BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

HİDROJEL BİYOMÜREKKEPLER İLE 3 BOYUTLU YAPILARIN OLUŞTURULMASI VE CİVCİV KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİNDE ANJİYOGENEZE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

HAZIRLAYAN

EMİNE HİLAL YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA- 2023

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

HİDROJEL BİYOMÜREKKEPLER İLE 3 BOYUTLU YAPILARIN OLUŞTURULMASI VE CİVCİV KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİNDE ANJİYOGENEZE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

HAZIRLAYAN

EMİNE HİLAL YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ ORHAN ERDEM HABERAL

ANKARA- 2023

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Emine Hilal Yıldırım tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:29/03/2023

Tez Adı: Hidrojel Biyomürekkepler ile 3 Boyutlu Yapıların Oluşturulması ve Civciv Koryoallantoik Membran Modelinde Anjiyogeneze Etkilerinin Araştırılması

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı- Soyadı, Kurumu)	**İmza**
Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ, Başkent Üniversitesi	..……..
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YÜKSEKKAYA, Ankara Üniversitesi	..……..
Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL, Başkent Üniversitesi	..……..

ONAY

Prof. Dr. Ömer Faruk Elaldı
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih: / / 2023

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORİJİNALLİK RAPORU

Tarih:06 /04 / 2023

Öğrencinin Adı, Soyadı: Emine Hilal YILDIRIM

Öğrencinin Numarası: 21920271

Anabilim Dalı: Biyomedikal Mühendisliği

Programı: Tezli Yüksek Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL

Tez Başlığı: Hidrojel Biyomürekkepler ile 3 Boyutlu Yapıların Oluşturulması ve Civciv Koryoallantoik Membran Modelinde Anjiyogeneze Etkilerinin Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 72 sayfalık kısmına ilişkin, 05/04/2023 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %11'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyaz ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Tarih: 06/ 04 /2023

Öğrenci Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösterici tüm paylaşımları yapan değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL'a, teşekkürlerimi sunarım.

Varlığını öğrendiğim günden itibaren karnımda benimle bu serüvene başlayan biriciğim, en büyük hazinem, en iyi dostum sana bu mirası bırakacağım için çok mutluyum. İlerde annen ile gurur duymanı temenni ederek başladığım bu yolda, senin için her şeyi yapabileceğimi bana hissettirdiğin için canım oğlum Aslan YILDIRIM'a teşekkür ederim.

İyi kötü her anımda yanımda olan hayat arkadaşım, tüm zorluklara karşı mücadele edebileceğime inandırıp her zaman bana güvendiğini biliyorum. Bu süreçte desteklerini hiçbir zaman esirgemeyip ve beni yalnız bırakmadığı için sevgili eşim Alperen YILDIRIM'a, teşekkürlerimi sunarım.

Canım ailem, kardeşim ve benim eğitimimiz konusunda her zaman çok hassas ve özenli davranmışlardır. Hayatım boyunca verdikleri destekler kıyaslanamayacak kadar büyüktür ve hiçbirinin hakkı ödenmez. Babam Zinnur ÇOBAN, Annem Arzu ÇOBAN ve geleceğin başarılı tıp doktorlarından olacak kardeşim Aslınur ÇOBAN'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Emine Hilal YILDIRIM

HİDROJEL BİYOMÜREKKEPLER İLE 3 BOYUTLU YAPILARIN OLUŞTURULMASI VE CİVCİV KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİNDE ANJİYOGENEZE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı
2023

Yapılmış olan literatür araştırmalarından yola çıkıldığında, koryoallantoik zar ve anjiyogenez gelişimi deneyinde hidrojel ile etkileşimlerinde, biyo yazıcıdan çıkarılan hidrojel baskısının sayede koryoallantoik zar modeli (CAM) ile çalışıp, entegresi gerçekleştiğindeki anjiyogenez sürecinin izlenmediği görülmüştür. Bahsi geçen model, yeni damar oluşumunda kantitatif ölçüme imkan sağlamalıdır bu sayede koryoallantoik zar modeli (C AM) ile biyo yazıcı aracılığıyla baskısı alınan hidrojel ile arasındaki fiziksel oluşum izlenebilecektir. Kan damarı oluşumu değerlendirildiğinde birden fazla hücre tipinin ve sayıca fazla molekülün katıldığı kompleks çok basamaklı bir süreçtir. Anjiyogenez süreci izlenildiğinde, süreci pozitif ve negatif etkileyen moleküller arasındaki dengeye bağlı kontrol edilir. Buna "anjiyojenik anahtar" adı verilir. Yapılan literatür araştırmalarından yola çıkarak hidrojeller, yüksek oranda suyu bünyesine alıp "şişme" özelliği oluşturabilen çapraz bağlı homo ya da kopolimerik sistemler ağıdır. Suda çözünemeyip şişebilen yani suyun büyük kısmını yapı içerisine alabilen, üç boyutlu polimerik şebekelerdir. Jelatin, agar ve aljinatlar hem doğal hem de sentetik polimerler grubundadır. Proje kapsamında üretilen aljinat içerikli hidrojellerin 3 Boyutlu Yazıcıdan alınan baskılar, püskürtme yöntemi ile çapraz bağlanarak oluşturulmuştur. Literatür araştırmalarına bakıldığında, çapraz bağ oluşturulurken genelde UV ışın yolu ile yapıldığı gözlemlenirken; CaCl2 ile buhar püskürtme yöntemi denenip, gözlemlenmiştir.

Hidrojellerin modellemesi yapılırken Cura programı kullanılmıştır. Bu program sayesinde, istenilen geometri ve boyutlarda 3 boyutlu hidrojel üretimi gerçekleşmiştir. Bu ara yüz, aynı zamanda solüsyonların şırınga ucuna aktarımını sağlayan mekanizmanın konumlandırmasına izin vermektedir.

Anjiyogenez araştırmalarında sıkça kullanılan, yoğun vaskülarize yapıda olan civciv embriyo koriyoallantoik membran modeli (KAM), faydalı bir in vivo sistemdir. Anjiyogenez Araştırma Laboratuvarımızda deney hayvanlarına alternatif olarak kullanılır. Bu model, embriyolu yumurta kullanımına dayanan CAM modeli olarak bilinir. CAM modeli anjiyogenez çalışmalarında sıklıkla kullanılan uygun bir çalışma modelidir. Laboratuvar ortamında, kimyasal reçeteler, düzenleyerek oluşturulacak hidrojelin biyo baskılanabilir özelliğinden yararlanılarak anjiyogenez süreci fizyolojik olarak cam modelinde gözlemlenmiştir. Proje kapsamında, deneme yöntemleriyle geliştirilen hidrojelin, cam modelindeki damar yapılarının değişimi ve etkisi incelenmiştir.

Proje kapsamında; damar oluşumunda önemli bir parametresi olan anjiyogenezin doku iskelesi yapımında sık kullanılan progesterondan nasıl etkilendiği civciv yumurtalarındaki koryoallantoik zar modeli aracılığıyla anjiyogenez gelişimi deneyi ile araştırılmıştır.3 farklı gruba ayrılan yumurtalar üzerindeki farklı kombinasyonlardaki progesteronun etkisine bakılmıştır. Her grup, kontrol grubu ve diğer gruplar ile karşılaştırıp genel bir sonuç elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: 3 Boyutlu Biyo Yazıcı, Biyo Mürekkep,3 Boyutlu Yazıcı, Aljinat, Cura, Cam Modeli, Anjiyogenez, Hidrojel, Progesteron

Başkent Üniversitesi, Proje No: DA22/32

ABSTRACT

Emine Hilal YILDIRIM

CREATION OF 3D STRUCTURES WITH HYDROGEL BIOINKS AND INVESTIGATION OF EFFECTS ON ANGIOGENESIS IN CHICK CHORIOALLANTOIC MEMBRANE MODE

Department of Biomedical Engineering

2023

Based on the literature research, it was observed that the angiogenesis process was not followed when the hydrogel print extracted from the bioprinter worked with the chorioallantoic membrane model (CAM) and was integrated in the interaction with the hydrogel in the chorioallantoic membrane and angiogenesis development experiment. The aforementioned model should enable quantitative measurement of neovascularization, so that the physical formation between the chorioallantoic membrane model (CAM) and the hydrogel printed by the bioprinter can be monitored. When blood vessel formation is evaluated, it is a complex multi-step process in which more than one cell type and large number of molecules participate. When the angiogenesis process is monitored, it is controlled depending on the balance between the molecules that affect the process positively and negatively. This is called the "angiogenic switch". Based on the literature research, hydrogels are a network of cross-linked homo or copolymeric systems that can absorb a high amount of water and create a "swelling" feature. They are three-dimensional polymeric networks that cannot dissolve in water and swell, that is, they can take most of the water into the structure. Gelatin, agar and alginates are in the group of both natural and synthetic polymers. The prints taken from the 3D Printer of the hydrogels containing alginate produced within the scope of the project were created by crosslinking by spraying method. When we look at the literature research, it is observed that the cross-linking is generally done by UV light; Steam spraying method with CaCl2 was tried and observed.

Cura program was used while modeling hydrogels. Thanks to this program, 3D hydrogel production was realized in the desired geometry and dimensions. This interface also allows the positioning of the mechanism for transferring solutions to the syringe tip.

The chick embryo chorioallantoic membrane model (CAM), which has a dense vascular structure and is frequently used in angiogenesis studies, is a useful in vivo system. It is used as an alternative to experimental animals in our Angiogenesis Research Laboratory. This model is known as the CAM (chick chorioallantoic membrane) model, which is based on the use of eggs with embryos. The CAM model is an appropriate study model that is frequently used in angiogenesis studies. In the laboratory environment, the angiogenesis process was observed physiologically in the model by utilizing the biorepressible feature of the hydrogel to be formed by editing chemical prescriptions. Within the scope of the project, the change and effect of the vein structures in the CAM model of the hydrogel, which was developed by trial methods, were examined.

In project scope; How angiogenesis, which is an important parameter in vessel formation, is affected by progesterone, which is frequently used in tissue scaffolding, was investigated by means of the chorioallantoic membrane model (chorioallantoic membrane-CAM) in chick eggs. The effect of progesterone in different combinations on eggs divided into 3 different groups was investigated. A general result was obtained by comparing each group with the control group and other groups.

KEYWORDS: 3D Bio Printer, Bio Ink,3D Printer, Alginate, Cura, CAM Model, Angiogenesis, Hydrogel, Chitosan, Progesterone

Baskent University, Project No: DA12/32

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **ii**

ABSTRACT ..... **iv**

İÇİNDEKİLER ..... **vi**

TABLOLAR LİSTESİ ..... **ix**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **x**

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ ..... **xii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Çalışmanın Konusu **2**

1.2. Çalışmanın Amacı **3**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. Biyo Baskılama **4**

2.2. Biyoyazıcı **4**

2.2.1. Biyoyazıcı Çeşitleri **5**

2.2.1.1. İnkjet Biyoyazıcılar **6**

2.2.1.2. Mikroekstrüzyon Biyoyazıcılar **6**

2.2.1.3. Lazer Destekli Biyoyazıcılar **8**

2.3. Biyo Çözelti **8**

2.3.1. Biyobozunma kinetiği **9**

2.3.2. Mekanik özellikler **9**

2.3.3. Biyoçözeltinin sahip olması gereken baskılanabilirlik özellikleri **10**

2.4. Jelleşme ve Çapraz Bağlanma **10**

2.5. Hidrojeller **11**

2.5.1. Hidrojellerin Şişebilme özellikleri ve karakteristikleri **12**

2.5.2. Hidrojellerin Sentezi **13**

2.5.2.1. Kimyasal Çapraz Bağlanma ile Hidrojel Hazırlanması **13**

2.5.2.2. Hidrojellerin sınıflandırılması **14**

2.5.2.3. Hidrojellerde Suyun Konumu ve Karakteristiği **15**

2.5.2.4. Hidrojellerin Kullanım Alanları 16
2.5.2.5. Hidrojellerin Adsorban Olarak Kullanılması 17
2.6. Biyo Mürekkep 17
2.6.1. Biyouyumluluk 18
2.6.2. Hidrojel İçerikli Biyo Mürekkepler 19
2.7. Biyoyazıcılarda kullanılan hidrojeller 20
2.7.1. Aljinat 20
2.8. Hidrojellerin İlaç Salınımında Kullanılması 21
2.8.1. İlacın jel içine enkapsülasyon yöntemleri 22
2.8.1.1. İlacın jel içine direkt olarak eklenmesi 22
2.8.1.2. Hidrojel İçerisindeki Ayrık Salım Sistemleri 23
2.8.1.3. Hidrojele Kovalent Bağlı Sistemler 23
2.9. Anjiyogenez ve Modelleme 24
2.9.1. Anjiyogenez Süreci 25
2.9.2. İdeal Anjiyogenez Modelleri 27
2.10. CAM Modeli 27
2.10.1. CAM Modeli Uygulaması 28
2.10.1.1. CAM Uygulamalarının Avantajları 29
2.10.1.2. CAM Uygulamalarının Dezavantajları 30
3. MATERYAL VE METOT 32
3.1. 3 Boyutlu Biyoyazıcının Güncel Tasarımı 32
3.1.1. Biyoyazıcıda Kullanılan Şırınga Modeli 32
3.1.2. Biyoyazıcıda Kullanılan Buhar Püskürtücü 35
3.2.1. Marlin Yazılımı 37
3.2.3. Repetier-Host Uygulaması 38
3.3. 3 Boyutlu Modelleme 39
3.4. 3 Boyutlu Yazıcının Denenmesi 41
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 44
4.1. Kimyasalların Hazırlanması 45
4.2. Progesteron ilaveli Jelin Hazırlanması 45
4.3.1. Sodyum Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması 47

4.4. Aljinat İçerikli Baskıların Karşılaştırılması 50
4.5. Baskısı Planlanan 3 Boyutlu Hidrojellerin Cura Yazılımındaki Ayarları .. 52
4.6. Biyoyazıcıda Basılmış Hidrojel Örnekleri 55
4.7. CAM Modeli için Döllenmiş Yumurtaların Hazırlanması 57
5. SONUÇ VE TARTIŞMA 62
5.2. Bulgular 62
5.2.1. Deney Sonucundaki Kıyaslama Görüntüleri 70
6. TARTIŞMA 73
6.1. Deney Kısıtları 73
KAYNAKLAR 74

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2. 1. CAM Modeli ile Çalışmanın Avantajları ve Dezavantajları 31

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Biyoyazıcı Türleri 5
Şekil 2. 2. Biyomürekkep Seçiminde Dikkat Edilmesi Gereken Özellikler 9
Şekil 2. 3. Çapraz Bağlanmış Hidrojel Yapısının Görüntüsü 12
Şekil 2. 4. Şişmiş Bir Hidrojeldeki Suyun Konumu 16
Şekil 2. 5. Aljinatın Kimyasal Formu 20
Şekil 2. 6. Koriyoallantoik Membran Modelinin Fiziken Olumsuz Etkilenmesi 30
Şekil 2. 7. Uygulama sonrası CAM yüzeyi ile hava temasının kesilmesi 31
Şekil 3. 1. Biyoyazıcıda Kullanılan 1,5 mm yarıçaplı Şırınga ve İğnesi 33
Şekil 3. 2. Biyoyazıcıda çift şırınga denemesi 34
Şekil 3. 3. 2 Çift şırınga modelinde aljinat ile dolu olan hortuma takılan valf 35
Şekil 3. 4. Biyoyazıcı 35
Şekil 3. 5. Baskıda Kullanılan Buhar Püskürtücü 36
Şekil 3. 6. Repetier dilimleme örneği 39
Şekil 3. 7. Cura Yazılımında baskı parametrelerinin ayarlanması 40
Şekil 3. 8. Cura Ultimaker yazılımında Grid geometrisinin x,y,z düzlemindeki görüntüsü 40
Şekil 3. 9. Denemeler Yapılan Biyoyazıcı 41
Şekil 3. 10. CaCl2 Bulunan Baskı Tabanı 43
Şekil 4. 1. Kimyasal Çözeltide Kullanılan Progesteron Tablet 45
Şekil 4. 2. Progesteron Eklenmiş Aljinat Çözeltisinin Karıştırıcıda Karıştırılması 46
Şekil 4. 3. %2'lik Kalsiyum-Klorür Çözeltisi 47
Şekil 4. 4. Aljinat Çözeltisinin Saklanma Hazırlığı 48
Şekil 4. 5. 5Eklenilecek Aljinat Tozu Miktarının Hassas Terazide Ölçülmesi 49
Şekil 4. 6. %3'lük Sodyum Aljinat Çözeltisi 49
Şekil 4. 7. Çözeltilerin Ultrasonik Temizleyicide Temizlenmesi 49
Şekil 4. 8. %3'lük Aljinat İle Yapılmış Bir Deneme 50
Şekil 4. 9. %3'lük Aljinatın Kırmızı Mürekkep ile Renklendirilerek Baskı Alınması 51
Şekil 4. 10. %3'lük Aljinatın Kırmızı Mürekkep ile Basılması 51
Şekil 4. 11. Grid Geometrisi için Şekil Ayarları 53

