberlerin çapları, birkaç nanometre ile 100nm arasındadır. Faz ayrımı yöntemiyle homojen polimer çözeltisinin polimerce zengin iki ayrı fazın termodinamik olarak ayrıştırılmasıyla meydana gelir. Bu yöntemle fiber çapının kontrolü zordur ve bazı polimerlerle sınırlıdır. Kendiliğinden birleşme yönteminde atom veya moleküller kendiliğinden zayıf ve kovalent olmayan etkileşimlerle (hidrofobik kuvvetler) belirli yapılara düzenlenirler. Bu yöntem karmaşık, uzun ve düşük üretim gücüne dayanmaktadır. Elektrostatik eğirme yöntemi çeşitli polimerlerden sürekli olarak nanofiber seri üretimi geliştirilebilinir tek yöntemdir. Yüksek voltaj güç kaynağı, küçük çaplı enjektör ve topraklanmış metal toplayıcı olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Fiber çapları 3nm ile 1 μm arasında değişen çaplarda olabilmektedir (Zeytuncu, 2022).

2.5.1 İpek böceği (*B. mori*)'nden elde edilen ipek fibroinleri. Koza üretimleri üç gün sürmekte olup, ipek fibroinleri serisinin tutkal benzeri özelliği sayesinde bir araya gelerek kozayı oluşturmaktadır. Koza, boyutu 900-1500 metre arasında değişen ipek fibroinlere sahiptir. Kozanın en büyük görevi; kuşlar, böcekler ve bakterilerin saldırısı gibi çeresel olumsuzluklara karşı ipek böceğini korumaktır. İpek kozasının yapısını fibroin(ağırlıkça %72-81) ve serisin(ağırlıkça %19-28) olarak iki protein, ayrıca yağ/mum(%0.8-1) ve renk/kül(ağırlıkça %1-1.4) gibi kısımlar içermektedir. İpeğin ana bileşeni olan fibroin, iç çekirdek görevi görür ve mekanik dayanıklılık sağlarken, yapışkan tutkal benzeri olan serisin proteini fibroinin yapısını koruyan bir kaplama olarak göre yapmaktadır. İpek fibroin, doğal lifli proteindir ve

yaygın olarak kullanılan kollajen ve PLA gibi bazı biyolojik polimerlerden daha uyumlu biyomateryaldir. Her ipek lifi serisin ile kaplanmış iki ipek fibroin(SF) filamenti içerir. Serisin ve fibroin iki ayrı protein familyasıdır. Fibroin lifi, yaklaşık 390 kDa ağırlığında olan ağır zincir (H) ve 26 kDa ağırlığında olan hafif zincir (L) ve kovalent olmayan etkileşimlerle fibroine bağlı olan p25 olarak bilinen ve 25 kDa ağırlığında olan küçük glikoproteinden oluşmaktadır. *B.mori'*den elde edilen ipek fibroinin amino asit bileşimi temel olarak; %43 oranında glisin(Gly), %30 oranında alanin(Ala) ve %12 oranında serin(Ser) şeklindedir. H zincirinin hidrofobik alanları, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser'in tekrarlayan bir hekzapeptid dizisini ve stabil anti paralel β-levha kristalitleri oluşturabilen -Gly-Ala/Ser/Tyr dipeptitlerinin tekrarlarını içermektedir. L zincirinin amino asit dizisi tekrarlayıcı değildir, bu nedenle L zinciri daha hidrofilik ve nispeten elastik yapıdadır . Kendisini ipek I (α-sarmal) ve ipek II (β-tabakalar) iki yapısal konformasyonda düzenlemektedir. İpek I suda çözünebilir ancak ipek II sadece lityum bromür(LiBr), lityum siyanür(LiSCN) gibi sulu inorganik tuzalrda ya da konsantre asitlerle çözünebilmektedir. Çünkü bu çözeltiler, β-tabaka ipek fibroin yapısını stabilize eden hidrojen bağlarını kırabilirler. Ağır zincir, tekrarlamayan ve dolayısıyla liflerde daha az organize alan oluşturan birincil sekansla serpiştirilmiş ipek liflerinde kristal bölgeleri oluşturan 12 alandan oluşur. İpek fibroinde doğal bir protein olması nedeniyle proteinlerde bulunan birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncü yapılar görülür. *B.mori* ipek fibroinlerinin birincil yapısı temel olarak 4 bölgeye ayrılabilir. Tekrar eden dizlimler içeren kısım ise üç(1,2,3) küçük alan ve bir (4) amorf alan olarak gözlenir. Yapıdaki tekrar eden dizilimli kristalin kısım, proteinin ikincil yapısından sorumludur. Kristalin tekrarlayan bölge, proteinin ikincil yapısından(anti paralel β kıvrımlı tabakalar) sorumludur. İkincil yapıya örnek olarak ise alfa heliks, β-tabaka ve β-döngü verilebilir. Kristalin alanlar, malzemenin mukavemetinden sorumludur. Amorf alanlar, kristalin alanların gerilme altında yönlendirilmesine izin verir, böylece esneklik sağlar ve malzemenin mukavemetini daha da artırır (Şekil 2) (Qui vd., 2017, ss. 23; Grabska-Zielińska ve Sionkowska, 2021, ss. 1510; Kasoju ve Bora, 2012, ss. 393-412).



Şekil 2. İpek fibroin ve serisin(Gök vd., 2019)

2.6 Elektrostatik Eğirme(*Electrospinning)*

Elektrostatik kuvvetlerden faydalanılarak polimer çözeltisine yüksek potansiyel uygulamasıyla lif yapılarının oluşturulabileceğini 1934 yılında Formhals ifade ederek patentini almıştır. Lif yapılarının üretilmesinde kullanılan Elektrostatik eğirme tekniği olarak adlandırılan bu teknik, Norton tarafından geliştirilmiş ve ilk cihaz tasarımı gerçekleştirilmiştir. Mikro ve nano ölçekli lif yapılarının üretilmesi için çeşitli eğirme teknikleri geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan tekniklerden birisi de elektrostatik eğirme tekniğidir. Elektrostatik eğirme; fiber çapı, morfolojisi, yüzey özellikleri, ağ gözenekiliği için çapları nanometreden mikrometreye kadar kolay kontrol gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır. Elektrostatik eğirme ile yüzey gerilimine sahip olmayan polimer çözeltisine yüksek bir potansiyel uygulanarak polimer elektriksel olarak yüklenmektedir. Elektriksel alanın şiddeti artırıldığında düzenin ucundaki yarı küresel haldeki sıvıda konik bir şekil meydana gelir, bu şekle 'Taylor konisi'denilmektedir. Elektrik alanı belirli bir değeri aştığında, yüzey yüklerinin elektrostatik itme kuvveti, yüzey gerilimini yenerek Taylor konisinin ucundan polimer jeti fırlatır. Bu polimer jeti, düzenin karşısına yerleştirilmiş topraklanmış hedefe doğru akar ve çok ince lifçikler halinde birikir.Çözücü ise bu sırada hızlıca buharlaşmaktadır. Nano seviyede çapa sahip olan lifler elde edilir. Standart elektrostatik eğirme yöntemi için gerekli deney düzeneği beslenme ünitesi, toplayıcı plaka e güç kaynağı olarak üç ana parçadan oluşmaktadır.

Nanoliflerin fiziksel özellikleri temel olarak 3 faktöre bağlıdır:

1. Polimer çözeltisi parametreleri: Viskozite, yüzey gerilimi, iletkenlik, polimer moleküler ağırlık, solvent uçuculuğu, dielektrik sabiti
2. Teknik parametreler: Voltaj, hacim akış hızı iletkenliği, uçtan toplayıcı mesafe, kollektör geometrisi, iğne çapı
3. Çevresel koşullar: Sıcaklık ve nem

Böylece tek başına veya kombinasyon halinde fonksiyonel ve uygun maliyetli fiber membranların maliyetine izin verir. Bu yöntemle yeni malzemelerin geliştirilmesiyle ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte; iskele oluşumu, ilaçların kontrollü ve sürekli dağıtımı için sistemler, tıbbi cihazlar, kozmetik ürünler gibi karmaşık ve üç boyutlu sistemler geliştirmek mümkün olabilir. Ancak geniş uygulama alanlarının yanısıra düşük verimlilik, özel ekipman kullanımı, yüksek elektrik potansiyeli, yüksek maliyetler gibi sınırlılıkları da bulunmaktadır (Weiss, Kanjanapongkul, Wongsasulak ve Yoovidhya, 2012, ss. 362-397; Huesca-Urióstegui vd., 2022, ss. 191).

2.7 Liyofilizasyon

Liyofilizasyon olarak bilinen dondurarark kurutma işlemi, ürünün dondurularak basıncın düşürülmesiyle ve daha sonra sübliminasyonla ürün içerisindeki donmuş suyun (buz kristallerinin) uzaklaştırılmasını sağlayan ve düşük sıcaklıkta gerçekleştirilen dehidrasyon yöntemidir. Prensip olarak dondurma, vakum atmosferi altında (atmosfer basıncındaki kapalı bir hacimden, moleküllerin çekilmei ile vakum gerçekleşir. Vakum seviyesi arttıkça, molekül sayısı logaritmik olarak azalır) buz kristalleinin süblimleşmesidir. Düşük sıcaklık olduğu için, ürünün moleküler ve fiziksel yapısına zarar vermez. Deneyde hazırlanan şablonlar 24 saat süre liyofilizasyon cihazına konuldu (Teknosem marka, Toros 4/4DS model liyafilizatör) (Şekil 3). Liyofilizasyon yöntemi, iskele imalatında organik çözücünün yerine su ve buz kristallerinin kullanılmasıyla biyomedikal alanlar için uygun bir yöntemdir.