Şekil 4. 12. x,y,z Düzleminde Grid Şekli 53
Şekil 4. 13. Gyroid Geometrisi için Şekil Ayarları 53
Şekil 4. 14. x,y,z Düzleminde Gyroid Şekli 54
Şekil 4. 15. Triangle Geometrisi için Şekil Ayarları 54
Şekil 4. 16. x,y,z Düzleminde Triangle Şekli 55
Şekil 4. 17. Katman Basılmış Triangle Geometrisi 56
Şekil 4. 18. Katman Basılmış Gyroid Geometrisi 56
Şekil 4. 19. Katman Basılmış Lines Geometrisi 57
Şekil 4. 20. Etüve Konulmadan Önce Yumurtaların Alkol ile Silinmesi 58
Şekil 4. 21. Etüvde Bekletilen Yumurtalar 58
Şekil 4. 22. 6.Gün Damarlanma Kontrolü Yapılan Yumurta Örneği 59
Şekil 4. 23. Alkolle Silinip Kabuğu Açılmış Yumurta Örneği 60
Şekil 4. 24. Yumurtanın İç Yapısına Triangle Geometrisi Eklenirken 60
Şekil 4. 25. Gruplanıp 3 Farklı Geometride Hidrojel Eklenmiş Hali 61
Şekil 5. 1. 0 Numaralı Yumurta 63
Şekil 5. 2. 1 Numaralı Yumurta 64
Şekil 5. 3. İlaç Salınımından Sonra 1 Numaralı Yumurta 65
Şekil 5. 4. 2 Numaralı Yumurta 66
Şekil 5. 5. İlaç Salınımından Sonra 2 Numaralı Yumurta 67
Şekil 5. 6. 3 Numaralı Yumurta 68
Şekil 5. 7. İlaç Salınımından Sonra 3 Numaralı Yumurta 69
Şekil 5. 8. 0-1-1' görüntüsü 70
Şekil 5. 9. 0-2-2' görüntüsü 70
Şekil 5. 10. 0-3-3' görüntüsü 71

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Au	Altın Elementi
CAD	Bilgisayar Destekli Tasarım
CAM	Ayrık Fourier Dönüşümü
CaCl2	Kalsiyum Klorür
ETB	Ekstrüzyon Tabanlı Biyobaskı
PVA	Polivinil Alkol
Ti	Titanyum Elementi
UV	Ultraviyole
3B	3 Boyutlu

1. GİRİŞ

Gelişen teknoloji çağına bakıldığında Dünya kapsamında 20. ve 21.yy' da teknolojik anlamda hızla büyüyen bir gelişme yaşamaktadır. Özellikle 21.yy'da çok fazla alanda ilerleme izlenir. Sektörel gelişmelerde başlıca sağlık sektörünün gelişmesi mevcuttur. Sağlık sektöründe; 3 boyutlu yazıcılar, 3 boyutlu tasarımlar, ilaç salım sistemleri biyomedikal mühendisliği alanında geniş bir içerik oluşturmaktadır.

Dünyadaki teknolojik gelişmeler sayesinde, 3 boyutlu yazıcıların kullanım alanları arttıkça günlük hayatımızda sıkça bu yazıcıların türlerine rastlanmaktadır. Çoğu alanda olduğu gibi sağlık alanında da insanlar baş rol olmuştur. Bilgisayar ortamında, tasarımı belirlenen ve ihtiyaçlar doğrultusunda tasarımı hazırlanan nesnelerin somut hâle getirilebiliyor olması bu teknolojiyi kullanan kişilere büyük bir kolaylık sağlar ve herkesin her nesneyi üretebilme hayalini kurdurmaktadır [1].

Klinik medikal alanında alınan kararların %70'i laboratuvar testlerine dayandırılıp sonuçlandırılmıştır. Bu testler ile elde edilen bulgular hastada gerçek değerler olduğu kabul edilir. Üç boyutlu (3B) biyo baskılama yöntemi, karmaşık dokuların veya organların, baskılama teknolojilerinin kullanılarak üretildiği gelişmekte olan yeni bir yöntemdir. 3B biyo baskılama işleminde yüksek oranda hücre yoğunluğu kullanımı ve tasarlanan geometride yapılan otomatikleşmiş, üretim sayesinde yeni doku oluşumuna gidilebilmektedir. Ayrıca bu yöntem sayesinde biyomalzemeler içerisinde hücrelerin kontrollü bir şekilde yerleşimine izin verir [2].

Anjiyogenez diğer bilinen ismi ile kılcal damarlanma, daha önce oluşmuş damarlardan yeni damarlar oluşma sürecine denir. Organizmaların, fizyolojik etkileşimlerinde denk gelinir. Ayrıca kanserli hücrelerin oluşum sürecinde ve vücuda dağılmasında da büyük rol almaktadır. Doku iyileşmesi en önemli rollerindendir bu fiziki gelişim kılcak damasrlasrın oluşması ile gerçekleşmektedir [3].Anjiyogenez gözlemlenirken ve analitik işlemlerinde kullanılan model civciv koryoallantoik zar (CAM) modelidir. CAM, in vivo modeldir. Bahsi geçen koryoallantoik zar, döllenmiş tavuk yumurtasında sahip oldunan ince yapılı 3 farklı katmandan oluşan ve çok sayıda dallanmış kan damarlarından oluşan bir yapılanmadır. Bu özellikleri sayesinde memeli canlılardaki plasentaya benzemektedir [3].

Çalışma konumda CAM deneyini seçmemdeki amaç; seçili embriyonun kendisine zarar verilmeden sadece damarlı dış zar yüzeyinde çalışılabilir olmasıdır. Zarın yüze

kısmında sinir hücresi bulunmadığı için embriyo acı hissetmez. Ayrıca, deney boyunca oluşabilecek olumlu ve olumsuz etkileri gözlemlemek için ideal bir in-vivo ortam sağlanmaktadır [4]. Döllenmiş yumurtada gelişimi de hızlı olduğu için değerlendirmenin de hızlı ve görünürdür. Bu sayede CAM modeli damar oluşumlarını artış ve azalışlarının izlenmesinde çok yararlıdır. Damarlanmaya etki eden faktörler benzer çalışmalarda incelenmiştir (Büyüme faktörleri, hormonlar, doğal moleküller, antikanser ajanlar, antibiyotikler, antikorlar...) [5].

1.1. Çalışmanın Konusu

Biyo yazıcı tarafından üretilmiş protez ve insan vücuduna ait parçaları sıra dışı gibi gelebilir; fakat gelişen teknoloji çağımızda, biyoyazıcıların onarıcı tıbba çok fazla katkı sağlayabileceği ön görülmektedir. Herhangi bir somut örneğe uyarlama uygulamalarında, biyoyazdırma işlemlerinde gelişmelere rağmen birçok sorunla karşılaşılmaktadır.

Biyolojik mürekkebi yani biyomürekkebi fiziken ve kimyasal anlamda işleyerek kendi üzerine yapışmasını sağlamak ve basılan jel yapısını tutmak özellikle mürekkep püskürtmeli basımda oldukça zor bir iştir. Günümüz teknolojisinde biyolojik mürekkep damlalarının birbirine yapışmasını sağlamak için belirli yöntemler mevcut ve bunlar da her hücre tipine uygun olmayıp, işe yaramıyor. Bu genellemenin sağlanamaması nedeniyle yeni alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürdeki araştırmalarına bakıldığında, biyolojik mürekkep damlalarını birbirine yapıştıran, enzimle çalışan bir yaklaşım geliştirildiği görülmüştür. Bu yaklaşım, kompleks biyolojik yapıların üretilebilmesini sağlıyor.

Biyobaskılarda, biyomürekkebin yeterince düşük viskoziteye sahip olması ve bunun dışında basım prosesi başladığında hızlıca yeteri kadar jel benzeri yapı oluşturması gerekiyor.

Günümüzde biyolojik basımda kullanılan en yaygın biyoyazıcı sodyum aljinat mürekkep püskürtmeli türüdür. Bu tür basımlarda kullanılan en temel jelleştirici aljinasttır. Ancak aljinatın bazı hücre tipleri ile uyumluluk sorunları vardır.

Proje kapsamında; doku iyileşmesinin önemli bir parametresi olan anjiyogenezin doku iskelesi yapımında sık kullanılan progesteron hormonundan nasıl etkilendiği seçilen farklı geometrilerdeki aljinat tabanlı hidrojeller ile, civciv yumurtalarındaki koryoallantoik

zar (CAM) anjiyogenez gelişimi deneğiyle araştırılmıştır. Progesteronun, anjiyogenez üzerinde olabilecek etkisinin seçilen farklı geometrideki baskılarla azalıp azalmayacağı test edilmiştir.3 farklı gruba ayrılan yumurtalar üzerindeki farklı kombinasyonlardaki geometrilerin ve progesteronun etkisine bakılmıştır. Progestojen adlı bir hormonlar grubuna ait progesteron hormonu büyüme hormonudur. Kimyasal özellikleri sayesinde dölllenmiş yumurtanın büyümesine ve gelişmesini sağlamaktadır.

Doku iyileşmesinin önemli bir parametresi olan anjiyogenezin doku iskelesi yapımında da sık kullanılan progesteron hormonundan nasıl etkilendiği CAM deneyi ile bakılacaktır. Progesteronun anjiyogenez süreci üzerinde oluşabilecek negatif veya pozitif etkinin seçilen hormon ile (progesteron) azaltılıp azaltılamayacağı araştırılmıştır. Deneyin sonucunda beklenen sonuç, progesteron büyüme hormonunun seçilen 3 farklı geometriye baskısı alınmış hidrojellere entegresinin gerçekleştirilip, civciv koryoallantoik zar modeline yerleştirilip, anjiyogenez gelişimini izleyerek; geometri farklılığının ilaç salınımına etkisini analizleyebilmektir.

1.2. Çalışmanın Amacı

Yapılan literatür araştırmalarında, 3 boyutlu yazıcıdan basılan hidrojel yapının mekanik açıdan kullanılabilmesi için çapraz bağlanması gerektiği sonucuna varılmaktadır. Bu aşamada vurgulanmak istenen nokta, farklı bir metot deneyerek buhar formunda çapraz bağlayıcı kullanarak püskürtme yöntemi ile hidrojeli çapraz bağlamak amaçlanmaktadır.

Bu tez çalışmasının temel amacı literatürdeki yöntemlerin bazılarının birleştirerek anjiyogenez sürecini izleyip, büyüme ve gelişme ile yara iyileşmesi gibi süreçlerin olmasının beklenmesidir. Özgün tasarımlı hidrojelin farklı geometriler ile ve etken maddeler eklenerek tasarlanacak biyo baskılar ile CAM modeline uygulanarak anjiyogenez etkileri araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyo Baskılama

Baskılama yöntemleri seçeneklerinde en sık kullanılan alan kâğıdın üzerine mürekkep kullanarak yazılan metin veya resimlerin baskılama işlemidir.1440'larda Johannes Gutenberg'in matbaayı icat etmiştir ve bunun üzerine çalışmalar başlamıştır [6], [7]. Charles Hull tarafından 1986 yılında Üç boyutlu (3B) yazıcılar keşfedilmiştir. Özel bir yöntem sayesinde tabaka tabaka basım işlemi sonucunda tanımlanmışlardır. Sistem içeriğinde x ve y eksenlerine başlangıç malzemesini yerleştirebilecek, püskürtebilecek bir yazılım ile, her bir tabakanın yerleşmeyi tamamlamasının ardından z ekseni üzerinde hareketini gerçekleştirecek bir sistem içermektedir. Tabaka tabaka baskı alınmasının ardından yazıcı bir sonraki tabakaya geçmeden önce baskılanmış olan tabakanın katılaşmasını bekler.Bu bekleme sürecinde, hidrojel ile çalışırken çapraz bağlama süreci başlamalıdır. Bu sayede, 3 boyutlu baskı alma işlemi esnasında, baskısı tamamlanmış bir önceki tabaka,bir sonraki baskı için temel görevi görmektedir ve böylece işlem "tabaka tabaka" ilerlemektedir. Günümüzdeki kullanımlara bakıldığı takdirde 3 boyutlu yazıcı teknolojisinin, malzeme ve biyolojik gelişimleri içeren bilimleri bir araya gelerek çalışmaya başladığı bilinmektedir [8]. Biyoyazıcılar, 3 boyutlu dokuların veya organların özel yazdırma tekniklerini kullanarak oluşturulduğu bir basım yöntemidir [9]. Bu yöntem ile biyomalzemelerin içerisindeki hücreler kontrollü bir şekilde yerleşir. İşleyişi özel olan uygulamalar sayesinde hücreler,biyomalzemeler diğer biyoaktif moleküllerin dokuları taklit edebilme yeteğine sahip kompleks ve hassas yapıları oluşturma esnasında tabaka tabaka konumlandırılabilmektedir. Biyoaktif moleküllerin ve hücrelerin biyomalzemeler ile bir arada veya ayrı ayrı; baskı uygulamasının özelliğine bakarak baskılanabilirlerdir. Böylece doku iskelesi görevini üstlenebilirler [8],[9].

2.2. Biyoyazıcı

Çevremizde bilinen 3 boyutlu yazıcılarla kıyaslandığında, mürekkep yazıcılara benzerliği anlamında üç ana bileşeni vardır. Bu üç ana bileşen: donanım türü, kullanılacak biyo mürekkebin türü ve üzerine basılacak malzeme türüdür [10]. Biyoyazıcılarda, biyo-mürekkep sıvı görevini üstlenmektedir. İstenilen üç boyutlu şekli oluşturmak için

yazdırılmasını sağlar ve de canlılığını sürdüren hücrelerden yapılmış bir malzemedir. Biyo mürekkebi oluşturmak için, biyo kağıt olarak bilinen içi jel dolu bir kartuş ile canlı hücre karışımları biyoyazıcının içine konularak biyo mürekkep oluşturulur.

Biyolojik içerikli alınan baskılarda kullanılan üç adet özel biyoyazıcı türü vardır. Mürekkep püskürtmeli yazıcı, lazer destekli yazıcı ve ekstrüzyon yazıcılardır. Hızlı ve büyük boyuttaki yapılacak tasarımlar için kullanılan mürekkep püskürtmeli yazıcılardır. Mürekkep püskürtmeli yazıcılar, kullanılan malzemeler benzer örneklerde yazdırılarak toplam maliyeti ve atığı en aza indirmektedir. Lazer destekli yazıcılarda, lazer kullanılarak alınan yüksek çözünürlüklü yazıcılar aracılığı ile sağlanır; ancak bu yazıcılar mürekkep püskürtmeli yazıcılar ile kıyaslandığında daha pahalı ve maliyeti yüksektir. Ekstrüzyon yazıcılarda, 3 boyutlu yapılar oluşturmak için 3 boyutlu baskıda olduğu gibi hücreleri de katman katman yazdırır. Hücreler yerine su ile şişmiş üç boyutlu hidrojel de kullanabilir [11], [12].

2.2.1. Biyoyazıcı Çeşitleri

Biyoyazıcı çeşitlerinde üç türde biyo yazıcı çeşidi bulunmaktadır. Bu türler, biyolojilk malzemelerin birbirini takip ederek düzenlenmesini sağlamaktadır. İnkjet biyoyazıcı [11],[13]mikro ekstrüzyon biyoyazıcı,[12] ve lazer destekli biyoyazıcı [12]. Şekil 2.1'de bu üç biyoyazıcı çeşidinin çalışma prensipleri gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. Biyoyazıcı Türleri

a) İnk-jet biyoyazıcı sistemler b) Mikroekstrüder biyoyazıcı sistemler c) Lazer destekli biyoyazıcı sistemler [12]

2.2.1.1. İnkjet Biyoyazıcılar

Hücrelerin kartuş kutusu içerisinden damla damla basılabildiği yazıcı türü inkjet tabanlı biyo yazıcı sistemleridir. İlk kez kullanılan biyolojik inkjet biyoyazıcı 2 boyutlu ink jet yazıcının modifiye edilmesinin ardından ticari amaçla bulunmuştur. İnkjet biyoyazıcıların sistemine bakıldığında kartış kutusu içerisindeki mürekkep, biyouyumlu malzeme ile kağıt ise z ekseninin kontrolünü sağlayacak kaldıraçlı basamak mekanizması ile yer değiştirmiştir. İnkjet biyoyazıcılar, termal ve akustik olarak substrat alanının üzerine biyouyumlu malzemenin termal ve akustik olarak substrat alanının üzerine püskürtülmesi prensibi ile inkjet biyoyazıcılar oluşur.

2.2.1.2. Mikroekstrüzyon Biyoyazıcılar

Mikroekstrüzyon biyoyazıcı sistemleri endüstriyel alanda kullanılan biyoyazıcılardır, pahalı ve yüksek çözünürlüktedirler. Kullanılan sıcaklık kontrolü gerçekleştiren malzeme işleme aparatı, kamera,x, y, z hareketlerini gerçekleştiren kontrol paneli ve dağıtıcı sistem vardır. Bu sistem parçaları sayesinde daha yüksek hızda ve kontrol edilebilir özelliktedirler [14]. Mikroekstrüzyon biyoyazıcıların çalışma prensinin temeli, substrat yüzeyi ile mikroekstrüzyon başlığı üzerine konulan malzeme veya malzemelerin ekstrüzyonunun robotik olarak tek taraflı kontrol edilmesine dayanmaktadır.

Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı (ETB) tekniği sıvı dağıtım sisteminin bir kombinasyonudur ve otomatikleştirilmiş bir sistemdir. Biyolojik baskı bilgisayar sistemi kontrolü altında gerçekleşir. Silindirik filamentlerde kapsüllenmiş hücrelerin hassas birikimi ile özel 3 boyutlu yapılar elde edilir. Bu yöntem daha iyi yapısal bütünlük sağlar ve aynı zamanda bilgisayar destekli tasarım (CAD gibi) ile kolayca birleştirilebilir.

Ekstrüzyon tabanlı biyo-baskı yöntemi diğer yöntemler ile kıyaslandığında bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir. ETB tekniği ile damlacık tabanlı biyo-baskı (mürekkep püskürtmeli, elektrodinamik püskürtme), elektro hidrodinamik püskürtme ve akustik damlacık çıkarma veya lazer tabanlı biyobaskı (stereolitografi ve modifikasyonları), lazer güdümlü doğrudan yazma ve lazer kaynaklı ileri transfer gibi diğer biyobaskı teknikleri kıyaslandığındaki avantajları aşağıdaki gibidir.

Avantajları:

- Daha fazla biriktirme ve baskı hızına sahiptir ve nispeten kısa bir süre içinde ölçeklenebilirliği kolaylaştırabilir.
- Donanım uygun maliyetlidir ve geniş bir biyo-baskı teknolojileri yelpazesi ticari olarak mevcuttur.
- Uygulanması kolaydır
- Yüksek hücre yoğunluğu şu anda yalnızca ETB teknolojileri ile mümkündür ve diğer tekniklere göre kıyaslanırsa daha küçük hücre hasarları gözlenmiştir. Böylece oldukça biyouyumludur.

Dezavantajları:

- Ek olarak, ekstrüzyon ile silindirik filamentler elde etmek için damlacık oluşumuyla meydana gelen yüzey geriliminin üstesinden gelebilmek için, sıvı veya jel halindeki biyo-mürekkeplerin shear thinning yeteneğine sahip olması gerekir.
- Hücre yoğunluğu yüksek olduğunda nozül uçta shear stress meydana getirir. Bu nedenle büyük yapıların biyo-baskıya alınması hücre canlılığını etkiler. Hücre kültürü ortamına biyo-baskı uygulanmadığından hücreler açığa çıkar dehidrasyona ve besin eksikliğine neden olur.
- Öncelikle teknolojinin çözünürlüğü çok sınırlıdır. Minimum boyutu genellikle 100 mm'nin üzerindedir. Bu değerde diğer bio-baskı tekniklerine göre oldukça düşük bir çözünürlük değeridir. Bu nedenle hücreler sınırlı çözünürlük nedeniyle tam olarak biçimlendirilemez ve düzenlenemez.

2.2.1.3. Lazer Destekli Biyoyazıcılar

Lazer destekli biyoyazıcılar, lazer ile indüklenmiş iletim sistemine bağlı gerçekleşmektedir. Sistem içerisindeki gelişimlere bakıldığında günümüzde biyolojik malzemelerin biyoyazıcı ile yazılmasında da kullanılmaktadır. Lazer destekli biyoyazıcılarda taşınımı sağlayan ribon malzeme pulslu lazer ışığı ve biyolojik malzeme olan hidrojelve hücreler birleşim tabakalarından oluşur. Alıcı tabaka ise ribon malzeme karşısında konumlanmıştır. Ribon malzeme; üzerinde lazer ışığını emen altın elementi (Au) ya da titanyum elementi (Ti) içerikli kaplama tabaka bulunan cam bir yüzeydir. Ribon içerikli tabakanın, alt tarafı biyomalzeme eklenerek kaplanır ve ardından absorplayıcı tabakaya eklenir, ribon tabakada üretilmiş enerji ile yüksek basınçça sahip hücre yüklenmiş hidrojel oluşturarak kabarcığın toplayıcı yüzeye yönelerek ilerlemesini sağlar.

2.3. Biyo Çözelti

Günümüzdeki biyolojik uygulamalarda hassas ve karmaşık yapıların tabaka tabaka yerleştirilmesi boyutlu biyobaskılama işlemlerini sağlamaktadır. Biyobaskılama işlemlerini biyomalzemeler, hücreler ve diğer biyoaktif moleküller,dokuların rolünü oynayan yapılar oluşturmaktadır. Bu yöntem sayesinde hücreler ve biyoaktif moleküller hazırlanan biyoçözelti ile ya da ayrı ayrı baskılanabilmektedirler.

Hidrojeller, malzeme yapısı olarak ele alındığı zaman, başlıca özellikleri şekillerini koruyan ve yüksek oranda su içerebilme yetenekleridir. Bu sayede, hızlı bir şekilde şişebilen polimerik ağlar zinciri oldukları bilinmektedir.



Şekil 2. 2. Biyomürekkep Seçiminde Dikkat Edilmesi Gereken Özellikler [15]

2.3.1. Biyobozunma kinetiği

Vücudumuzda dinamik malzemelerden biri olan hidrojeller yeniden oluşum geçirip, düzenlenebilen ve süre içerisinde bozunma geçirebilme özelliklerine sahip biyomalzemelerdir. Bu polimerik zincirlerin bozunma nedenleri enzimler, tepkimeler veya iyon değişimleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Her yaşanan bozunma tepkimesinde kinetik etkileşim yapıları birbirinden farklıdır.Kimyasal bozunum tepkimelerdeki hız, polimer zincirindeki kesilme bölgelerinin toplam sayısına ve çevresindeki enzim konsantrasyonuna bağlıdır bu sayede kontrol edilebilirlerdir [14].

2.3.2. Mekanik özellikler

Hidrojellerin özellikleri arasında fiziksel ve mekanik nitelikler mevcuttur. Hidrojel seçimi yapılırken doku hedefi açısından ve baskı esnasında kullanılacak malzeme için ne kadar dayanıklı olduğuna da bakılmalıdır. Vücut içerisindeki dokuların sahip oldukları mekanik özelliklerin içeriğinde deri, yağ, kemik, kıkırdak ve kemik gibi sert dokulara kadar geniş bir skala vardır. Hidrojel seçiminde,uygulanacak dokunun mekanik özellikleri göz

önünde bulundurulmalıdır. Hidrojellerin mekanik özelliklerinden en önemlisi viskoelastik özelliğe sahip olmasıdır. Viskoelastik özelliği sayesinde yumuşak doku uygulamalarında da hidrojellerden yararlanılmaktadır. Biyobaskılama yöntemlerinde öncelikle hacmi belirli bir yapı hedeflenilmektedir. Biyobaskılama sisteminde tabaka tabaka eklenerek baskıyı üretmek için, her bir tabaka peşinden gelen bir sonraki tabaka için yapısal bir bütünlüğe sahip olmalıdır [16]. Bu özellik, seçilen polimer ile, polimerin sahip olduğu moleküler ağırlığı ve konsantrasyonuyla ayrıca elde edilen çapraz bağlanma derecesi ile ilgilidir. Bütün hidrojeller özgündür bu nedenle yapısal ve mekanik özellikleri birbirinden farklı olabilir.

2.3.3. Biyoçözeltinin sahip olması gereken baskılanabilirlik özellikleri

Hidrojeller, biyobaskı uygulamalarında birbirinden farklı özelliklere sahip olmaları ve birbirlerinden daha farklı şekilde olabilmeleri sayesinde yazılabilir olarak kabul edilmektedirler. Örnek olarak iki tür biyoyazıcıda baskı alınırken enjektör gerekirken; diğer biyoyazıcı türünde gerekmemektedir. Örnek olarak, vida tabanlı ve ink jet bazlı biyo yazıcı sistemlerinde, hidrojelin aktarılabilmesi için enjektör kullanılmaktadır. Bu iki biyoyazıcı türü dışında biyo yazıcı türlerinde enjektöre ihtiyaç yoktur.

2.4. Jelleşme ve Çapraz Bağlanma

Sağlık sektöründe 3 boyutlu baskılar incelendiğinde, en önemli bileşeni biyo mürekkeplerdir. Sağlık alanında kullanılan biyofonksiyonel mürekkeplerden, 3 boyutlu biyobaskılama işlemlerinde yararlanılır. Biyolojik anlamdan belirli kritiklere uygun olarak yazdırılabilen malzemelerdir [15].

Hidrojeller, yarı katı halle sahip oldukları polimer zincirlerinin birbirleriyle iletişime geçmesi sonucunda ulaşırlar. Hidrojelin yarı katı halinin koyulaşma sonucu katı hale gelmiş sıvı formdur. Bu fiziksel gerçekleşişin sonucunda, hücrelerin etrafının sarılırken yararlanılacak bir polimerik ağ örgüsünü çapraz bağlar oluşturur. Hidrojelin mekanizma döngüsünde fonksiyonlarına etki eden iki ana özelliği vardır: hidrojelin katılaşma ve çapraz bağlanma mekanizmalarıdır.

Hidrojellerin çapraz bağlanma durumu fiziksel ve kimyasal olarak ikiye ayrılır. Çapraz bağlanmalardaki fiziksel yöntemlere bakıldığında, iyonik etkileşimleri ve hidrojen

bağlarını oluşturmaktadır. Kimyasal yöntemlerin oluşumunda ise fotobaşlatıcı ya da enzim katalizörü kullanarak kovalent bağlar oluşturulur.

Hidrojeller öne çıkan çapraz bağlanma özelliklerine bakıldığında toplam dört gruba ayrılırlar:

"1- Isıya duyarlı olan hidrojeller,

2- İyonik olarak çapraz bağlanabilen hidrojeller

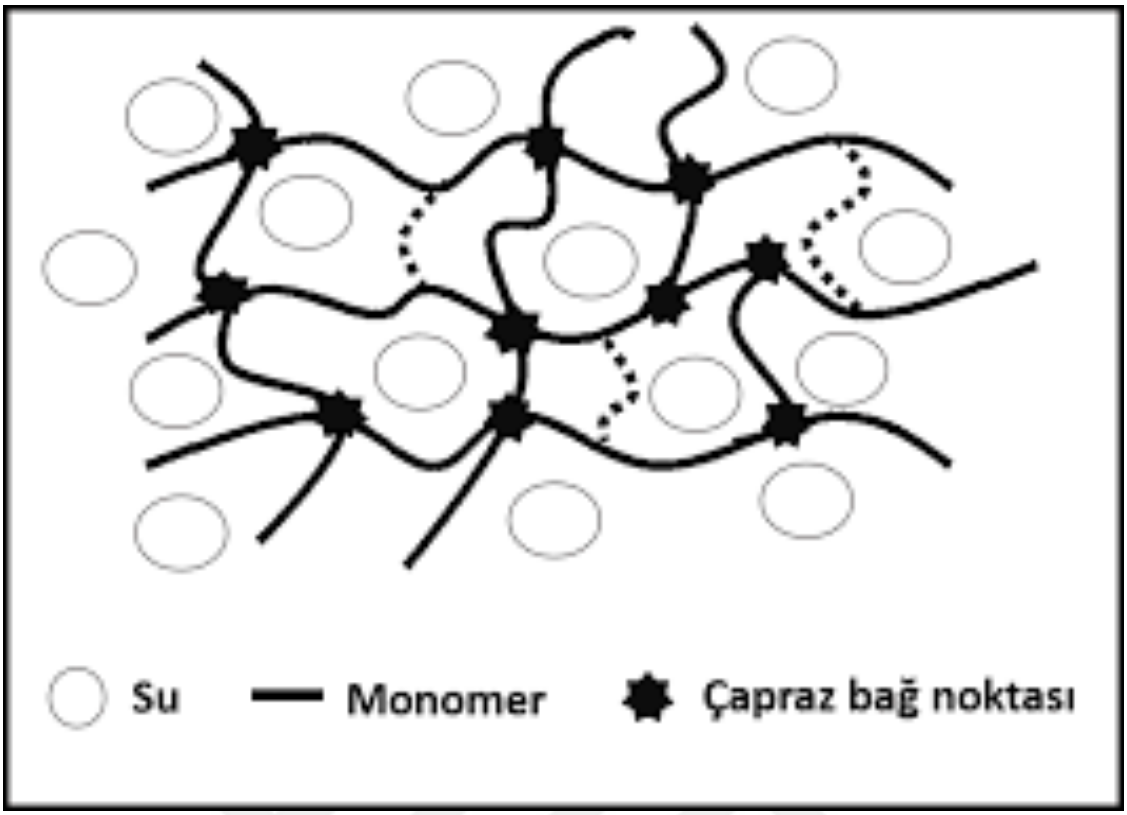
3- Enzimatik olarak çapraz bağlanabilen hidrojeller

4- Fotopolimerize olabilen hidrojellerdir" [17].