Şekil 3. Liyofilizatör

2.8 Üç Boyutlu Baskılama(3D Printer) Yöntemi

Üç boyutlu baskı, tasarlanmış üç boyutlu nesneleri dijital kontrol altında katman katman şeklinde üreten bir teknolojidir. Geçtiğimiz yıllarda bu teknoloji; hassas kontrollü biriktirme, maliyet etkinliği, basit işleme ve hızlı prototipleme avantajları nedniyle birçok alanda büyük ilgi görmüştür. Ekstrüzyon tabanlı 3D baskı, yarı katı ve termoplastik malzemeler için ideal 3D baskı teknolojisi olarak kabul edilir. En köklü iki ekstrüzyon tabanlı 3D baskı işlemi, erimiş biriktirme modelleme ve yarı katı ekstrüzyondur. Erimiş biriktirme modelleme çoğunlukla, yarı erimiş filamana eritilmek üzere belirli bir sıcaklıkta memeden ekstrüde edilmesinin ardından yapı plakası üzerinde katman katman biriktirilen termoplastik malzeme kullanılması ile çalışır. Yarı katı ekstrüzyon ise jel veya macun gibi yarı katı malzeme, ortam sıcaklığında veya bundan biraz yüksek sıcaklıkta şırınga tipi bir memeden basınç altında ekstrüde edilerek 3 boyutlu yapı olarak biriktirilmesidir. Bu yolla üretilen malzemeler yüksek viskoziteye sahip yumşak malzemeler için uygundur (Kuo, Qin, Cheng, Jiang ve Shi, 2020; Wu vd., 2020, ss. 721-734).

2.9 Su Alma Davranışları

Bir hidrojel, fiziksel ya da kimyasal olarak çapraz bağlandığında; suya daldırıldığında artık sulu ortamda çözünme eğilimi göstermez ve bunun yerine şişer. Bu davranış, aşınmaya ve çözeltiye yayılmaya başlayana kadar devam eder(Afjoul vd., 2020). Su alma kapasitesi, malzemenin gözenekliliğine ve hidrofilikliğine bağlıdır. Su alma ve tutma özellikleri, fizyolojik sıvı emiliminin ve *in vitro* hücre kültürü, *in vivo* implantasyon sırasında iskelelerin şeklinin ve boyutunun stabilizasyonu için kritik göstergedir (Chandika, Ko, Oh, Heo, Nguyen, Jeon ve Jung, 2015, ss. 504-513). Tıbbi uygulamalar için su alma özellikleri daha doğrusu şeklini koruması önemlidir. Dokulara implante edildiklerinde, komplikasyonları önlemek için orijinal şekillerini korumalıdırlar(Möller, Krause, Dahlmann, Gruh, Kirschning, ve Dräger, 2011).

Bölüm 3
Yöntem

3.1 Aljinat ve Jelatin Polimer Çözeltisi Hazırlanması

Deneyler için Fluka 71238 Aljinat ve Jelatin(sığır derisinden, Tip A jelatini Sigma Aldrich'ten satın alındı. Aljinat ve jelatin polimer çözeltisi elde etmek için deneyler boyunca distile su kullanıldı. Aljinat ve jelatinlerin kuru toz halleri tartılarak hesaplanan yüzde oranına göre distile su içerisine eklendi. Hazırlanan polimer çözeltisi; 60 ^{0}Cve 180dk, toplamda çözelti konsantrasyonları %1, % 3, %7 (a/a) 50 ml olacak şekilde 2000rpm'de sürekli olarak manyetik karıştırıcıda karışım sağlandı ve oluşan baloncukların giderilmesi için 15 dk'lık sonikatörlere konuldu. Aljinat ve jelatin (Alj/Gel) oranları 1:2 olarak hesaplanarak her bir yüzde için ayrı hazırlandı (Kuo vd., 2020).

3.2 İpek Fibroin Nanofiber Matların Üretimi

3.2.1 İpek saflaştırma. B. mori kozaları temizlenerek kolay penetre olması amacıyla kesilerek küçültüldü ve 5 gram olarak tartıldı. Kesilen kozalar 200 ml 0.02

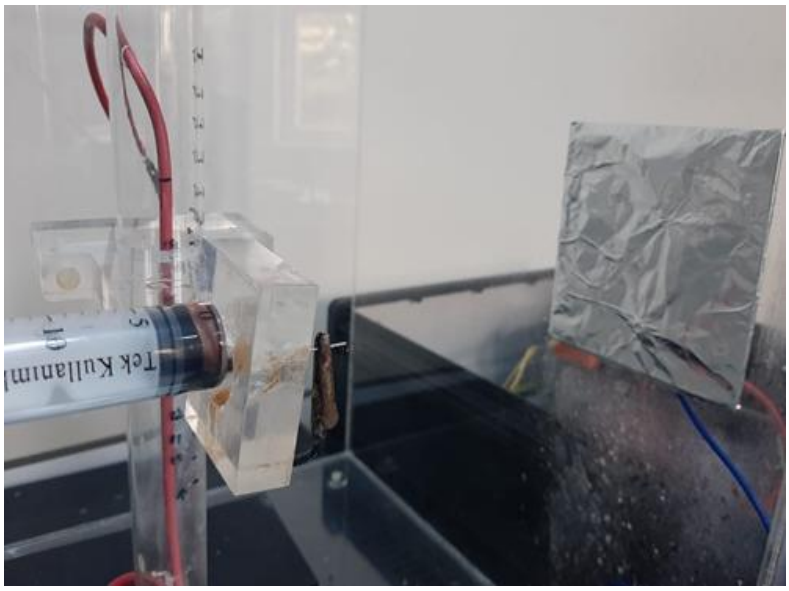
M Na_2CO_3 çözeltisine eklendi ve otoklavda 121°C de 20 dk berrak bir sıvı elde edilene kadar 3-4 kez tekrar edilerek SF, serisinden uzaklaştırıldı. Daha sonra ipek yumağı distile su ile yıkanarak üzerinde kalabilecek serisin proteinleri uzaklaştırıldı. Distile su ile yıkanan ipek 70°C'de etüvde 24 saat kurumaya bırakıldı. Şekil 4'de bahsedilen ipek saflaştırma basamaklarından elde edilen görseller yer almaktadır (Akgüner ve Öztürk, 2021, ss. 842-850).



Şekil 4. İpek saflaştırma basamakları(Gök vd., 2019)

3.2.2 Elektrostatik eğirme ile çözelti hazırlama. Sunulan tez kapsamında elektrostatik eğirme sırasında kullanılan parametreler şu şekildedir: Uygulanan potansiyel 15Kv, mesafe 13cm, süre 3 saat, şırınga iğnesi kesit alanı ve uzunluğu 0.82mm, 2.7cm(22Gauge). İpek nanofiber matların hazırlanmasında kullanılan elektrostatik eğirme tekniğine göre serisinden uzaklaştırılan ipek fibroin(%15), trifloraasetik asit (TFA) içerisinde çözdürüldü. Yüzde 15 (a/h) konsantrasyonla hazırlanan SF çözeltisi, şırınga yardımıyla çekilerek şırınga pompasına yerleştirildi.

İpek fibroin çözeltisine 15 kVvoltaj uygulanarak, 13cm uzaklıkta, 3 saat süreyle eğrilerek ipek nanofiber matlar elde edildi. Elektrosatatik eğirme ile elde edilmiş nanofiber yapının çapraz bağlanması için %100'lük etanolde 15 dk boyunca bekletildi ve ardından üç kez damıtılmış su ile yıkandı. İşlenmiş fiber oda sıcaklığında kullanıma kadar kurutuldu (Zhou, Feng, Yang, Fan, Lv, Zhang ve Zhang, 2015). Elektrostatik eğirme cihazı ve düzeneğine ait görsel Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. Elektrostatik eğirme cihazı ve düzeneği

3.3 Üç Boyutlu Burun Şablon Hazırlama

Başkent Üniversitesi, Biyotek A.Ş. Teknoloji Geliştirme Merkezi'nde yer alan Labaratuvarlarda bulunan 3 boyutlu yazıcı (Creality Ender 3D) kullanılarak PLA polimeri ile kalınlığı 3-4 mm dolayında olan yapay burun doku iskelesi hazırlanmasında kullanılacak olan iç ve dış kalıpların hazırlanması Oseni ve ark.'nın (2013) çalışmasındaki yöntem ışığında sağlandı (Oseni vd., 2013, ss. 238-244).

3.4 Üç Boyutlu Burun İskeleleri

3.4.1 Üç Boyutlu Burun İskelesinin Oluşturulması. Kullanıma kadar hazır bulundurulan Alj/Jel polimer çözeltisi ve çapraz bağlanmış ipek nanofiberler; 3

boyutlu yazıcıda hazırlanmış şablon üzerinde bir kat nanofiber, bir kat Alj/Jel polimer çözeltisi olacak şekilde katman katman birleştirildi.