Örnek verilecek olursa, deney aşamasında kullanılan aljinatı ele aldığımızda, aljinatın çapraz bağları,hidrojen bağları tarafından oluşturulur. Hidrojel ortamına iki değerli katyonlar eklendiğinde (örn. Kalsiyum) tek değere sahip katyonlar ile yarışa girerler (örn. Sodyum) ve bu iki iyonun yarışı sonucunda karboksilik asit gruplarının bitişik glukuronik asit bloklarıyla çapraz bağlanabilmelerini sağlarlar. Bu yöntem sayesinde oluşması istenilen çapraz bağlar hızlıca bir anda oluşurlar.Enzimler vasıtasıyla hidrojeller çapraz bağlanır ve çoğunlukla polimer zincirinde bulunan belirli atıkların (glutamin ve lizin) arasındaki kovalent bağlanmaları sonucu oluşurlar [17].

2.5. Hidrojeller

Hidrojellerin karakterini şişebilme oranları, fiziken şişmiş durumdaki mekanik özellikleri ve gözenek yapısı oluşturur. Polimer içerikli malzemeler grubunda önemli bir yeri olan hidrojeller çapraz bağlı ve aynı zamanda da hidrofilik özelliktedirler. Hidrojellerin en önemli ve bilinen özelliği suda şişebilme yetenekleridir.Bu olay,yoğun polimer zincirleri içerisinde suyun daha düşük hızda difüzlenip, kontrollü bir şekilde şişebilme özelliği sayesinde olur [18]. Hidrojellerin sahip olduğu zincirde homopolimer veya kopolimer yapılara sahiptir. Sahip olduğu zincir ile bir araya gelip oluşması, birden fazla monomerin polimerizasyonu ile hazırlanırlar [19]. Ayrıca hidrojeller akıllı jellere ve uyarı-cevap polimerlerine de sahiptir. Hidrojellerin zincir yapısı Şekil 2.3'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 3. Çapraz Bağlanmış Hidrojel Yapısının Görüntüsü [20]

2.5.1. Hidrojellerin Şişebilme özellikleri ve karakteristikleri

Biyomürekkep olarak kullanılan hidrojel türlerinin sahip olduğu bilinen ve önemli özelliği şişme özellikleridir. Kuru formda tutulan bir hidrojel belirli hacimdeki su içerisine bırakıldığında suyun kuru formdaki hidrojele yapacağı ilk eylem suyun jel içine emilerek,hidrojelin yapısında bulunan polar hidrofilik gruplar hidrojel yapısında bulunan hidroksil grupları dehidre olmaktadır. Polar konumdaki hidrofilik gruplar tarafından tutulmuş su yapısına "primer bağlı su" ismi verilmiştir. Şişme prosesi başlatılırken, başlangıç aşamasında büzüşmüş durumda olan hidrojel içinde birbirine en yakın konumda bulunan polimer zincirleri birbirinden ayrılıp uzaklaşarak gerçekleşir. Bu uzaklaşma prosesinin devamında su molekülleri, hidrofobik grupların çevresi de sarar. Bu suya da "sekonder bağlı su" adı verilmiştir. Yapıdaki primer ve sekonder bağlı suyun toplamına ise "toplam bağlı su" olarak isimlendirilmiştir.

Toplam bağlı su ile belirli bir dereceye kadar şişmiş olan hidrojel, ağ yapının yüksek derecedeki seyrek yapısı doğrultusunda ozmotik basınçla beraber şişmeye devam eder. Sistemde şişmiş jel ve suyun içerisinde bulunan jeli toplam iki faza ait bir sistem

olarak düşündüğümüzde iki fazın arasındaki polimer konsantrasyonunu eşitleyebilmek için dış çevreden suyun jel fazı içerisine girmesidir. Ayrıca emilen suya da "serbest su" adı verilir [4]. Bu işlemlerin sonucunda ağ yapı içerisindeki boşlukların hepsi dolar ve polimer zincirleri birbirinden en yüksek seviyede uzaklaşmış olur.

2.5.2. Hidrojellerin Sentezi

Hidrojeller sentezlenir iken prosesin başlangıcında kimyasal kullanılarak serbest radikal polimerleşmesi ile veya yüksek enerjiye sahip ışınlar ile başlatılan radikal özellikli zincirlerin polimerizasyonu ile gerçekleşmektedir. Aynı özellikli monomerler ile hazırlanmış ve her iki yöntemin de kullanılup oluşturulduğu hidrojeller farklı fiziksel özelliklere sahip olacaktır [21].

2.5.2.1. Kimyasal Çapraz Bağlanma ile Hidrojel Hazırlanması

Hidrojellerin hazırlık aşamasında iki adet temel teknikten yararlanılmaktadır. İki temel teknikten birisi daha az çapraz bağlı madde kullanımı ile doğrusal gerçekleşirken diğer teknik dallanmış homopolimer ya da kopolimerin zincire doğrudan çapraz bağlanması tekniğidir. Çözeltide yürüyen bu tepkime içeriğinde genellikle sulu çözeltiler kullanılmaktadır. Ayrıca çok küçük parçacıklı olan hidrojellerin üretiminde süspansiyon polimerleşmesi de kullanılabilir.

Hidrofilik polimerlerin çoğunluğunda, hidroksil grubu da fonksiyonlu çapraz bağlayıcı madde kullanılır. Formaldehit, asetaldehit, ve glutaraldehit gibi aldehitler, maleik ve okzalik asit, etilen glikol dimetakrilat, yükseltgenme indirgenme sistemleri çapraz bağlayıcı maddeler olarak bu tür hidrojel hazırlama tekniğinde kullanılır.

Çapraz bağlanma etkileşimi ile hidrojel kimyasalının hazırlanması, birden fazla monomere çok az sayıda çapraz bağlayıcı kullanılarak direk çapraz bağlanması ile oluşur. Bu sistemde şişme değerinin azalmış ya da azalacak olması istenilmeyen bir durumdur. Kullanılacak çapraz bağlayıcı sayısı arttıkça kullanılan kimyasal miktarı da artar bu durum çapraz bağ konsantrasyonunun yüksek olmasına neden olur. Sonucunda şişme değeri azalmış olur [11], [13].

2.5.2.2. Hidrojellerin sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller sınıflandırılırken dört gruba ayrılırlar.Bunlar:iyonik yük,hazırlama yöntemleri,fiziksel yapıları ve çapraz bağlanma koşullarına bağlı olarak ayrılmış gruplardır. Bahsedilen polimerik hidrojellerin sınıflandırılması aşağıda ayrıntılı şekilde maddelendirilmiştir [22].

"İçerdikleri yan gruplara göre,

- *Nötral (iyonik olmayan) hidrojeller*
- *İyonik hidrojeller*
- *Anyonik (negatif yüklü) hidrojeller*
- *Katyonik (pozitif yüklü) hidrojeller*
- *Poliamfolitik hidrojeller"* [23].

"Hazırlama yöntemine göre,

- *Homopolimer hidrojeller*
- *Kopolimer hidrojeller*
- *Çoklu polimer hidrojeller*
- *IPN (interpenetrating networks) hidrojeller*

İçerdikleri yan gruplara göre,

- *Nötral (iyonik olmayan) hidrojeller*
- *İyonik hidrojeller*
- *Anyonik (negatif yüklü) hidrojeller*
- *Katyonik (pozitif yüklü) hidrojeller*
- *Poliamfolitik hidrojeller*

Fiziksel yapılarına göre,

- *Amorf hidrojeller*
- *Yarı-kristalin hidrojeller*

• *Hidrojen bağlı hidrojeller*

Çapraz bağlanma durumlarına göre,

• *Fiziksel hidrojeller*

• *Kimyasal hidrojeller*

Kaynaklarına göre,

• *Doğal hidrojeller*

• *Sentetik hidrojeller*

Su derecelerine göre,

• *Düşük şişme dereceli (%20-50) hidrojeller*

• *Orta şişme dereceli (%50-90) hidrojeller*

• *Yüksek şişme dereceli (%90-99.5) hidrojeller*

• *Süper-absorban (%>99.5) hidrojeller*

Kimyasal kararlılıklarına göre,

• *Biyobozunur hidrojeller*

• *Biyobozunmayan hidrojeller*" [5].

2.5.2.3. Hidrojellerde Suyun Konumu ve Karakteristiği

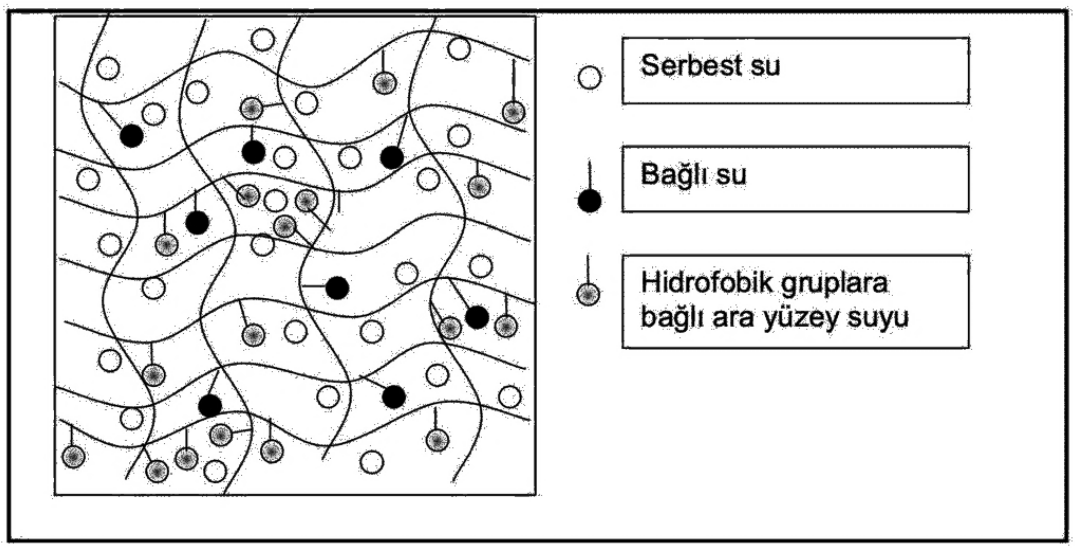
Homopolimerik veya kopolimerik yani iki veya daha fazla monomerden oluşan polimer yapılar çapraz bağlara sahiptir ve hidrojel olabilmeleri için kimyasal içeriklerinde –OH, –NH2, –COOH, –COOR polar ve hidrofilik gruplar bulunmalıdır [24], [25]. Hidrojen bağları yapıdaki polar ve hidrofilik gruplar su ile etkileşime girerek hidrojen bağlarını oluştururlar. Bu gruplar ile bağlanmış durumda olan su molekülleri ile hidrofilik gruplar çevresinde büyüme gerçekleşir ve çapraz bağlı polimer şişme eylemini gerçekleştirir.

Hidrofilik grupların daha fazla olduğu durumlarda şişme eylemi ile hidrofilik grupların arasında belirli bir ilişki vardır. Şişmiş bir hidrojelde Şekil 2.4'teki gibi üç türde su bulunmaktadır [26].

1.Bağlı su: Polimer yapının sahip olduğu polar gruplar ile hidrojen bağlarını oluşturan sudur.

2. Ara yüzey suyu: Polimer yapının sahip olduğu hidrofobik grubun çevresinde toplanmış ve sıkıca bağlanamayan sudur.

3.Serbest ya da kütle suyu: Polimer yapısındaki gözenekleri dolduran su, normal su gibi davranır ve polimerler ile herhangi bir etkileşime girmez.



Şekil 2. 4. Şişmiş Bir Hidrojeldeki Suyun Konumu [26]

2.5.2.4. Hidrojellerin Kullanım Alanları

Geçmiş yıllara bakıldığında hidrojellerden tıp alanında ilk kez 1960 yılında yumuşak kontak lenslerin üretiminde yararlanılmıştır. Hidrojellerin mekanik özelliklerindeki kararlılıklarının yüksek olması, iyi bir oksijen geçirgenliği, ışık kırınımını sağlaması ve buna uygun kırınım indisine sahip olmaları, kontak lenslerde hidrojellerden yararlanılmasının temel nedenidir [27]. Diğer kullanım alanlarına bakıldığında; yapay tendon malzemelerinin üretilmesi, yara iyileşmelerinde biyouyumlu yapışkan madde olarak, yapay böbrek zarları yapımında yapay deri dokusu görevinde, doku iskelesi ve taşıyıcı olarak ve ayrıca son zamanlarda sıkça rastlanılan doku genişletici olarak kullanılır. Son yıllardaki ve proje kapsamındaki uygulamalardan biri ise yüksek geçirgenlik özellikleri sayesinde kontrollü ilaç salım sistemleridir. Bu salıma örnek olarak,insülin salımı sağlayan glikoza duyarlı hidrojel

sistemlerinin diyabet tedavilerinde kullanımı olabilir. Akıllı hidrojeller,elektrokimyasal türde olan uyarıları mekanik işe çevirir bu sayede insan vücudundaki kas dokusu işlevi görebilir. Bu gelişimden yararlanılarak yapay kas dokuları geliştirilmektedir [28].

Hidrojeller çok iyi su tutma özelliğine sahiptir bu sayede adsorpsiyon için çok uygundurlar. Adsorbsiyon, sıvı veya katı yüzeyinde konsantrasyonu artan maddeye adsorplanmış adsorplayan maddeye de adsorban denir. Kısaca adsorpsiyon yüzeye tutunabilme olayıdır. Aynı zamanda adsorpsiyon, belirli bir yüzeydeki maddenin birikme eylemi veya yoğunluğunun artırması olarak da tanımlanabilir. Sıvı içinde bazı moleküller ve iyonların yayılımı gerçekleştiğinde ara yüzeye gitme eğiliminde olurlar. Bu sebeple hidrojeller tıp alanı dışında da kullanıma açıktır; su saflaştırma, ağır metal/boyarmadde uzaklaştırılması, tarımda gübre ve tarım ilaçlarının çevreye denetimli salınımları, petrol ve yağ içerikli endüstriyel atık karışımlardan suyun uzaklaştırılması, boya ve ağır metal içerikli endüstriyel atık suların denetlenmesi su içerikli hastane atıklarının, telekomünikasyonda korozyonun önlenmesi gibi [23], [29].

2.5.2.5. Hidrojellerin Adsorban Olarak Kullanılması

Birçok doğal ve yapay polimerler birkaç monomer ile uygun şartlar altında kopolimerleşme tepkimesi sonucunda ağır metallerin bertaraf edilmesi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. Hidrojeller ağ yapılı ve çapraz bağlı polimerik sistemlerdir bu sayede yüksek derecede su tutabilme özellikleri dışında bazı durumlarda da adsorplayıcı görevinde kullanılır. Akrilamid esaslı hidrojeller süper su tutucular olarak bilinir. Akrilamid esaslı hidrojellerin, bazı ağır metal iyonları ve bazı boyarmaddelerinin sulu çözeltilerinden soğurumu araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

2.6. Biyo Mürekkep

Sanal ortamda 3 boyutlu olarak tasarlanmış bir nesnenin kompozit, polimer, reçine gibi malzemelerden yararlanarak kimyasal işlemden geçirilip basılma işleminde kullanılan malzemeye biyo-mürekkep adı verilir. Aynı zamanda, biyo mürekkep malzemesi yapay olan canlı dokuyu üretmek için basım esnasında kullanılır.

Dokuları, organları ve çeşitli vücut bölümlerini 3 boyutlu yazıcılar aracılığıyla üretmek için biyo mürekkeplerin kullanılması gerekiyor. Bu biyo mürekkeplerin baskı işlemi esnasında katman katman oluşumundaki sürece dayanması ve vücudun içindeki sert kısımlarda hayatta kalması önemli.

Biyo mürekkepler canlı hücrelerden tarafından oluşturulur. Biyo polimer jeller ile hücrelerin uyumu biyo mürekkep anlamına gelir. Biyo mürekkeplerin belirli özgün özellikleri olması gerekir. Bu özellikler sıralandığında: reolojik, mekanik, biyofonksiyonel ve biyouyumluluk gibi niteliklerdir. Biyo mürekkepler, onarıcı tıp alanlarına ek olarak doku mühendisliğinde de en güncel ve yenilikçi basım araçlarından olarak kabul edilir [29].

3B Biyo Baskı ile 3B baskı malzemelerinin birbirinden farklı özellikleri:

- Daha düşük bir sıcaklıkta basılmıştır (37 °C veya altı)
- Hafif çapraz bağlanma koşulları
- Doğal türetir
- Biyoaktiftir

2.6.1. Biyouyumluluk

Bir biyouyumlu biyomalzemenin sahip olduğu en önemli özellik vücut dokularına fiziksel, kimyasal, biyolojik açıdan uyumlu olmasıdır. Geniş kapsamda, biyouyumluluk özelliği, bir biyomalzemenin vücut ile etkileşim halinde olduğunda uygun cevap verebilme ve vücudun bu malzemeyi kabul edebilme özelliğidir [30].

Biyouyumlı yani vücut ile uyuşur malzemeler bazı istenmeyen durumlar oluşturup, kullanıldığı organ veya dokuda hücrelerin gelişimine engel olabilirler. Biyouyumlu malzeme, malzemenin etrafındaki dokularda pıhtı, iltihap vb. olumsuz etki göstermeyen malzeme sınıflarının genel adıdır. Günümüz gelişmeleri arasında dokuların rejenerasyonunu sağlayan biyomalzemeler vücut sıvıları ile uyum sağlayabilmesi için geliştirilmektedir [30].

Biyomalzemelerin vücut ile uyum testleri yapılırken, ilk önce vücut dışında ve daha sonra vücut içerisindeki dokular aracılığıyla testler yapılmalıdır. Klinik denemelerde ise malzemenin biyolojik anlamda güvenilirliğine bakılmalıdır. Biyomalzeme ile çalışılan

dokunun çevresinden alınan doku örneği morfolojik açıdan incelendiğinde, uygulanan biyomalzemenin uyumluluğu hakkında fikir sahibi olunur. Ortopedi ve travmatoloji bölümlerinde kullanılan biyomalzemeler mevcuttur. Yine de karsinojenik ve inflamatuar riskleri olabilir. Bu yüzden, kullanılacak biyomalzemenin test sonuçları çok önemlidir [31]. Biyomalzemenin içeriklerine göre türleri: metaller, polimerler,seramikler ve kompozitler olmak üzere 4 ana gruba ayırabiliriz.

2.6.2. Hidrojel İçerikli Biyo Mürekkepler

Biyo mürekkepler, biyopolimerlerden elde edilir. İstenilen şekilde ve işlevde bir hidrojel oluşturmak için tek seferde ve farklı dizilim kombinasyonlarında tabaka tabaka meydana gelmektedir. Şekli ve kıvamı jölemsi olan şekillerin molekülleri, UV ışığı ile çapraz bağlayarak malzemenin sabit kalması sağlanmaktadır. Biyo mürekkeplerin basımı esnasında seçilmiş bileşenlerinin oranları programlanarak ortaya çıkan ürünün farklı sertlik seviyelerinde olması sağlanabiliyor. Bu sayede kıkırdak ve yağ dokusu arasındaki seçimlerde yazıcıdan baskı almak teorik olarak mümkün olabiliyor. Sert dokulardan kemik ve benzeri malzemeleri üretebilmek bile, kullanılan biyomalzemeleri değiştirerek ve bu eklenen karışıma mineral gibi maddeler ekleyerek oluşturulabiliyor.

Hidrojeller, korunmasını sağlar. Biyobaskı uygulamalarında kullanılan malzemelerdir [32]. Hidrojellerin bileşenlerine bakıldığında yazdırılabilir grubundakiler: polisakkaritler, proteinler, sentetik polimerler ve peptit bazlı malzemelerdir.

Belirli bir baskı yöntemini seçip ayarlamalarını yaparken, bir veya birden fazla bileşene sahip ise bileşenlerin konfigürasyonlar ile formüle edilip kullanılabilir.

Biyo mürekkep tercihi yaparken yazıcı tasarımının uygunluğuna ve de üretilmek istenilen biyo ürüne uygun seçim yapılmalıdır. Tercih yapılırken en önemli kısım, kemik gibi sertleşmiş, yapılar mı yoksa sade yapılı damarlanmaya sahip olmayan doku mu oluşturulmak isteniyor yoksa bu sade yapıdaki damarlı yapıya destek olacak yumuşak doku mu isteniliyor karar verilmelidir.

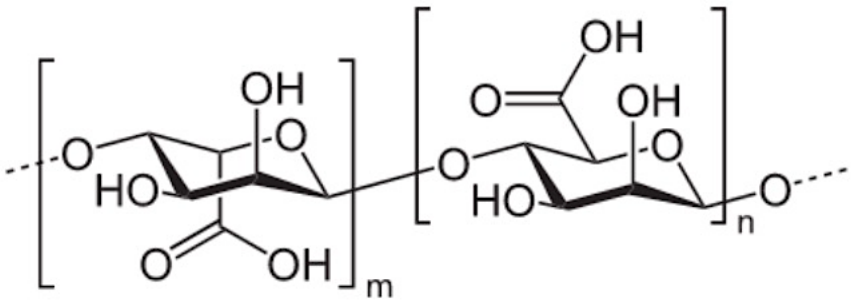
2.7. Biyoyazıcılarda kullanılan hidrojeller

Bu bölümde tez kapsamında çalışılan aljinat ve sık kullanılan progesteron detaylı olarak anlatılmaktadır.

2.7.1. Aljinat

Aljinat,alglerin hücre duvarlarından elde edilmektedir bilinen tür kahverengi alglerin bazı türleridir. Aljinat yapısı,lineer yapılı bir polisakkarittir. Polisakkaritler, glikozit bağları aracılığı ile birden fazla ve birleşik yapıda olmayan monosakkaritin bağlanması ile oluşan kimyasal zincir yapılardır. Yapısal olarak içeriğine bakıldığında, aljinatlar hidroksiapatitenin yapısına benzemektedir.

İçerisinde aljinat olan sulu çözeltiye, divalent katyonların eklenmesi ile çapraz bağlanma olayı iyonik olarak gerçekleşir. Artı iki yüklü iyona divalent katyon denir. Proje içeriğinde deney aşamasında bu rolde Kalsiyum kullanılmaktadır. Aljinatın vücuda oral yol ile alındığında toksik etken yaratmadığı kanıtlanmıştır ve biyolojik anlamda metabolize özelliklidir. İlaç salım sistemlerinde aljinat seçip kullanırken dikkatli olunmalıdır. İlaç salınımı prosesinde oluşan jel tabaka,difüzyon bariyer aljinatına uygulanan hidrasyon sırasında oluşturmaktadır. Aljinatın kalsiyum ile çapraz bağlanıp kimyasal aktivitesini gerçekleştirdiği enkapsülasyon uygulamalarında salımdaki rol alan ilaç biyolojik aktivitesi korunmaktadır [33].



Şekil 2. 5. Aljinatın Kimyasal Formu [33]

Aljinatın sahip olduğu su tutabilme özelliği sayesinde tıp alanı dışında kağıt ve tekstil alanlarında da kullanılmaktadır. Sahip olduğu bu özelliklerinin dışında jel formu oluşturma özelliği sayesinde yiyecek endüstrisi ve kozmetikte kıvam getirici olarak kullanılırken;gaviscon, rennie gibi mide ilaçların içeriğinde de destek maddesi olarak mevcuttur. Aljinat artı iki yüklü katyon olan kalsiyum ile kolayca jel oluşturabilmektedir. Oluşan kalsiyum aljinat sektörde kaplama uygulamalarında kullanılmaktadır. Ayrıca kalsiyum aljinat, yanık kaplama tedavilerinde de kullanıldığı bilinmektedir, tıpta daha çok bilinen yöntemlerle kıyaslandığında daha az acı hissettirmesi ve biyouyumluluk özelliği sayesinde kullanılmaktadır.

2.8. Hidrojellerin İlaç Salınımında Kullanılması

Belirlenen ilaçlar, hidrojel içerisine konulduğunda kontrollü salınım yapabilir veya istenilen bölgeye iletilebilir. Bu sayede ilaçlardaki etken maddelerin yan etkileri azaltılıp verimliliği artırılabilir. Belirli polimerlerden sıcaklığa duyarlı kontrollü salımlarda yararlanılmaktadır.

Hidrojellerin içeriğine bakıldığında çoğu dehidrate durumda ve camsıdır. Dehidratasyon, basit anlamda sıvı kaybıdır.İlaç salınımı çoğu zaman eş zamanlı olarak suyun absorblanması ve mevcuttaki ilacın şişme kontrollü desorpsiyonu şeklinde ilerler [34]Kontrollü ilaç salınımında,hidrojellerden çok faydalanılır. Özellikle çevreye duyarlı hidrojellerin oluşturduğu ilaç salınımı,pH ve sıcaklık çevre şartlarına bakılarak kolayca ayarlanabilir [35].

Literatürde yapılmış çoğu çalışmanın sonucunda tek türde uyarıcıya cevap veren hidrojellerin ilaç salınımını kapsar şekilde olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak birden fazla değişkenin olduğu durumlarda, birden fazla uyarıcıya cevap verebilen hidrojeller ile çalışmalar yürütülmesinin daha avantajlı olduğu görülür [18].

İnsan vücudunun farklı bölgelerinde pH değişimleri vardır bu nedenle pH'a duyarlı salınım sistemleri kullanılabilir. Örnek olarak, ilaçlar kıyaslandığında tadı kötü ilaçların ağız içi nötr ortama girerek, mide ortamının sahip olduğu asidik pH ortamına salınarak vücuda gönderilmesidir.

Enkapsüle edilmiş ilaçlar difüzlenirken en önemli parametreler, hidrojelin sahip olduğu gözenek boyutu ve ilacın hidrodinamik hacmidir [18], [36]. Ayrıca ilacın jel içerisine yüklenmesi eyleminin de difüzyon hızına büyük etkisi vardır.

2.8.1. İlacın jel içine enkapsülasyon yöntemleri

Enkapsülasyon işlemi, en az bir aktif bileşeni ve en az bir çeşit kaplama malzemesi kullanılarak uygun koşullarda ve hedeflenen dozda salınması koşuluyla koruma altına alınmasıdır. Enkapsülasyon işleminde kullanılacak malzemenin biyouyumlu ve biyobozunur olması dışında aktif bileşenin stabilitesini sağlıyor olması şartını da kapsamalıdır.

Kontrollü salım sistemleri; gelişmiş etkinlik, enkapsüle veya immobilize edilmiş bileşenlerin enzimatik vb. degradasyonuna karşı yüksek stabiliteye sahip olması, azaltılmış toksisite, kolay uygulama gibi sayısız avantajlara sahiptirler.

2.8.1.1. İlacın jel içine direkt olarak eklenmesi

İlacın jel yapı içerisine direkt olarak eklenmesi yönteminde, polimer zincirler ilacın çözelti oluşturduğu ortamda çapraz bağlanır, çözelti dışındaki ortama ait ilaç moleküllerinin enkapsüle edilmesi ile sağlanır. Önceden çapraz bağlanarak oluşturulmuş hidrojelin ilaç çözeltisine konulup ardından ilacın hidrojel gözenekleri boşlukları arasından geçiş yaparak difüzyonunu sağlanması yöntemi de bir diğer enkapsülasyon işlemidir [37]. Bu iki enkapsülasyon yönteminde de hazırlık süreci açısından hızlı ve kolaydır. Ayrıca bu iki enkapsülasyon yönteminde de hidrojelin şişmeye başlamasının başladığı an itibari ile ilacın hızlı bir şekilde salınımı gerçekleşir. Hızlıca gerçekleşen bu salınım prosesinin ardından hirojel içine bakıldığında içindeki arta kalan ilaç moleküllerinin salınımını belli bir süre daha devam ettiği görülür. Prosesin ilk basamağının başlangıcında hızlı ilaç salınımı çapraz bağ oranı arttırılıp %10-25 oranlarına kadar geri düşürülebilir [38]. Ancak bu durumdan sonra ilacın enkapsüle edilmesi ile salınım karakterleri değişmektedir. Bu duruma çapraz bağlanmadan önce veya sonraki oranlar neden olmaktadır. Ek olarak ilacın enkapsülasyonu, çapraz bağlanmadan önce gerçekleşirse mevcuttaki ilaç molekülleri fonksiyonel gruplar aracılığıyla kimyasal reaksiyona girip polimer ana zinciri içerisinde yer alabilir. Bunların sonucunda hem sistem değişime uğrar hem de salınımda yüklenen ilaç miktarının azalmasına neden olup, verimlilik azalabilir.

2.8.1.2. Hidrojel İçerisindeki Ayrık Salım Sistemleri

Vücuda ilacın uzun bir sürede salınım prosesini gerçekleştirmesi isteniyorsa ve aynı zamanda da hidrojelin çapraz bağ yoğunluğu daha fazla arttıramamışsa ayrık salım sistemleri kullanılır. Bu yöntemde, mevcut hidrojelin içerisinde etken madde olan ilaç nano veya mikrokapsüller içine yerleştirilir [60]. Bu konu hakkında yapılan literatür taramasında polivinilalkol (PVA) bazlı hidrojellerde deksametazon etken yani anti enflamatuar ilaç etkeni maddesinin yaklaşık iki hafta boyunca salınımının sürdürebildiği, sonucunda da mikroküreler içine yerleştirilmiş steroid salınımının bir ayda etken maddesi ilacın ancak %6'lık miktarda salım yapacak şekilde geciktirdiği görülmüştür [38].

İlaçların, salınım mekanizmalarına bakıldığında, yavaş salınım mekanizmalarına olan bir yaklaşım da şöyledir; içerisinde ilaç olan mikro boyuttaki partiküllerin şişmeden, suyunu kaybetmiş bir hidrojel içine dispersiyonu ile oluşmasıdır. Bu aşamada hidrojel suyunu kaybedip degrede olurken hidrojelden dışarı salınım prosesi enkapsüle edilmiş ilaç tarafından gerçekleşir [39].

2.8.1.3. Hidrojele Kovalent Bağlı Sistemler

İlaç moleküllerinin hidrojeli hızlı bir şekilde terk etmesi ilaç maddesinin hidrojele yüklenmesi eylemi ile gerçekleşir. İlaç salınımının iyi bir şekilde kontrol edilebilmesi için çözelti içerisindeki ilaç molekülleri ile hidrojel ağları arasında kovalent bağlar oluşur. Hidrojele kovalent bağlanmış sistemler sıralandığında: ilaç salınımı, polimer ile ilaç bağının arasındaki bağın kimyasal veya enzim aracılığıyla kırılması şeklinde oluşmaktadır [40].

Kovalent bağlı ilaç salınım sistemlerinden yararlanılarak uzun süreçli ilaç salınımları gerçekleştirilebilir. Literatürde kovalent bağlı ilaç salım sistemlerinde sıcaklığa duyarlı kovalent bağlı bir jelle yapılmış çalışmada, moleküllerin bir ay boyunca salınıma devam ettiği görülmüştür [41].

Aşağıdaki şekilde salınım prosesini gerçekleştirecek ilacın çapraz bağlarını oluşturmadan önce ve sonra hidrojele yüklenmesi ve hidrojele bağlanması ile gerçekleşen ilaç salınım sistemleri karşılaştırılmaktadır [42].

2.9. Anjiyogenez ve Modelleme

Anjiyogenez diğer adı ile neovaskülarizasyon, yetişkinlerde ise damar oluşumu fizyolojik olarak yeniden oluşum sürecidir. Ek olarak bazen de hastalıklar başlığında tümör gelişimi ve diyabet gibi bazı patolojik durumlarda önemli rolü olan bir süreçtir [43]. Bu süreç vücutta fizyolojik bir süreçtir ve mevcut damarlardan tomurcuklanıp yeni damarların oluşması olayıdır. Bu durum, vaskülojenez ile benzerdir.