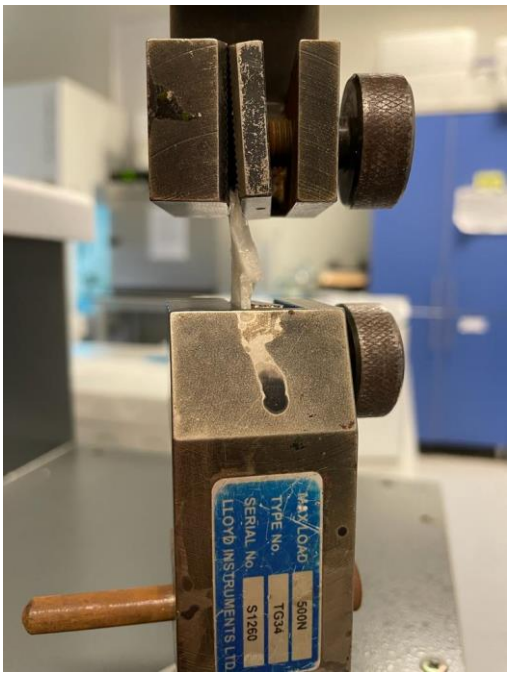
Elde edilen yapı, -20^{o}C'de gece boyunca tutulup daha sonra 24 saat liyofilizatör kullanılarak kurutuldu. Kimyasal çapraz bağlama için, dondurularak kurutulan yapılar birkaç kez saf aseton içerisinde dehidre edildi ve daha sonra %10'luk HDMI çözeltisi eklenmiş saf aseton içerisinde 30 dk süreyle ıslatıldı. Çapraz bağlama çözeltisinin fazlalığının çıkarılmasından sonra 70^{o}C 20dk sonikatörde ısıtıldı. Sonra tekrar dondurucuda gece boyunca bekletilip, ertesi gün 24 saat liyofilizatörde kurutuldu. Sonuç olarak katman katman, fiber destekli Alj/Jel toplam burun iskelesi oluşturuldu (Prang, Muller, Eljaouharı, Heckmann, Kunz, Weber ve Weidner, 2006).

3.4.2 HMDI ile Çapraz Bağlanmış Polimerlerin Su Alma Davranışları. Hazırlanan iskelelerin denge şişme kapasitesini belirlemek için gravimetrik bir yöntem izlendi (Kumar, Prasad ve Bajpai 2019). Kuru parçası eşit miktarlarda kesilerek kuru ağırlıkları tartıldı; 30., 60., 120., 240., 360., 480. ve 1440. dakikalarda 37 °C'de fosfat tampon çözeltisi (PBS)'ne (pH 7.4) batırıldı ve daha sonra şişmiş yapı iskelesi PBS tamponundan çıkarıldı. Filtre kağıdı ile fazla nemleri alınarak tartılıp aşağıdaki orana göre hesaplanarak kaydedildi.

%Su Alma Kapasitesi =[(ıslak ağırlık-kuru ağırlık)/kuru ağırlık].100

3.5 Doku İskleleri Mekanik Testleri

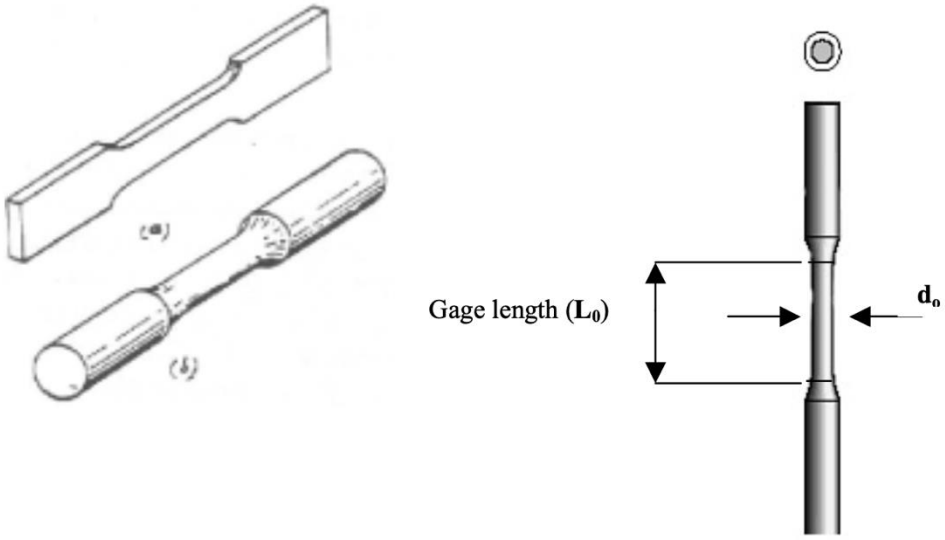
Sunulan tez kapsamında hazırlanan yapay burun doku iskelelerinin mekanik testleri kapsamında hazırlanan yapıların çekme ve basma testleri gerçekleştirildi. Söz konusu mekanik testler Instron Çekme Cihazı (Universal Testing Machine, Lloyd Instruments Ltd., UK) kullanılarak elde edildi (Şekil 6).



Şekil 6.. Mekanik test deney düzeneği

Hazırlanan doku isklelerinin mekanik özelliklerini ölçmek için kullanılan en yaygın test türü gerilim testidir olup gerilim testi, malzemelerin dayanıklılığı hakkında temel bir tasarım bilgisi sağlamak için kullanılır ve malzemelerin spesifik özelliği için kabul gören testtir. Gerilim testi sırasında elde edilen gerilme-gerinim eğrisini tanımlayan başlıca parametreler, çekme dayanımı (UTS), akma dayanımı veya akma noktası (σy), elastik modül (E), yüzde uzama (Δ L%) ve alandaki azalma (RA%) olup tokluk, esneklik, poisson oranı (ν) da bu test tekniği kullanılarak bulunabilmektedir.

Bu testte kullanılacak test makinesi için uygun bir numune hazırlandı. Numune, bir ölçü uzunluğu boyunca (uzama ölçümlerinin yapıldığı uzunluk) yaklaşık olarak eşittir. Yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan örneklerin Şekil 7.'de verilen örnek geometrilerine benzer yapılara sahip olması gerekmektedir. Bu nedenle sunulan yapılara benzer örnekler cihaz üzerindeki çenelerin arasına sıkıştırılarak çekme testleri gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde hazırlanan doku iskeleleri ile basma/sıkıştırma testleri de gerçekleştirildi.



Şekil 7. Mekanik testlerde kullanılan numunelerin hedef geometrileri

3.6 Biyolojik uyumluluk-Sitotoksisite ve Proliferasyon Testleri

Sitotoksisiteyi belirlemek için ISO 10993-5 standardına göre 3, [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniletatrazolyum bromürün (MTT) testi kullanıldı. Bu test, hücre çoğalmasını değerlendirmek için hassas bir yöntemdir. Canlılık %70'in altında tespit edilirse, test materyalinin sitotoksisite potansiyeline sahip olduğu kabul edilir. L929 hücreleri, oyuk başına 1.0x104 konsantrasyonda 96 oyuklu bir plakaya ekildi ve 24 saat (1 ikiye katlama periyodu) kültürde (37°C, %5 C02) tutuldu. Ekstraksiyon ortamının hacmi, en yüksek konsantrasyon % 100 olduğu için kütle/hacim oranına göre hesaplandı.

Negatif kontrolde sadece besiyeri, pozitif kontrolde besiyeri ve (DMSO) kullanıldı. Test numunesi ekstraktlarının seri konsantrasyonları, hücrelere maruz bırakıldı ve 24 saat boyunca, şartlandırılmış bir ortamda tutuldu (37°C, %5 C02). Numuneler 2 tekrarda çalıştırıldı. Yirmi dört saat sonra kuyucuklardaki kültür ortamı boşaltıldı ve her kuyucuğa 50 µl MTT (1mg/mL) eklendi. Kuyu plakaları, 37°C'de 2 saat süreyle inkübe edildi ve her oyuğa 100 µl izopropanol eklendi. Kuyulardaki absorbans derecesi, mikroplaka okuyucuda MTT prosedürlerindeki 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

Bölüm 4
Bulgular

4.1 Yapay Burun Doku İskelesi Tasarımında Kullanılan Kalıpların Üretimi

Yapay burun doku isklesinin hazırlanmasında kullanılan kalıpların tasarımında 3B yazıcı kullanılarak tasarlanmış olan iç ve dış kalıplar PLA polimeri kullanılarak tasarlanmıştır. Söz konusu kaşarımlar hazırlandıktan sonra bu kalıplar kullanılarak bu kalıpların ara bölgesinde kalacak şekilde Aljinat/Jelatin süngerimsi yapısı ile ipek fibroin mikro-nano-fibriler yapısı katmanlar şeklinde tasarlanmış ve hedeflenen kompozit yapıdaki doku isklesine ulaşılması sağlanmıştır (Şekil 8.- Şekil 11.).



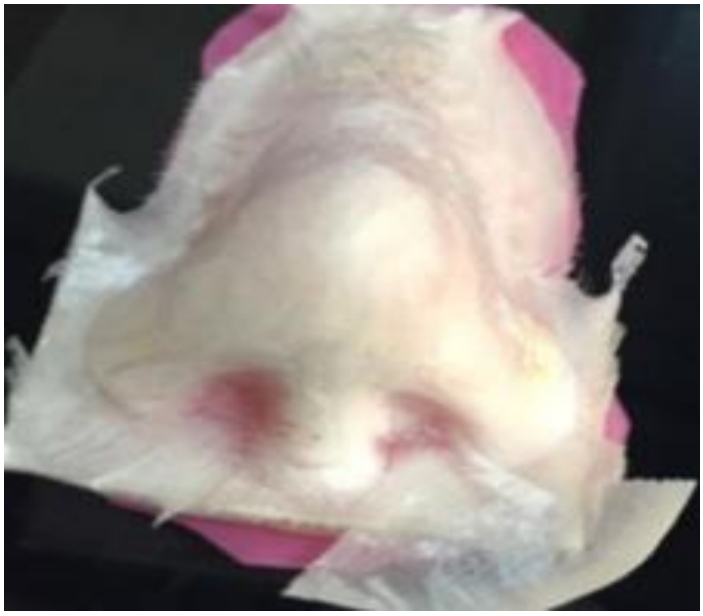
Şekil 8. 3 boyutlu yazıcı ile basılmış yapay burun doku isklesi kalıp örneği.