Kelime anlamına bakıldığında anjiyogenez, fiziken büyüme ve gelişme durumları sayesinde yara iyileşme sürecidir. Bununla beraber bazı durumlar ve zamanlarda patolojik olarak da gözlenebilmektedir.

Anjiyogenez sürecini arttıran ve azaltan faktörler arasındaki dağılım bozulduğunda denge kimin tarafına bozulduysa ona göre anjiyogenezde pozitif veya negatif anlamda farklılık gösterebilir [44]. Anjiyogenez prosesi, vücutta üretilmiş bazı kimyasallar tarafından kontrol edilir. Damarları onarmak veya yenilerini üretip uyarmak için kimyasal içeriklere ihtiyaç duymaktadır. Durdurmak için ise anjiyogeneze özel inhibitörler kullanılır. Kan damarları oluşurken, birden fazla hücre tipinin ve fazla sayıda molekülün katıldığı karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. Moleküller arası dengenin sağlanabilmesi, anjiyogenez sürecini etkiler.

Anjiyogenez birçok durumun önemli parametlerini kapsar. Bunlar, üreme fonksiyonları ve tamiri, patafizyolojik durumlar, vasküler yapının oluşması, organ gelişiminde ve farklılaşmasında oluşu gibidir. Anjiyogenez, damarsal gelişim ve yara iyileşmesinde de büyük bir faktördür.

Anjiyogenez, mevcutta sahip olunan küçük damarlardan yeni damarlarının oluşmasıdır. Anjiyogenez, erişkin döneminde organizmanın ihtiyacından dolayı damarlanması demektir. Damarların yeniden oluşumu, canlılar ürerken ve gelişirken tamir edilmesi içindir. Geliştirilmiş anjiyogenez kanser tedavilerinde anjiyogenez ve inhibitörlerinin ortaya çıkardığı etki mekanizmalarından yararlanır [45].

Genellikle organizmaların fizyolojik olaylarında anjiyogenez karşımıza çıkar. Dengenin kurulamadığı durumlarda kanser oluşumunda ve yayılmasında da rol alır. Anjiyogenezin bilinen en önemli rolü doku iyileşmesi prosesidir. Bu sayede yapay cilt dokusu oluşumu tıpta bilim insanlarının en çok çalıştığı alanlardandır [3].

Anjiyogenez yapılan araştırmalarda umut vaat eden sonuçlara, in vivo ve in vitro çalışmalar sayesinde hızlıca gelişmiştir. Anjiyogenez iskemik koşullarda kan damar gelişip uyarılmasını kapsarken; tümör gelişimi, diyabet, römatoid artrit gibi hastalık durumlarında anjiyogenez inhibisyonunu içerir [46].

2.9.1. Anjiyogenez Süreci

Gelişim süreci henüz tamamlanmamış ve devam etmekte olan bir embriyoda, birincil kılcal pleksus oluşturmak üzere progenitör anjiyoblastların farklılaşması ile yeni kan damarlarının oluşmasına vaskülogenez denir.Henüz filizlenmemiş anjiyogenez, transkapiller terminal ekstraselüler matrikslerin oluşumuna ve sahip olunan bir damar içerisindeki endotel hücrelerinin çoğalması ile meydana gelip bu sayede damarı fazlalaştırıp, iki veya ikiden daha fazla kılcal damarlara böler.

Anjiyogenez,çok basamaklı ve komplex bir olaydır. Anjiyogenezde 4 farklı ardışık basamak vardır [46]:

1- Proteazlar ile bazal membranın yıkımı.

2- İnterstitial alana Endotelyal hücrelerin migrasyonu.

3- Endotelyal hücrelerin proliferasyonu.

4- Lümenin oluşturulmasının ardından perisit hücrelerinin bir araya gelmesi ile yeni bazal membranın oluşturulması ve anastomozların oluşumu son olarak kan akışı.

Perisit hücreler ve perisit hücrelerini saran ekstraselüler matriks arasındaki hücresel adezif etkileşimlerdeki değişikliklere Mikro damarlardaki anjiyogenik gelen yanıt, komşu endotelyal hücreler bağlıdır. Aktif anjiyogenez oluşumunda, aktive edilmiş endotelyal hücreler; sahip oldukları kendi hücre iskeletlerini yeniden planlarlar, proteinler gibi hücreler yüzey adhezyon moleküllerini aktarırlar, proteolitik enzimlerini salgılarlar ve hücre komşularındaki dış yüzey matrikslerini yeniden düzenlerler. Bu olay döngüsü, kapiller tomurcuklanmaların oluşumunun ardından gelişimi ile sonuçlanır. Bu özel süreci belirleyen bazı anjiyogenik faktörler vardır. Bu faktörler arasında endotelyal hücrelerin migrasyonu, çoğalması, uzaması, yönlenmesi için yerel ve lokal sinyal iletimi bulunur [26], [47].

Özetle, kan damarlarının oluşumunu ve gelişimini sağlayan iki temel süreç vardır. Vaskülogenez ve anjiyogenez embriyodaki kan damarlarının oluşumu prosesindeki temel prensiplerdir. Vaskülogenez, ilkel kan damarlarının oluşması şeklinde tanımlanır. Diğer yandan, Anjiyogenez olayının vaskülogenez prosesinden temel farkı, önceden olan kan damarlarından özel mekanizmalar aracılığı ile yeni kan kapiller sistemin oluşmasıdır [48].Anjiyogenez mekanizması iki şekilde tanımlanmıştır: filizlenme ve intussusseptir yani kabaca iç kanamadır. Filizlenme şeklindeki anjiyogenez oluşumunda endotelyal hücre çoğalması ve hücrelerden uzaklaşması sonucunda endotel tüp oluşumu ortaya çıkar [49].

Dokulara ve mevcudundaki moleküllerine bakıldığında anjiyojenik etkileşimlerinde hücresel karmaşıklıkların oluşması büyük ihtimaldir bu durum öngörülür, araştırmalara yetecek tek bir ölçüm yönteminin uygulanacak olması ihtimali çok düşüktür. Bu nedenle, birden fazla anjiyogenez çalışma modelleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Anjiyogenez eyleminde ilgili in vitro modeller fiziki gözlemlerin sonucunda önemli bilgiler elde edilir fakat in vivo modellerde etkilerin nasıl sonuçlanacağı tam olarak bilinemez. İn vivo modeller ele alındığında bir kısmı tarama yapmak amacı için kullanılırken, diğer bilinen modeller birden fazla ajanın anjiyogenez oluşumundaki etkilerini araştırmak için kullanılmaktadır [43].

Anjiyogenezde kullanılan başlıca in vivo modeller:

•Civciv koryoallantoik membran modeli (CAM)

•Rodent mezenter modeli

•Tavşan kornea modeli (micropocket)

•Sünger (sponge) implant modeli

•Matrijel ve klasik tümör modeli

•Zebrabalık modeli

Yukarıda maddeler halinde sıralanmış modellerin uygulama alanlarına bakıldığında en kolay, tekrarlanabilir ve kantitatif ölçüme imkân sağlayan çalışma modeli civciv koryoallantoik membran modeli ve tavşan kornea yöntemleri olduğu bilinmektedir [50].

2.9.2. İdeal Anjiyogenez Modelleri

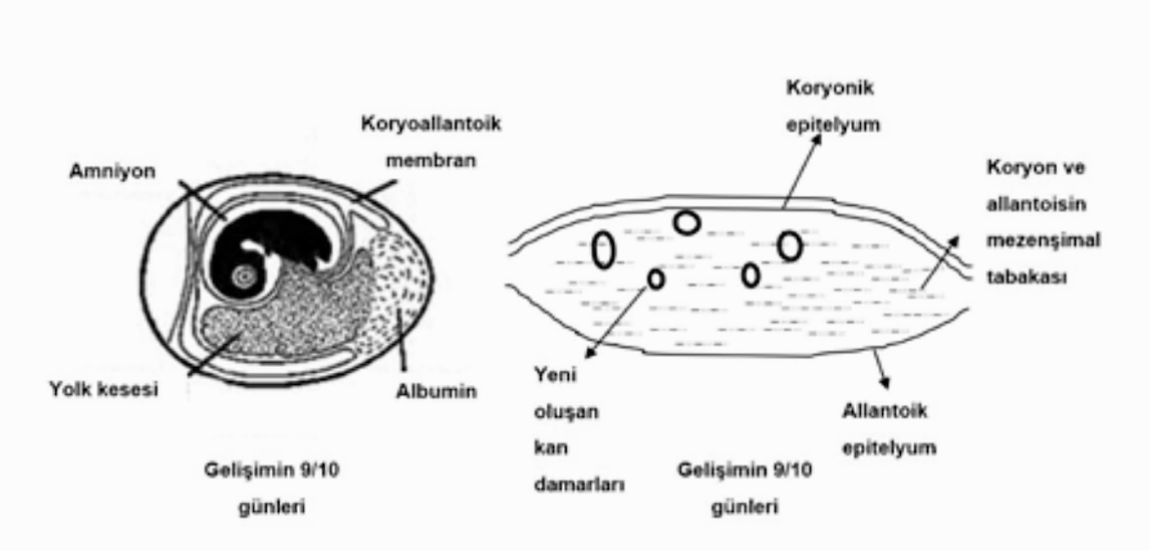
Çalışmalarda belirlenen ideal anjiyogenez modelleri aşağıdaki ihtiyaçları sağlamalıdır.

- Anjiyojenik ajanın salınım yüzdesi tespit edilebilir olmalıdır.
- Model, yeni damar oluşumunun fizikken sayılabilir ölçümüne imkân sağlamalıdır.
- Yeni oluşan damarlar ile var olan damarlar arasında basit bir şekilde ayırt edilebilmelidir.
- Dokunun zarara uğramasından kaçınılabilmelidir.
- Bu model monitorizasyona izin vermelidir.
- Uygun maliyetli,hızlı ve kolay uygulanabilir olup, tekrarlanabilmelidir.

Yukarıdaki maddelere bakıldığında bu nitelikleri karşılayan model kesinlikle, CAM modelidir. Civciv koryoallantoik membran modeli bir vivo model olarak, kanserli hücre davranışlarının ortaya çıkmasında, biyomateryaller etklerinin incelenmesinde ve de son olarak anjiyogenezde sıkça kullanılan bir model olarak önümüze çıkmaktadır [51].

2.10. CAM Modeli

Bu modele, kısaltması olarak CAM denirken açık hali ile civciv koryoallantoik membran modeli olarak adlandırılmaktadır. Literatür araştırmalarına bakıldığında daha CAM modeli, metastaz ve kanserli hücre çalışmalarında da kullanılmaktadır. İlk kez Folkman tarafından 1976 yılında bu model anjiyogenez çalışmalarında denenmiştir [52]. Civciv koryoallantoik membran modeli, ekstraembriyonik özelliklidir ve hem anjiyogenez hem de anti antijiyogenez araştırmalarında kullanılır. CAM modelinin civcivler için önemlidir çünkü gaz alışverişindeki ana solunum işlevi gören organ mevcuttur ve civcivin atıkları için mesane yerine görev alır [53]. Kıyaslama yapıldığında gelişimin başlangıcında civciv koryoallantoik membran modeli (CAM) avaskülarize bir yapıya sahiptir. CAM yapısı allantoisin epitel tabakası ile koryonun epitel tabakası arasında kalan çoklu mezoderm tabakaların bir araya gelmesi sayesinde oluşur. Ayrıca çift katmanlı mezoderm yapılar çok sayıda kan damarlarına sahiptir [53].



Şekil 2.10 CAM Modeli gelişimindeki 10.gün [53]

2.10.1. CAM Modeli Uygulaması

CAM'e bakıldığında belirli tabakalardan oluşmaktadır. Bunlar allantois ve koryon epiteli tabakalarıdır. CAM, embriyosu 4. günden itibaren gelişmeye başlar ve 10. günde gelişiminin çoğunu tamamlayarak yumurta kabuğunun içine tamamen yerleşmektedir. CAM yapısal olarak yapısında çok yoğun bir damar ağı vardır.

Anjiyogenez araştırmalarında en yaygın olarak CAM modeli kullanılmaktadır. Endotel hücrelerinin filizlenmesi ile anjiyogenez süreci şekillenir, 5. ila 7.gün arasında gelişimi görülür. Bu durum, CAM modelinde damar ağlarının gelişip büyümesinin öncül davranışı olarak düşünülmektedir. 8. ve 12.günler arasında, intususseptif mikrovasküler büyüme net bir şekilde görülür ve 13.-14. Günlerin bittiği süreçte vasküler ağ yapı yeni bir ağ örgüsü oluşturmadan hacim ve kütlesel oranda büyür . CAM genel yapısına bakıldığında vasküler anlamda kabuğa en yakın koryonik epitelde bitişik bulunan kılcal vasküler tabakadan ve modelin içindeki derin ve büyük damarlardan oluşur [54]. Vaskülogenez ve anjiyogenez eylemleri beraber yeni kan damarı ağlarını oluşturur. Vaskülogenez ve anjiyogenez süreçleri kompleks ilerleyen süreçlerdir. Bu karmaşık olayların oluşumunda ve ilerlemesinde büyüme faktörleri bu süreçlerde önemli rol oynar.

Civciv koryoallantoik membran modelinde anjiyogenez süreci gelişimsel olarak 3 aşamadan oluşur:

- 5. günden 7. güne kadar erken faz
- 8. günden 12. güne kadar ara faz
- 12. veya 13. günden itibaren geç faz

5. günden 7. güne kadar olan süreyi kapsayan erken fazda kapiller ağ filizlenmeye başlar. Sonrasında ara faz başlar ve ardından mikrovasküler ağda filizlenen ağların gelişimi öne plana çıkar , en son kapiller ağ filizlenmesi bu aşamada sonlanır. Sonuncu fazda yani geç fazda koryoallantoik bileşenler modelde koruyu görevli bir tabaka membranına dönüşür ve genişleyerek faz tamamlanır. CAM modeli uygulamalarını deneylere uyarlarken 5. günden itibaren yapılabilir olarak savunan bir ekip vardır fakat damarlanmanın belirginliği 12. günden sonraki olan ara faz dönemdeki uygulamalar açısından kıyaslandığında geç faz döneminin çok daha iyi bir zamanlama olduğunu ifade edilir [55]. Ayrıca CAM uygulamaların 18. güne kadar yapılabilmesinin mümkündür fakat 18.gün gibi geç döneme geçilmiş bir süreçte embriyo fazla büyümüş olur bu büyüme hareketlenmeyi arttırır sonucunda uygulamayı olumsuz etkiler.

2.10.1.1.CAM Uygulamalarının Avantajları

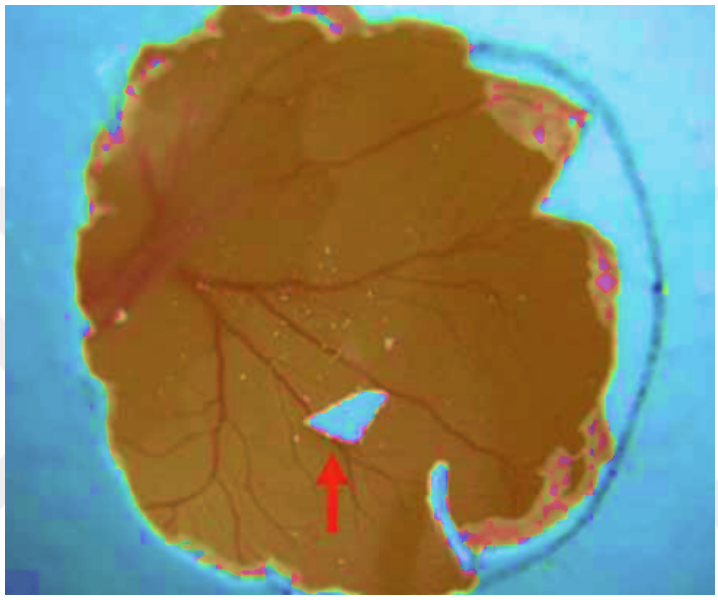
CAM ile çalışmalar yapılırken avantajlardan en büyüğü ve öne çıkanı döllenmiş, yumurtaların temininin ucuz ve çok kolay olmasıdır. Bu modelle yapılan araştırmalarda sonuca kısa sürede ulaşılabilinir. Eğer istenirse uygun ve sabit şartlar altında ışık mikroskobundan yararlanılarak değerlendirmeler ve kantitatif ölçümler yapılabilir.

Bu modelden tıp alanı içerisinde göz, yeni cerrahi aletlerin ile teknikler uygulanmasında, endoskopik uygulamalarda da yararlanılabilir [55].

Anjiyogenez sürecinde in vivo modellerde birçok yorum ve yaklaşım vardır. Bu modeller içinde temini en kolay ve çalışma sonuçlarına en hızlı şekilde ulaşılabilir olan model CAM modelidir ve bu çok büyük bir avantajdır. Ülkemizdeki araştırma olanakları ile de kıyaslandığı takdirde civciv CAM modelinin anjiyogenez çalışmalarında için en elverişli model olduğu anlaşılmaktadır.

2.10.1.2.CAM Uygulamalarının Dezavantajları

İn vivo modellerden olan CAM'e bakıldığında en büyük kısıtlama ve dezavantaj inflamasyon reaksiyonlarıdır. Yumurtalardaki belirli hasarlanmalar fiziksel ve kimyasal travmalar neden olur. Bu nedenle model ile çalışma yapılırken bu travmalar ölçüm hassasiyetini düşürmektedir. Bu nedenle, inflamatuvar etkenlerden kaçınmak gerekir. Bu travmalar özellikle en çok yumurtanın kırılan kabuk parçalarının iç kısmına düşmesi nedeni ile oluşur, bu olumsuzluktan kaçınabilmek için olabildiğince hassas çalışılması gerekir.



Şekil 2. 6. Koriyoallantoik Membran Modelinin Fiziken Olumsuz Etkilenmesi [43]

Diğer bir kısıtlama ve zorluk ise neovaskülarizasyonu artan vasküler dansiteden ayırt etme zorluğudur. Gelişmeler kolayca görüntülenebilir iken zaman zaman bu durum zorlaşır.

Yumurta kabukları soyulduktan sonra bulunduğu ortamdaki hava ile temasının çok iyi bir şekilde önlenmesi gereklidir. Sonuçlar gözlemlenip, değerlendirilene kadar kabukta soyulup açılan pencerenin hava ile temas etmemesine özen gösterilip, izolasyonu bozulmamalıdır. Bozulma durumunda hava basıncının göstereceği değişiklikler uygulamanın sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebilir.



Şekil 2. 7. Uygulama sonrası CAM yüzeyi ile hava temasının kesilmesi

Tablo 2. 1. CAM Modeli ile Deney Çalışlarındaki Avantajlar ve Dezavantajlar

Avantajlar	Dezavantajlar
Teknik olarak basittir	Oksijen değişikliklerine hassastır
Ucuz	Metabolik aktivasyona ihitiyaç duyan ilaç çalışmaları için uygun değildir
Temini kolay	Yeni damar oluşumunun tespit edilmesi güçtür
Geniş taramalar için uygundur	Memeli olmayan bir modeldir
Noninvaziv gözleme uygundur	Embriyoniktir
Sonuç hızlı şekilde değerlendirilir	Özel olmayan

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:DA22/32) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

3.1. 3 Boyutlu Biyoyazıcının Güncel Tasarımı

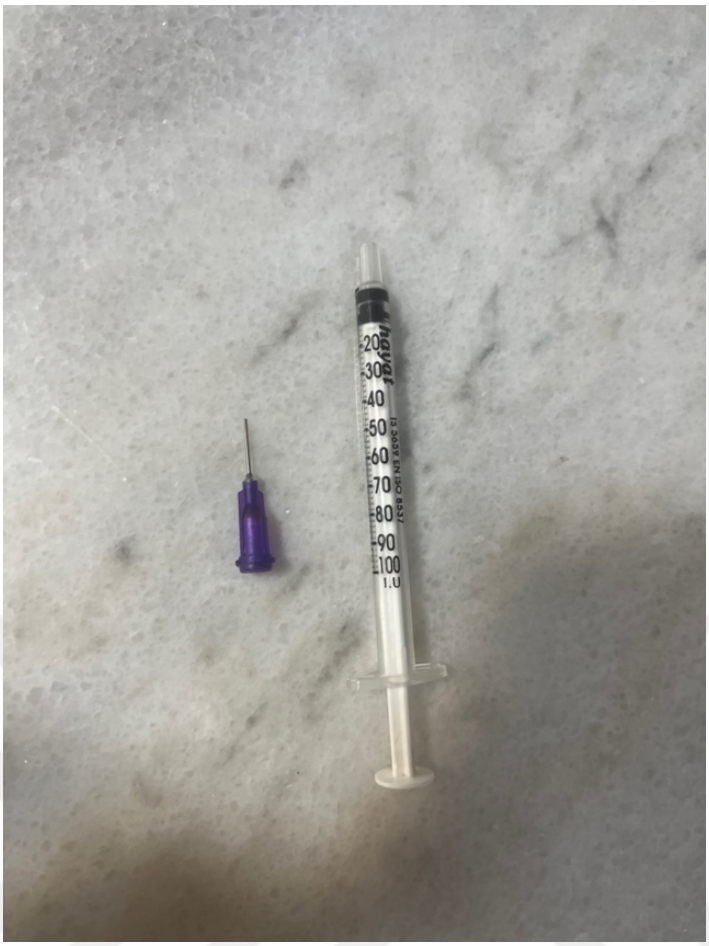
Başkent Üniversitesi Mühendlik Fakültesi laboratuvarına ait mevcut Biyoyazıcı modellemesi openscad programı aracılığıyla yapılmıştır. Tez kapsamında birkaç değişiklikler yapılarak yeni kullanıma adaptasyonu sağlanmıştır. Laboratuvar ortamında kullandığımız biyoyazıcı için marlin programı ile tabla yüksekliği, konumlandırması ve şırınganın itiş mesafeleri kontrol edilir.

3 boyutlu biyoyazıcılar tercihinde farklı yazılımlar kullanılabilir hatta hazır yazılım kullanmak yerine daha zor olsa da kullanıcı kendi yazılımlarını derlemeyi dahi tercih edebilirler. Günümüzde Marlin yazılımı çoğu 3 boyutlu yazıcıda kullanıyor. Marlin, süreçte güvenilir ve yüksek hassasiyette, kontrolün kullanıcıya ait olduğu bir baskı kalitesi sunar.

Biyoyazıcının yazılımı dışında 3 boyutlu geometrinin oluşturulmasında yararlanılan Cura Ultimaker programı sistem parametrelerine kolayca erişimi sağlanabilen bir dilimleyicidir. Bu sayede tasarısı planlanan 3 boyutlu görüntü dilimlenir ve G kod aracılığı ile şırınga konumlandırılır.

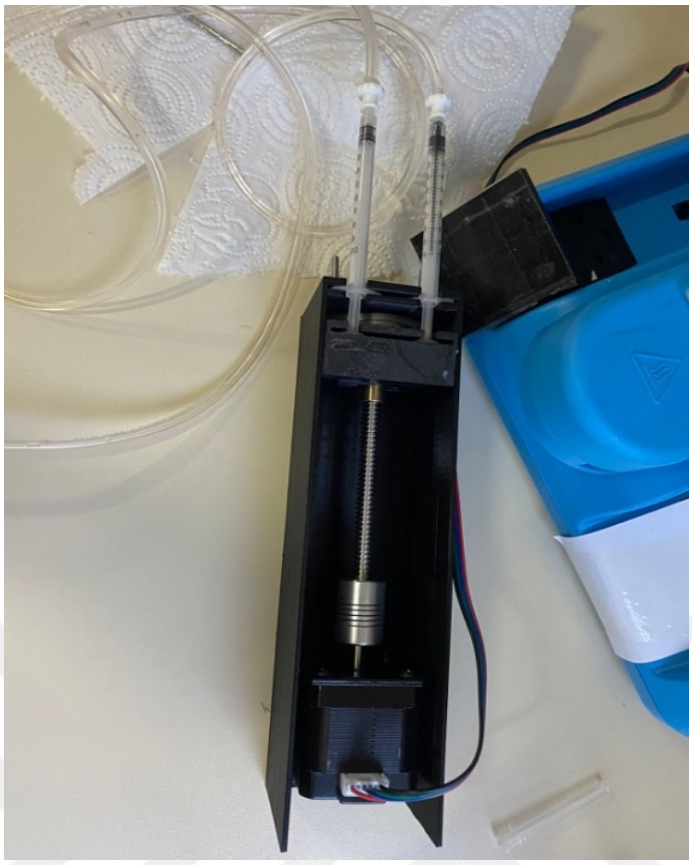
3.1.1. Biyoyazıcıda Kullanılan Şırınga Modeli

Biyoyazıcıda kullanılan şırınga modeli 100 cc hacimli Beybi marka insülin enjektörüdür. Enjektörler, her kullanımda değiştirilmelidir aksi durumda şırınga içerisinden yazıcıya olan kanalda tıkanmalar meydana gelip, baskı alma sürecini olumsuz etkiler. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılacak kimyasalın proseste hidrojel tabakalarına katman katman eklenmesi bir zorunluluk olmamaktadır. Çalışmanın başında her iki olasılığın da gözlenebilmesi adına çift şırınganı model ile güncellenip, denemelere başlanılmıştır. Şırıngalı sistemde itme kuvvetinin yaratacağı basınç baskı kalitesini ve viskozitesini çok etkilemektedir. Kullanılan ölçekli sistem aracı olan şırınganın en büyük avantajlarından birisi de belirlenmiş şekil için yaklaşık kaç cc jel gerektiği kıyaslanabilir.



Şekil 3. 1. Biyoyazıcıda Kullanılan 1,5 mm yarıçaplı Şırınga ve İğnesi

Biyoyazıcıdaki çalışma prensipleri dışında, tek kullanımlık aparatların sisteme uygunluğu basımı olumlu yönde etkiler. Jel yoğun kıvamlı yapışkan dokuludur bu nedenle biyo yazıcıdaki motor itme gücünün olumlu yönde kullanılabilmesi için düşük hacimli bir şırınga tercih edilmiştir.



Şekil 3. 2. Biyoyazıcıda çift şırınga denemesi

Çift şırıngalı model tasarımında beklenen durum, çapraz bağlayıcı ile aljinat içerikli hidrojelin eşzamanlı bir şekilde tablaya enjeksiyonudur. İlk denemede, cihazın motoru hareket ettiren kısmından manuel kontrol ederek jel yapısını oluşturulabilirliği test edilmiştir. Jel yapısının oluştuğu gözlenince aljinat ile dolu olan hortumun ucuna valf takılmıştır. Güncel tasarımın hassasiyetini ve çalışabilirliğine repetier aracılığyla bakılmıştır. Dilimlemesi yapılan görsel Repetier programı ile üzerinde çalışılan şekillerde denenmiştir. Çift şırıngada denemesinde şırınga ucundan çıkan jel yapısı istenilenden daha az akışkan olduğundan ve baskı alacağımız şekillerin boyutu çok küçük olduğundan iğnenin ucunun tıkanması problemiyle karşılaşılmıştır ve çift şırınga modeli başarılı sonuç vermediğinden, çapraz bağlayıcıyı ikinci şırınga ucundan eş zamanlı olarak basılmasından vazgeçilmiştir.



Şekil 3. 3. 2 Çift şırınga modelinde aljinat ile dolu olan hortuma takılan valf



Şekil 3. 4. Biyoyazıcı

3.1.2. Biyoyazıcıda Kullanılan Buhar Püskürtücü

Kullanılan basit buhar yapma cihazı, %2'lik CaCl2 çözeltisini buhar formunda soğuk bir şekilde kullanmamıza yarar. Şarj edilebilir özelliğe sahip buhar püskürtücü aracılığıyla

biyoyazıyı kullanarak alınacak hidrojel baskılar istenilen alanda zamanına ve prosesine uygun çapraz bağlanmaya uygundur.

Deney çalışması esnasında baskılara fiziki açıdan bakılarak %2'lik CaCl2 çözeltisi ile ne kadar süre boyunca nüfuz ettirilmesi gerektiği yaklaşık olarak belirlenmiştir. CaCl2 çözeltisinin buharı ile hidrojelin bir araya gelme süresi çok önemlidir buna bağlı jel yapı hızlı bir şekilde bozunma yaşayabilir.

Fiziki gözlem sonuçlarına göre, biyoyazıcının baskı süreci başladığı an itibariyle ilk katman baskısı gözlenip ikinci katmana şırınga ucundaki iğne başladığında, buhar püskürtme cihazı ile %2'lik CaCl2 çözeltisi buhar formunda başlatılır. İkinci katman baskısı bitip üçüncüye geçildiğinde cihaz kapatılır, diğer katmanda tekrar açılır. Süreç böyle devam etmektedir. Baskı süreci sona geldiğinde tabladaki jel baskı alınıp farklı bir sert zemine konulup, toplam iki buçuk dakika %2'lik CaCl2 çözeltisi buharı ile nüfuz ettirilir.



Şekil 3. 5. Baskıda Kullanılan Buhar Püskürtücü

3.2. 3 Boyutlu Biyo Yazıcının Programlanması

3.2.1. Marlin Yazılımı

Baskılama işlemlerinde, 3 boyutlu biyoyazıcılar için algoritması birbirinden farklı yazılımlar seçilebilir bunun dışında farklı bir tercih olsa da kullanıcılar kendi algoritmasını oluşturarak özgün yazılımlarını yazmayı da tercih edebilirler. Bu yazılımı tercih edenlere bakıldığında genel olarak kendi yazıcısını yapanlar çoğunluğu oluştururlar. Güvenilir bir yazılım olan Marlin ara yüzü, sürecin tam kontrolünü kullanıcıda tutarak üstün kaliteli baskı imkânı sunar.

3.2.2. Cura Yazılımı

Ultimaker Cura, 3B Baskı için endüstri standardı açık kaynaklı bir yazılımdır. Basit bir arayüze sahiptir, tüm büyük 3B baskı platformlarını destekler ve birçok özelliğe sahip karmaşık 3B modeller oluşturmak için kullanılabilir. Ultimaker yazıcıları kullanarak çok çeşitli 3B nesneleri kolayca oluşturmanıza olanak tanır. Çok çeşitli malzemeleri destekler ve dilimleme, yazdırma, kalibrasyon ve kalite güvencesi gibi çok kapsamlı özelliklere sahiptir.

Çoğu masaüstü 3B yazıcıyla uyumlu olan açık kaynaklı yazılım, STL , OBJ , X3D , 3MF gibi en yaygın 3B formatlarındaki dosyalarla ve BMP , GIF , JPG ve PNG gibi görüntü dosyası formatlarındaki dosyalarla çalışabilir. Dilimleme yazılımı olarak kullanılan programlar, 3B somut modelleri ve bunların sahip oldukları baskı ayarlarını 3B yazıcının işletim prosesine uygun talimatlara dönüştürür. Bu nedenle dilimleme yaptığımız yazılımlar herhangi bir 3B baskı işlemi için çok önemli bir husustur.