Şekil 9. 3boyutlu yazıcı ile basılmış yapay burun doku isklesi kalıp örneği (iç kalıp)



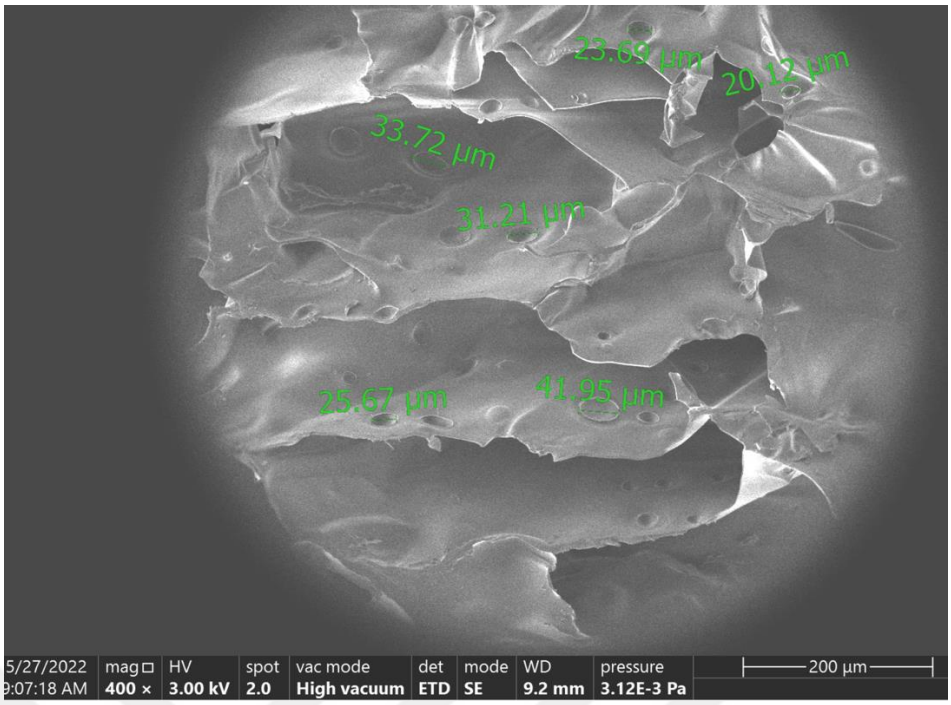
Şekil 10. 3boyutlu yazıcı ile basılmış yapay burun doku isklesi kalıp örneği (dış kalıp)



Şekil 11. İç ve dış kalıplar arasında oluşturulan kompoziyt esaslı burun doku iskelesi

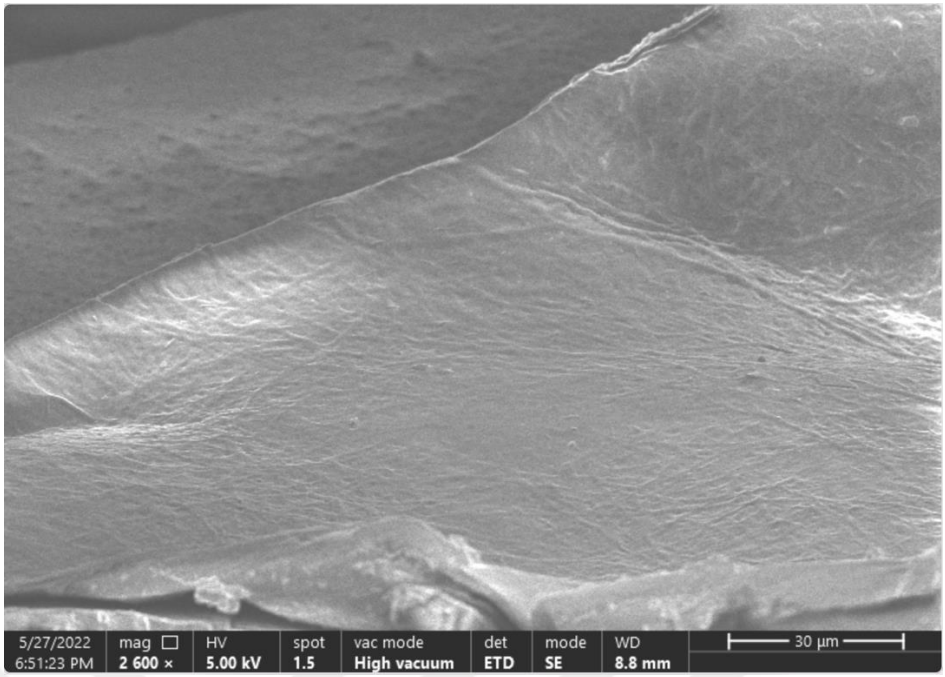
4.2 Aljinat/Jelatin/Fibroin Doku İskelesi Morfolojik Değerlendirmeler

Hazırlanan Aljinat/Jelatin/Fibroin doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM, Thermo Scientific markalı Quattro S model, USA) ile yapılan morfolojik değerlendirmelerinde kullanılan SEM fotoğrafları Şekil 12.- Şekil 17.'de sunulmuştur. Elde edilen bu görüntülere göre süngerimsi yapıya sahip Aljinat/Jelatin iskele yapılarının yaklaşık 40-50 mm ortalama gözenek çapına sahip gözenekli yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 12).

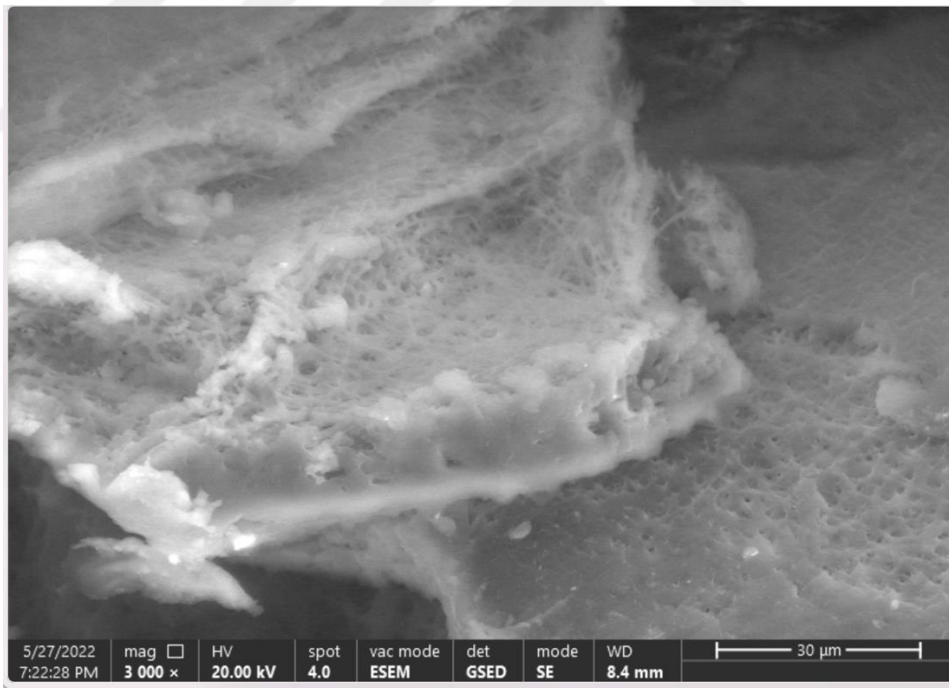


Şekil 12. Aljinat/Jelatin doku iskelesi SEM görüntüsü (30-40 □m ortalama gözenek büyüklüğü)

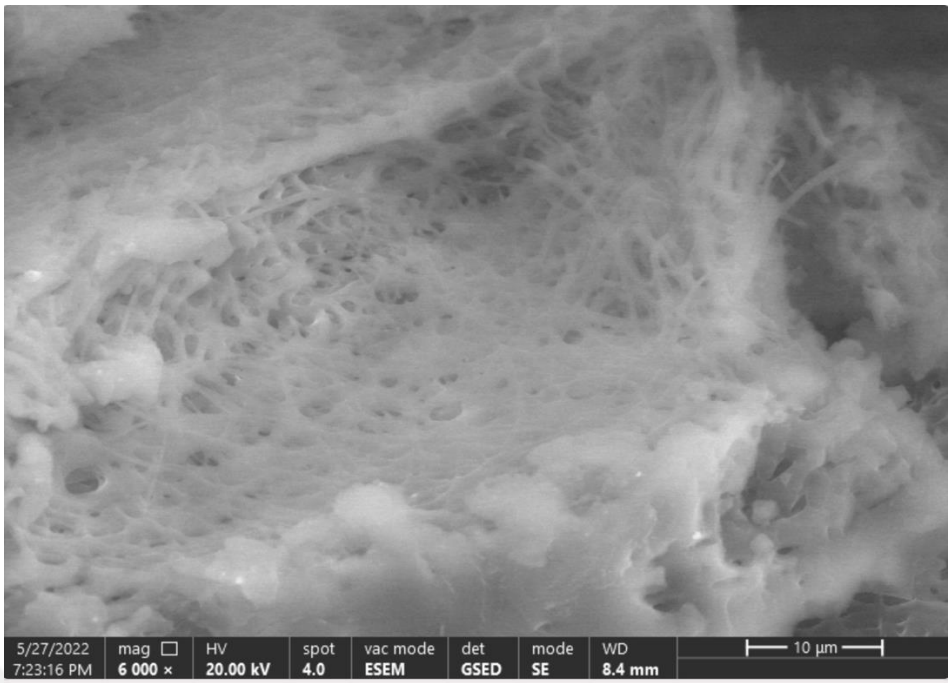
Yapay burun dokusunu oluşturan kompozit doku iskelesinin tasarlandığı yapılarda ise mikro-nano-fibriler yapıdaki katmanların yüzeyden itibaren (Şekil 13.) iç katmanlara kadar homojen bir şekilde yerleştirildiği ortaya konulmuştur (Şekil 13.-Şekil 16.).



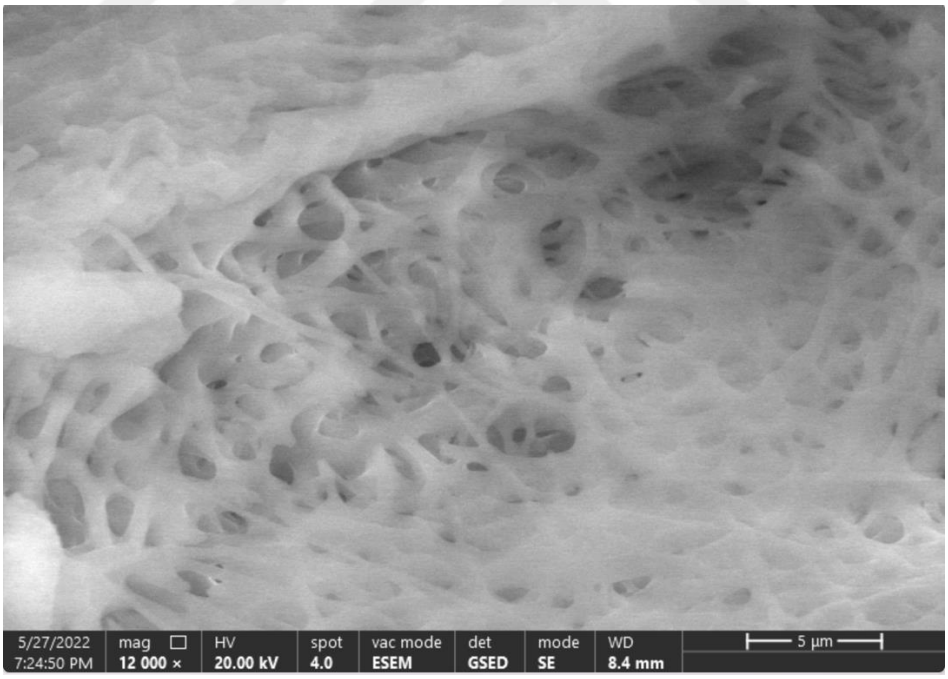
Şekil 13. Aljinat/Jelatin doku iskelesine katman katman yerleştirilmiş fibroin mikrofibriler tabaka



Şekil 14. Aljinat/Jelatin doku iskelesine katman katman yerleştirilmiş fibroin mikrofibriler tabaka

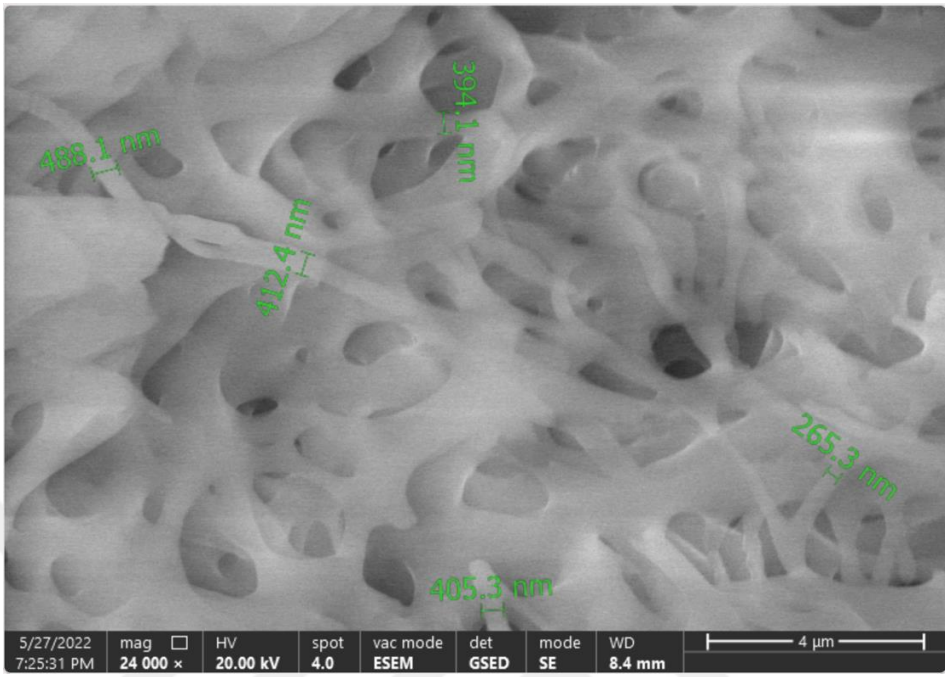


Şekil 15. Aljinat/Jelatin doku iskelesine katman katman yerleştirilmiş fibroin mikrofibriler tabaka



Şekil 16. Aljinat/Jelatin doku iskelesine katman katman yerleştirilmiş fibroin mikrofibriler tabaka

Ayrıca elde edilen bulgulara göre hazırlanan fibroin mikro-nanofibriler yapıların fibril çaplarının ortalama 300-400nm dolayında olduğu anlaşılmıştır (Şekil 17.).



Şekil 17. Aljinat/Jelatin doku iskelesine katman katman yerleştirilmiş fibroin mikrofibriler tabaka(ortalama fibril çapı 300-500 nm)

4.3 Aljinat, Jelatin ve İpek Fibroin Doku İskelelerinin Mekanik Testleri

Sunulan tez kapsamında hazırlanan yapay burun doku iskelelerinin mekanik testlere tabi tutulması için yapılan ön hazırlıklar kapsamında numune hazırlama işlem basamakları Şekil 18. - Şekil 25.'de sunulmuştur. Görsellerden anlaşıldığı üzere Şekil 7.'de sunulan örnek geometrilerine benzer numunelerin hazırlanması sağlanmıştır. Daha sonra hazırlanan numuneler Şekil 6.'da sunulan deney düzeneğne yerleştirilerek zaman bağlı olarak uygulanan kuvvetlere karşılık elde edilen değerlerin kaydedilmesi sağlanmıştır. Bu değerlerin kullanılması ile hazırlanan verilerle Şekil 10- Şekil 12'de sunulan sonuçların elde edilmesi sağlanmıştır. Bu verilerden anlaşıldığı gibi çekme testlerinde 225-250 N'luk kuvvet ile yapıların kopma noktasına ulaşıldığı ve yaklaşık 17 N'luk kuvvet uygulanması ile de malzeme deformasyonu ile karşılaşılmıştır.



Şekil 18. Mekanik testler için numune hazırlama işlem basamakları (çekme testleri)



Şekil 19. Mekanik testler için numune hazırlama işlem basamakları (çekme testleri)



Şekil 20. Uygun fiziksel büyüklüklerde numunelerin hazırlanması (basma testleri)



Şekil 21. Uygun fiziksel büyüklüklerde numunelerin hazırlanması (çekme testleri)



Şekil 22. Uygun fiziksel büyüklüklerde numunelerin hazırlanması (çekme testleri)



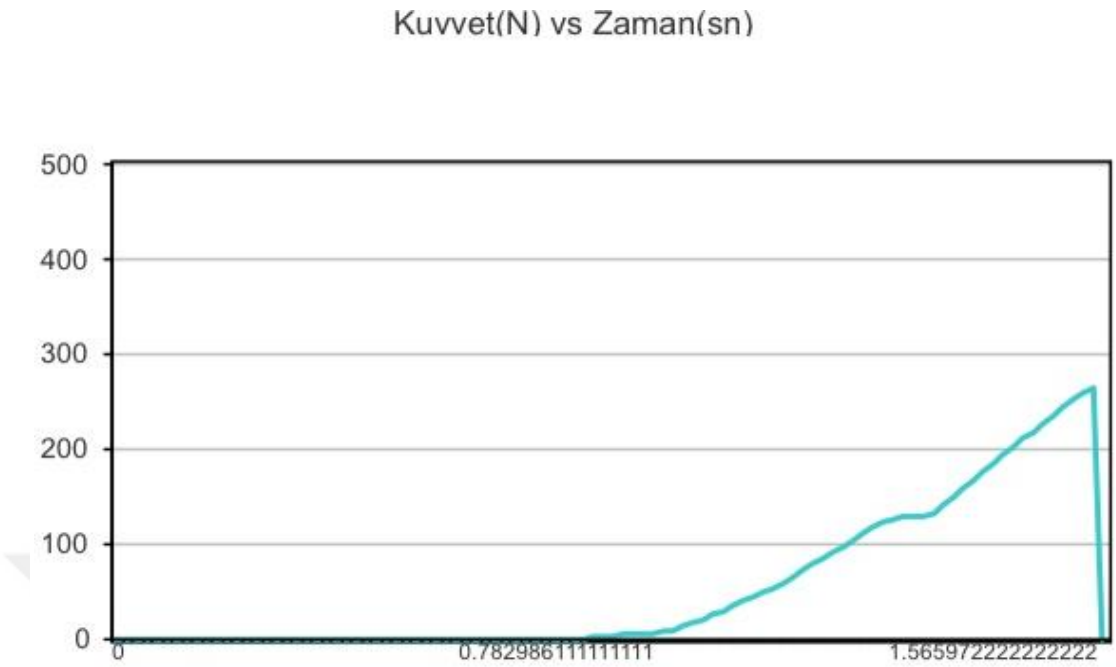
Şekil 23. Uygun fiziksel büyüklüklerde numunelerin hazırlanması (çekme testleri)



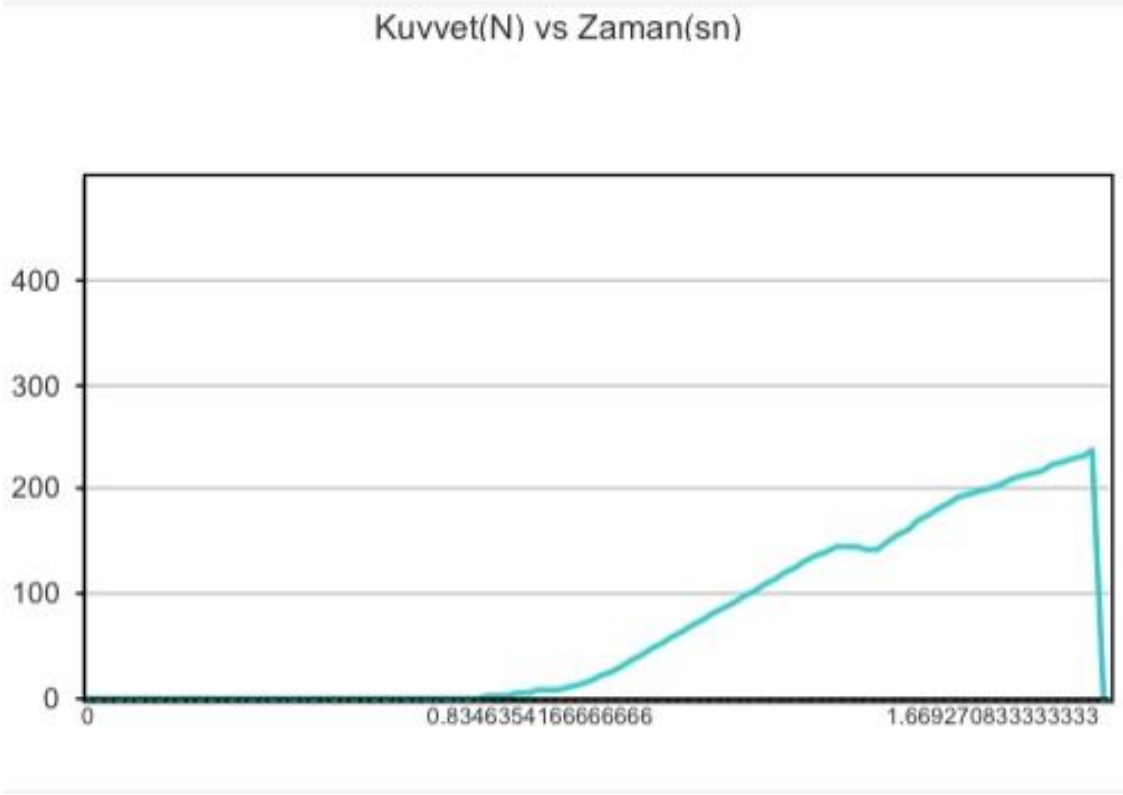
Şekil 24. Uygun fiziksel büyüklüklerde numunelerin hazırlanması (basma testleri)



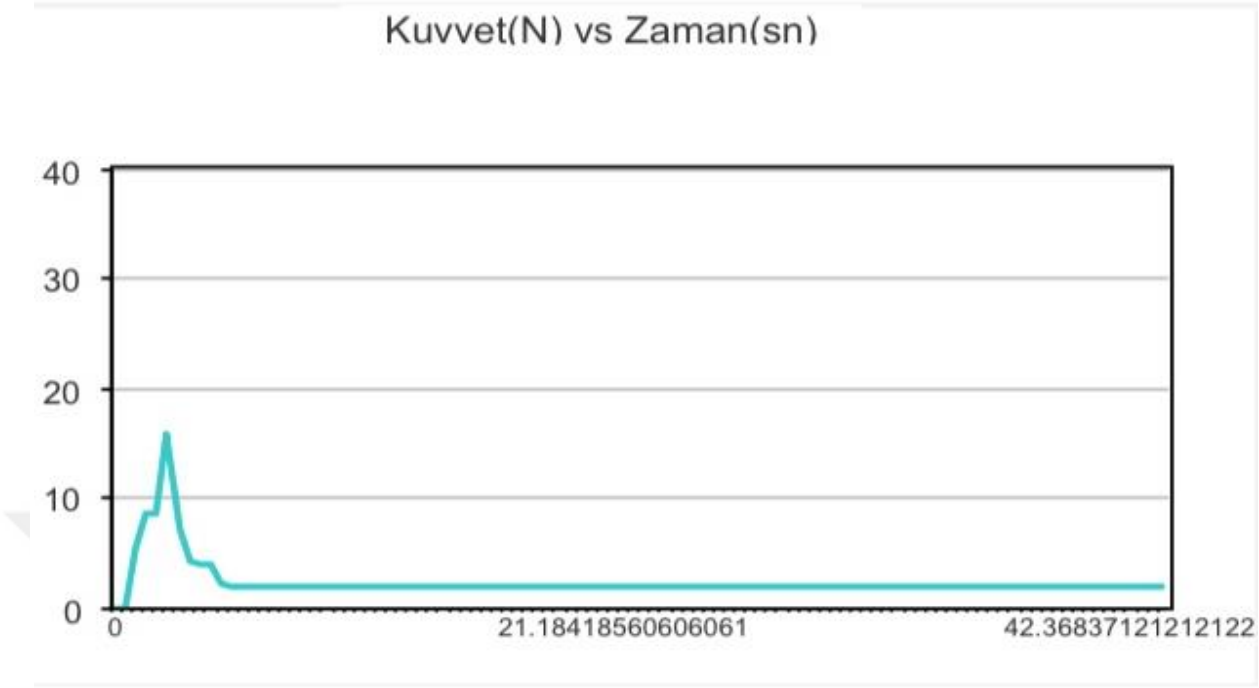
Şekil 25. Uygun fiziksel büyüklüklerde numunelerin hazırlanması (çekme testleri)



Şekil 26. Hazırlanan doku iskelelerinin çekme testleri



Şekil 27. Hazırlanan doku iskelelerinin çekme testleri (tekrar deneyi)

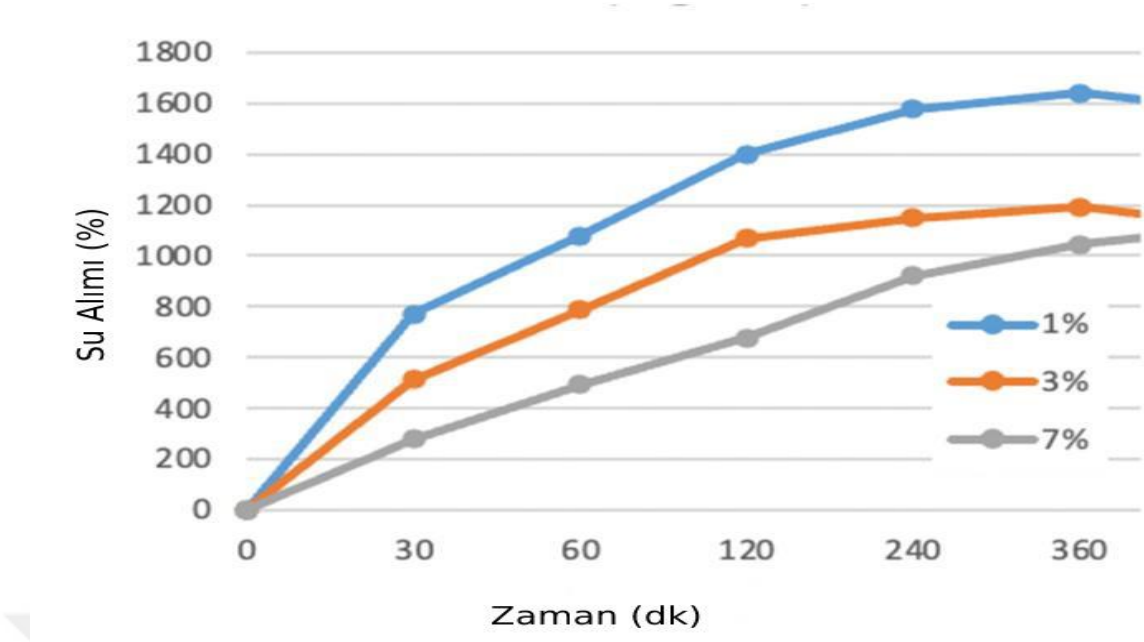


Şekil 28. Hazırlanan doku isklelerinin basma deneyi sonucu

4.4 HMDI ile Çapraz Bağlanmış Polimerlerin Su Alma Davranışları

Hazırlanan iskelelerin denge şişme kapasitesini/su alma kapasitelerini belirlemek üzere yapılan gravimetrik çalışmalarda elde edilen kütlesel verilerin değerlendirilmesi sağlanmıştır.

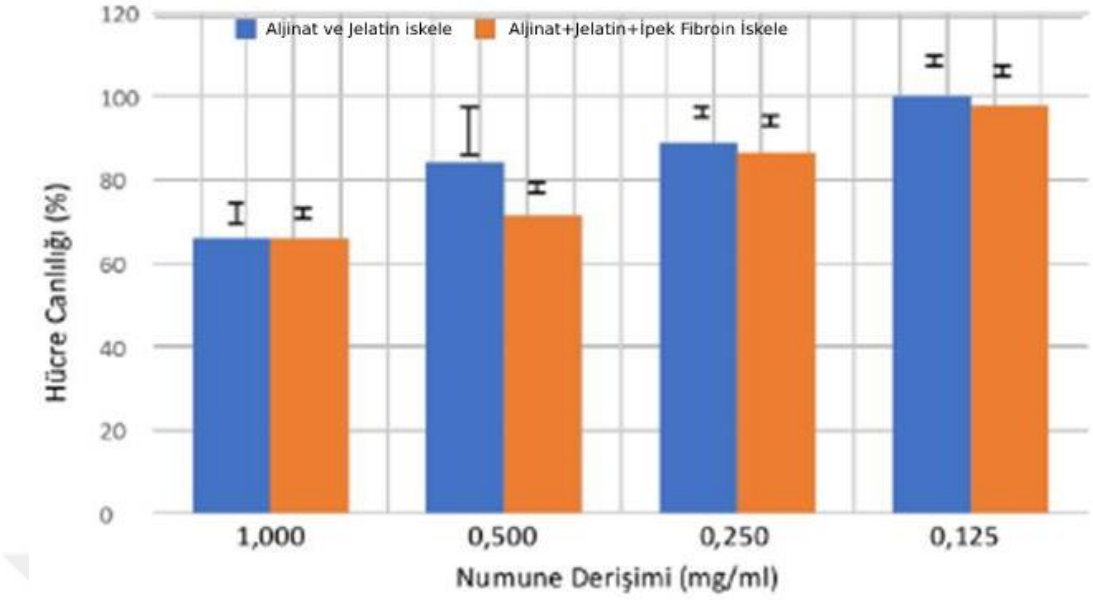
HMDI ile 30dk çapraz bağlanmış; hibrit olarak (a/h) şeklinde hesaplanmış 1:2 (Alj/Jel) oranında %1, %3 ve %7 toplam çözelti konsantrasyonunda hazırlanmış Alj/Jel polimer iskeleleri için tüm numuneler, PBS içinde sırasıyla % 1642, 1193, 1044 oranlarında şişmeye maruz kalmıştır ve dengeye ulaşarak; bunun ötesinde şişme yüzdesinde önemli bir artışın olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 29. Derişime bağlı olarak zamanla su alma kapasitesinin değişimi

4.5 Biyolojik uyumluluk-Sitotoksisite ve Proliferasyon Testleri

Hazırlanan yapay burun doku isklelerinin sitotoksisite testleri ile ilgili olarak ISO 10993-5 standardına göre gerçekleştirilen MTT testlerinden elde edilen bulgular değerlendirildiğinde farklı derişimlerde doku isklelerinin yer aldığı ortamlarda ekilen hücreler ile etkileştirilen hücrelerin doku iskelesi ekstraktlarının hücre canlılığına etkilerinin değerlendirildiği veriler Şekil 14'te sunulmuştur. Bu değerlendirmeler ışığında 0.125 mg/ml derişimindeki örneklerde hücre canlılığı değerlerinin yaklaşık % 100 civarında olduğu ve bu numuneler için biyolojik uyumunun son derece yüksek olduğu anlaşılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda doku iskeleesi örneklerinin derişimi artırıldığında hücre canlılığı değerlerinin bir miktar azaldığı ancak en düşük derişim değerinin yaklaşık sekiz katına çıkıldığında dahi hücre canlılığı değerlerinin % 65 ve üzerinde olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 30. Yapı iskelelerinin MTT test grafiği

Öte yandan yapay burun doku isklesi ıolarak kullanılması planlanan yapıların oluşturulduğu katmanlı yapıda yer alan Aljinat/Jelatin süngerimsi yapıların hücre canlılığı değerlerinin daha yüksek oldğu fibriler yapıların süngerimsi yapılara katmanlar şeklinde ilavesiyle hazırlanan kompozit yapıların hücre canlılığı değerlerinin bir miktar azaldığı gözlenmiş olmakla beraber bu durumda da hücre canlılığının gerekli ve yeterli düzeyde uygun bir biyolojik uyum değerine sahip oldukları anlaşılmıştır.

Bölüm 5
Tartışma ve Sonuçlar

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar ve öneriler şu şekilde olmuştur.

Aljinat ve jelatinlerin kuru toz halleri tartılarak hesaplanan yüzde oranına göre distile su içerisine eklenmiştir. Hazırlanan polimer çözeltisi; 60 ^{o}C ve 180 dk, toplamda çözelti konsantrasyonları %1, %3, %7 (a/a) 50 ml olacak şekilde 2000 rpm'de sürekli olarak manyetik karıştırıcıda karışım sağlanarak; oluşan baloncukların giderilmesi için 15 dk'lık sonikatörlere konulmuştur. Aljinat ve jelatin (Alj/Gel) oranları 1:2 olarak hesaplanarak her bir yüzde için ayrı hazırlanmıştır. B. mori kozalarından serisin uzaklaştırılarak saf ipek fibroinleri elde edilmiştir. İpek fibroin nanofiber matların hazırlanmasında elektrostatik eğirme tekniği kullanılmıştır. Bu tekniğe göre serisinden uzaklaştırılan SF (%15), (TFA) içerisinde çözülmüştür. TFA içerisinde %15 (a/h) olarak çözünen ipek fibroinleri elektrostatik eğirme tekniğiyle nanofiber forma getirilerek SEM görüntüleri ile çapları değerlendirilmiştir. Bu yapılar, çapları 300-400 nm aralığında değişen nanofiberler şeklindedir. Çapraz bağlanmış 1:2 (Alj/Jel) oranında %1, %3 ve %7 toplam çözelti konsantrasyonlarında, konsantrasyon arttıkça su alma kapasitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Daha düşük konsantrasyonda içindeki boşluklu yapıların fazla olması nedeniyle su alma miktarı artmaktadır. Biyouyumluluklarını değerlendirmek amacıyla uygulanan *in vito* sitotoksisite test sonuçlarına göre, oluşturulan iskeleler biyouyumlu bulunmuştur. Bu sistemin bir de *in vivo* ve *ex vivo* çalışma koşullarında doğrulanması daha iyi olacaktır.

KAYNAKÇA

Afjoul, H., Shamloo, A., ve Kamali, A. (2020). Freeze-gelled *alginate/gelatin scaffolds for wound healing applications: An in vitro, in vivo study. Materials Science and Engineering: C,* 110957. doi:10.1016/j.msec.2020.110957

Ahmad, Z. ve Khuller, G. K. (2008). Alginate-based sustained release drug delivery systems for tuberculosis. *Expert Opin Drug Deliv* 5, 1323-1334.

Akgüner, Z. P. ve Öztürk, A. B. (2021). Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere nanopartikül katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 27*(7), 842-850.

Akkuş, H., Günaydın, B. ve Üstündağ, C.B.(2020). Doku mühendisliğinde 3 boyutlu biyo-baskı için biyofonksiyonel mürekkepler. *International Journal of 3D Prıntıng Technologies and Dıgıtal Industry*, 4(3), 285-294.

Aydın, A.(2018). *Antibakteriyel nefes alabilen membranların tasarsımı ve üretimi* (Yayınlanmamaış yüksek lisans tezi). Bursa Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Beşergil Bilsen(2003), *Polimer Kimyası*, Ankara: Gazi Kitabevi, 470.

Bora, A., Kurt, Ö., N., Durmuş, K., ve Altuntaş, E. E. (2019). Tek taraflı izole nonsendromik alar kartilaj yokluğu olgunun literatür eşliğinde değerlendirilmesi. ENTcase, 5(1), 37-42.

Chen G., Ushida T., ve Tateishi T.(2002). Scaffold Design for Tissue Engineering, *Macromolecular Bioscience, 6,* 67-77

Copcu, E., Sivrioğlu, N., Koç, B., Er, Ş., ve Öztan, Y. (2005). Tam kalınlıktaki alar defektlerin tek aşamalı onarımı, *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi, 13*(2)77-83.

Chandika, P., Ko, S.-C., Oh, G.-W., Heo, S.-Y., Nguyen, V.-T., Jeon, Y.-J., … ve Jung, W.-K. (2015). Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application. *International Journal of Biological Macromolecules, 81,* 504–513.

Çalıkoğlu, Y.(2017). *Epoksitlendirilmiş soya yağından tioglikolik asit ve tioglikolik asit metil esteri ile halka açarak oluşan poliollerden yeni poliüretan sentezi ve karakterizasyonu* (Yayınlanmamış yüksek lisans tezi). Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.

Esabil, E. K. E. R., Tellioğlu, A. T., Menevşe, G. T., ve Uvegen, S. E. (2010). Burun yumuşak doku defektlerinin onarımı. *The Turkish Journal of Ear Nose and Throat, 20*(2), 64-70.

Gentile, P., Ghione, C., Ferreira, A. M., Crawford, A., ve Hatton, P. V. (2017). Alginate-based hydrogels functionalised at the nanoscale using layer-by-layer assembly for potential cartilage repair. *Biomaterials science, 5*(9), 1922-1931.

Georgopoulou, A., Papadogiannis, F., Batsali, A., Marakis, J., Alpantaki, K., Eliopoulos, A. G., … Chatzinikolaidou, M. (2018). Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. Journal of Materials Science: *Materials in Medicine, 29(5).* doi:10.1007/s10856-018-6064-2.

Govindan, R., Gu, F. L., Karthi, S., ve Girija, E. K. (2019). Effect of phosphate glass reinforcement on the mechanical and biological properties of freeze-dried gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Materials Today Communications,* 100765. doi:10.1016/j.mtcomm.2019.100765.

Grabska-Zielińska, S. ve Sionkowska, A. (2021). How to Improve Physico-Chemical Properties of Silk Fibroin Materials for Biomedical Applications?—Blending and Cross-Linking of Silk Fibroin—A Review. *Materials, 14*(6), 1510. doi:10.3390/ma14061510.

Huesca-Urióstegui, K., García-Valderrama, E. J., Gutierrez-Uribe, J. A., Antunes-Ricardo, M., ve Guajardo-Flores, D. (2022). Nanofiber Systems as Herbal Bioactive Compounds Carriers: Current Applications in Healthcare. *Pharmaceutics, 14*(1), 191.

Indurkar, A., Bangde, P., Gore, M., Agrawal, A. K., Jain, R., ve Dandekar, P. (2020). Fabrication of guar gum-gelatin scaffold for soft tissue engineering. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 1*, 100006.

John, M. ve Thomas, S. (2008). Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate Polymers, 71(*3), 343–364.

Kasoju, N., ve Bora, U. (2012). Silk fibroin in tissue engineering. *Advanced healthcare materials, 1*(4), 393-412.

Khan, F. ve Tanaka, M. (2018). Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering, *International Journal of Molecular Sciences*, *19* (1), 1–14.

Kumar Saini, R., Prasad Bagri, L., ve Bajpai, A. K. (2019). Nano-silver Hydroxyapatite Based Antibacterial 3D Scaffolds of Gelatin/Alginate/Poly (vinyl alcohol) for Bone Tissue Engineering Applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.064*.

Kuo, C.-C., Qin, H., Cheng, Y., Jiang, X., ve Shi, X. (2020). An integrated manufacturing strategy to fabricate delivery system using gelatin/alginate

hybrid hydrogels: 3D printing and freeze-drying. *Food Hydrocolloids*, 106262.

Liu, H. W., Su, W. T., Liu, C. Y., ve Huang, C. C. (2022). Highly Organized Porous Gelatin-Based Scaffold by Microfluidic 3D-Foaming Technology and Dynamic Culture for Cartilage Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(15), 8449.

Loh, X. J., Colin Sng, K. B., ve Li, J. (2008). Synthesis and water-swelling of thermo-responsive poly(ester urethane)s containing poly(ε-caprolactone), poly(ethylene glycol) and poly(propylene glycol). *Biomaterials, 29(*22), 3185–3194.

Mahboudi, H., Soleimani, M., Enderami, S. E., Kehtari, M., Hanaee- Ahvaz, H., Ghanbarian, H., … Kazemi, B. (2017). The effect of nanofibre-based polyethersulfone (PES) scaffold on the chondrogenesis of human induced pluripotent stem cells. Artificial Cells, *Nanomedicine, and Biotechnology, 1–9.*

Mısırlıoğlu, A., Gideroğlu, K., Akan, M., ve Aköz, T. (2015). Plastik Cerrahi Pratiğinde Alternatif Bir Materyal: Kalsiyum Aljinat. *Türk Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Dergisi*, *12*(3), 191-195.

Möller, L., Krause, A., Dahlmann, J., Gruh, I., Kirschning, A., ve Dräger, G. (2011). Preparation and Evaluation of Hydrogel-Composites from Methacrylated Hyaluronic Acid, Alginate, and Gelatin for Tissue Engineering. *The International Journal of Artificial Organs, 34(2),* 93–102. Doi:10.5301/ijao.2011.6397.

Naslıyan, M.V.(2012). *Çeşitli dokulardan aldoz redüktaz enziminin izolasyon ve immobilizasyonu*(Yayınlanmamış yüksek lisans tezi). Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Oseni, A. O., Butler, P. E., ve Seifalian, A. M. (2013). Nasal reconstruction using tissue engineered constructs: an update. *Annals of Plastic Surgery*, *71*(2), 238-244.

Oseni, A., Crowley, C., Lowdell, M., Birchall, M., Butler, P. E., ve Seifalian, A. M. (2011). Advancing nasal reconstructive surgery: the application of tissue engineering technology. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *6(*10), 757–768.

Prang, P., Muller, R., Eljaouharı, A., Heckmann, K., Kunz, W., Weber, T., … Weidner, N. (2006). The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials.* https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.053.

Qi, Y., Wang, H., Wei, K., Yang, Y., Zheng, R.-Y., Kim, I., ve Zhang, K.-Q. (2017). A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(3), 23.

Rahmani, S., ve Mooney, DJ. (2018). Tissue-Engineered Wound Dressings for Diabetic Foot Ulcers BT, The Diabetic Foot: *Medical and Surgical Management*, 247–256.

Raus, R. A. , Nawawi, W. M. F., ve Nasaruddin, R. R. (2020). Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* doi:10.1016/j.ajps.2020.10.001.

Rodríguez-Rodríguez, R., García-Carvajal, Z. Y., Jiménez-Palomar, I., Jiménez-Avalos, J. A., ve Espinosa-Andrews, H. (2018). Development of gelatin/chitosan/PVA hydrogels: Thermal stability, water state, viscoelasticity, and cytotoxicity assays. *Journal of Applied Polymer Science, 47149.* doi:10.1002/app.47149

Rohrich, R. J., Malafa, M. M., Ahmad, J., ve Basci, D. S. (2017). Managing Alar Flare in Rhinoplasty. *Plastic and Reconstructive Surgery, 140*(5), 910–919.

Rollo, J., Raghunath, J., Sales, K. M., Butler, P. E., ve Seifalian, A. M. (2007). Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnology and Applied Biochemistry, 46(*2), 73.

Ulubayram, K., Aksu, E., Gurhan, S. I. D., Serbetci, K. ve Hasirci, N. (2002). Cytotoxicity evaluation of gelatin sponges prepared with different cross-linking agents. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 13(*11), 1203–1219. doi:10.1163/156856202320892966

Wang, H., Wang, Z., Liu, H., Liu, J., ..ve Wang, J..(2022). Three-Dimensional Printing Strategies for Irregularly Shaped Cartilage Tissue Engineering: Current State and Challenges. *Frontiers in Bioeng and Biotechnol*. doi: 10.3389/fbioe.2021.777039

Weiss, J., Kanjanapongkul, K., Wongsasulak, S., ve Yoovidhya, T. (2012). Electrospun fibers: fabrication, functionalities and potential food industry applications. In: Q. Huang (Ed.), *Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries* (ss. 362-397). Cambridge (UK): Woodhead Publishing Limited.

Wu, N., Yu, H., Sun, M., Li, Z., Zhao, F., Ao, Y., ve Chen, H. (2020). Investigation on the Structure and Mechanical Properties of Highly Tunable Elastomeric

Silk Fibroin Hydrogels Cross-Linked by Gamma-Ray Radiation. *ACS Applied Bio Materials, 3(1*), 721-734.

Yang, G., Xiao, Z., Long, H., Ma, K., Zhang, J., Ren, X., ve Zhang, J. (2018). Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Scientific Reports, 8(1).*

Zare, P., Pezeshki-Modaress, M., Davachi, S. M., Chahsetareh, H., Simorgh, S., Asgari, N., ve Farhadi, M. (2022). An additive manufacturing-based 3D printed poly ε-caprolactone/alginate sulfate/extracellular matrix construct for nasal cartilage regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A, 110*(6), 1199-1209.

Zeytuncu, B.(2022). Nanofiber membranların üretim yöntemleri ve uygulama alanları. https://www.plastik-ambalaj.com/tr/plastik-ambalaj-makale/1120-nanofiber-membranlarn-ueretim-yoentemleri-ve-uygulama-alanlar adresinden 05.12.2022 tarihinde edinilmiştir.

Zhou, W., Feng, Y., Yang, J., Fan, J., Lv, J., Zhang, L., … Zhang, W. (2015). Electrospun scaffolds of silk fibroin and poly(lactide-co-glycolide) for endothelial cell growth. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 26(1).* doi: 10.1007/s10856-015-5386-6.

Ziv, K., Nuhn, H., Ben-Haim, Y., Sasportas, L. S., Kempen, P. J., Niedringhaus, T. P., ve Gambhir, S. S. (2014). A tunable silk–alginate hydrogel scaffold for stem cell culture and transplantation. *Biomaterials, 35(*12), 3736–3743.