Cura Yazılımı kullanılırken üç basamak vardır:

- Modelleme :Modelleme, 3 boyutlu özel programlar aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu uygulamalar kendine ait dosya formatında olur ve bunlar, bu 3 boyutlu yazıcı dosyalarını açmanıza, düzenlemenize, kaydetmenize ve dışa dilimleyip aktarmanıza olanak sağlar.
- 3 Boyutlu dosyanın dışa aktarılması : Model tasarlanıp oluşturduktan sonra, bir STL, OBJ veya 3MF dosyası olarak dışa aktarılması gerekir. Bunlar Cura

tarafından tanınan dosya formatında olmalıdır. Sistem, yalnızca son istenilen geometriyi tuttuğundan, 3 boyutlu modelleme uygulamalarında kullanılan dosya formatlarından farklıdırlar. Yine de eğer istenirse 3 boyutlu modelin boyutunu ve geometrisi değiştirebilir.

- Dilimleme ve dosyanın dışa aktarımı: STL veya OBJ formatında kaydedilen dosya daha sonra dilimlenmiş geometri Cura yazılımına aktarılabilir. Curadaki G-Kodu, 3 boyutlu biyoyazıcıda tabla hareketleri, şırınga konumunun ayarlanması, sıcak-uç sıcaklık gibi okuyup takip etmesi vb. eylemlerin listesini içeren bir metin belgesidir.

Cura, 3 boyutlu biyoyazıcınız için komutlar üretir. Bu komutlara G-Code adı verilir. Komutlar ".gcode "dosya uzantısıyla biten bir metin belgesi içeriğidir. Her yazıcının kendine ait farklı bir yazılım, kurulum, baskı alanı, malzemesi, plakası ve başlık boyutu olduğundan, Cura dilimleme yazılımının bahsedilen donanım ayrıntılarını bir yazıcı profilinde bilmesi gerekir. Cura'da istenilen ayrıntılara sahip olunduktan sonra, katman kalınlığı ve yüksekliği, mesafeleri, şekli, yüzdesi gibi ayarlar belirlenebilir. Biyoyazıcının istatistiklerine ve ayarlarınıza bağlı olarak, Cura, belirlenen modeli yazdırmak ve yazıcı için bir talimatlar listesi oluşturmak için biyoyazıcı şırıganın ucundaki iğne aracılığıyla izlemesi gereken yolu hesaplar ve süreyi kullanıcıyla paylaşır. Bu talimatlar bu G Kodu dosyası içerisine kaydedilir.

G Kodu doğrudan Cura'dan yazıcıya bağlı olarak yazıcıya kablosuz veya kablo üzerinden gönderilebilir.

3.2.3. Repetier-Host Uygulaması

Repetier-Host uygulaması ücretsiz olarak bilinen dilimleyici programlardan biridir. Kendi internet sayfası üzerinden Windows, Mac ve Linux sistemleri için kolay kullanım ve kurulum imkânı vardır. Günümüzdeki programlar ile kıyaslandığında, 3 boyutlu yazıcılar ve biyoyazıcıların birçoğu ile uyumlu olup çok fazla alanda kullanım imkânı sağlamaktadır. Marlin yazılımı ile Repetier-Host uygulaması senkron bir şekilde çalışabilmektedir.

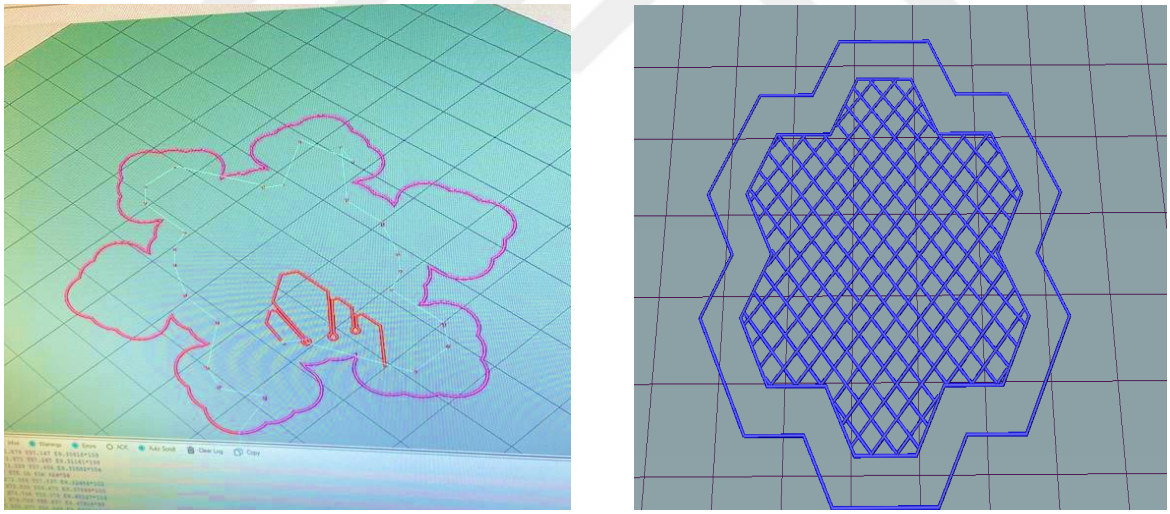
Repetier-Host uygulaması bilgisayara kurulup kontrolü yapıldıktan sonra ilk aşamada kullanıcının yapması gereken yazıcı ayarlarının kullanılan uygulamaya

aktarmasıdır. Bağlantı ayarları yapılıp güncellik durumu teyit edildikten sonra kullanılmış olan yazılım hangisi ise o seçilmelidir.

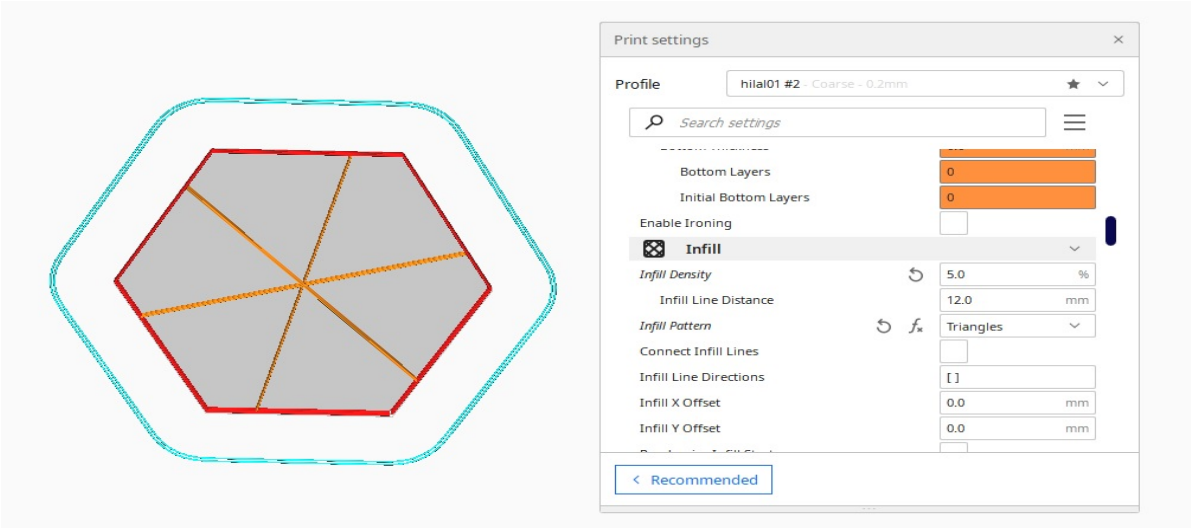
3.3. 3 Boyutlu Modelleme

Projede parametre değerlendirmeleri için farklı yol seçenekleri konuşuldu. Laboratuvarda kullandığımız biyoyazıcı için kullanılan Marlin kodunun yüksekliği, sağa ve sola kayma mesafelerinin kontrol edildiği kod satırları öğrenildi. Openscadde çizilen şekli repetier isimli programa aktarımı öğrenildi. Repetier programında X nozül hareketini, Y yazıcı tablasının sağ ve sol hareketi, Z yazıcının tablasını yukarı taşımayı, Z'nin yanındaki sembol motor aşağı yukarı hareketini kontrol etmeyi sağlar.

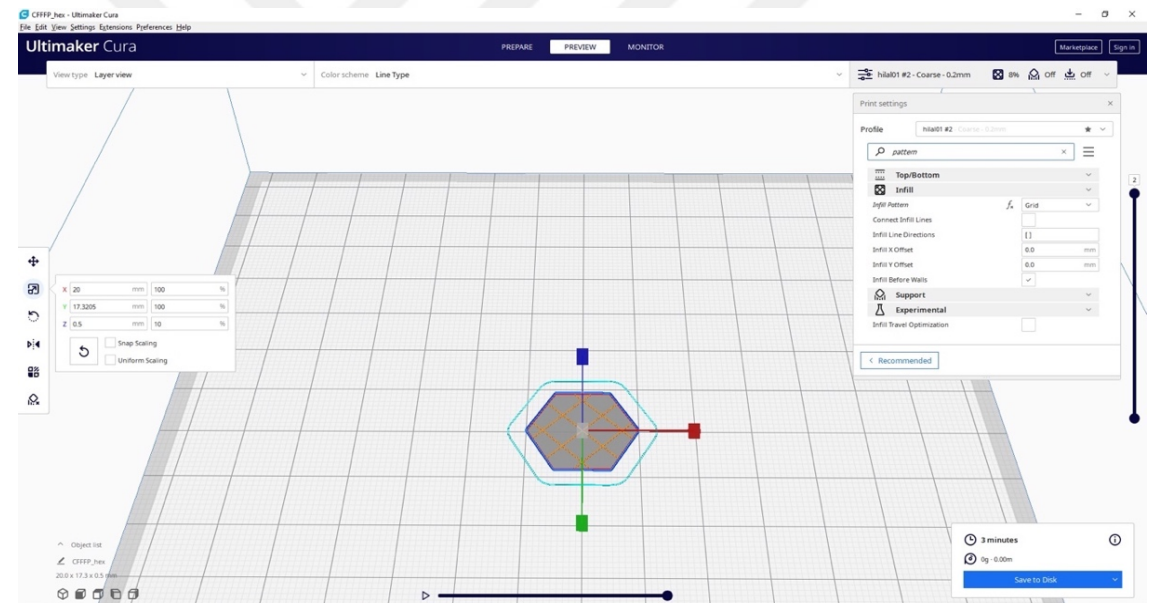
Bu aşamada Cura adlı dilimleme uygulaması kullanılmıştır. Bir 3D modelini alır ve bir 3D yazıcının anladığı kod olan G Kodu olarak bilinen bir dosya oluşturmak için katmanlara ayırır.



Şekil 3. 6. Repetier dilimleme örneği



Şekil 3. 7. Cura Yazılımında baskı parametrelerinin ayarlanması



Şekil 3. 8. Cura Ultimaker yazılımında Grid geometrisinin x,y,z düzlemindeki görüntüsü

3 boyutlu yazıcılar baskı işlemi g-kod aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Sanal ortamlarda tasarısı hazırlanmış olan çizimleri dilimleme işlemi ile 3 boyutlu geometriyi g-koda çevirip basılmaya hazır bir şekle getiren bu yazılımlara dilimleyici programlar denir.

Sanal ortamda yapılan 3 boyutlu tasarımlar ‘stl.’ uzantısı ile dışa aktarılıp kaydedilir. “Stl.” formatında kaydedilen bu tasarımlar kullanılacak dilimleme programlarına eksiksiz

aktarılır ve g-koda dönüştürülürler. G-koda dönüştürülerek hazırlanan kodların 3 boyutlu yazıcılara aktarılması ile 3 boyutlu baskı alma sürecine başlanır.

Baskı esnasındaki proseslerde kullanılan dilimleyici programlar, basılacak olan 3 boyutlu somut ürünün kalitesini direkt olarak etkilemektedir. Dilimleyici programlar sayesinde baskı kalitesi, katman kalınlıkları ve yükseklikleri, sayısı, iç dolgu oranı gibi birçok özellik ayarlanabilir. Bu dilimleme işlemleri için tercih edilebilecek birçok ücretsiz program bulunmaktadır.

Tez çalışmasında 3 boyutlu biyoyazıcı ayarlamaları ve kullanımı için Repetier-Host ve Cura programı tercih edilmiştir. Cura üzerinden ilerlenmiştir çünkü g-kod çağırılarak komut verilen 3 boyutlu baskılar daha hızlı ve kolay bir şekilde düzenlenmiştir.

3.4. 3 Boyutlu Yazıcının Denenmesi



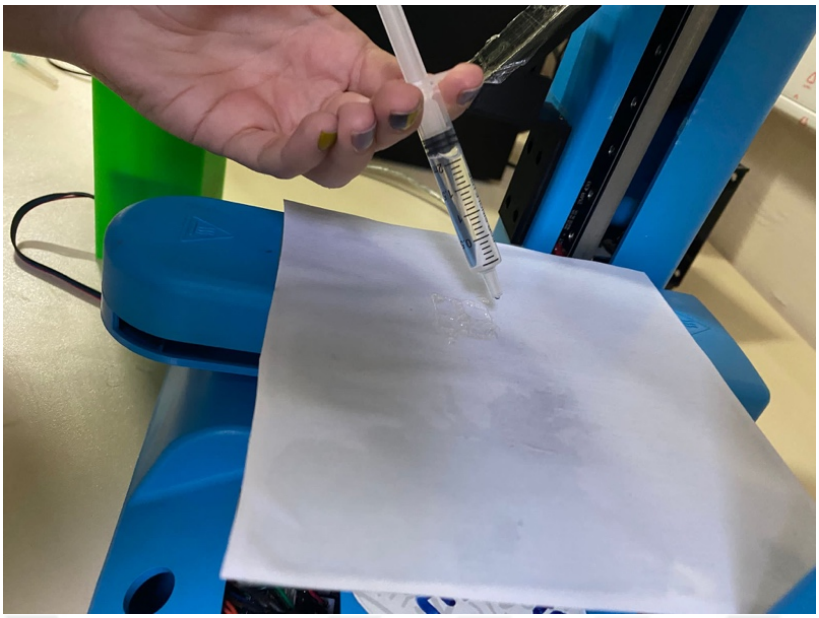
Şekil 3. 9. Denemeler Yapılan Biyoyazıcı

Kurulum işlemi tamamlandıktan sonra 3 boyutlu biyoyazıcının öncelikle mekanik olarak çalışıp çalışmadığı kontrol edilmeli ve kalibrasyonu yapılmalıdır. Yazıcı tarafından

baskı işlemine geçmeden ilk önce yazıcı bilgisayara usb port aracılığıyla bağlanır ve şırınganın konumunu hareket ettiren step motorların kontrolleri gerçekleştirilmelidir. Ayrıca eksenlerin çalışması emir verildiğinde stenilen yerlere geliyor mu diye kontrolü edilmelidir. Biyoyazıcının bilgisayar üzerinden usb aracılığıyla Repetier uygulaması ile bağlantısı yapılır. Yazıcıya entegre edilmiş komutların birer birer verilen emirlere karşılık birbirleri ile sorunsuz şekilde çalışıp, hareket edip etmedikleri kontrol edilir. Bu kontrol sürecinde eğer biyoyazıcının tabla ve şırınga hareketlerinde komuta karşılık verememe veya bir yanlışlık varsa sisteme dönüp ayarlar tekrar düzenlenmelidir. Ayrıca baskı malzemesi şırıngaya çekilmeden önce baskı işlemi başlatılıp iğne ile tabla yükseklikleri kontrol edilmelidir.

Tüm kontrolleri yapılıp baskıya hazır olan 3 boyutlu biyoyazıcı artık denenmeye hazırdır. Öncelikle 60cc'lik hacme sahip bir şırınga ile deneme yapılmıştır. Deneme sırasında şırınganın düşük hacim içerisindeki yarattığı basınç çok yüksek olduğundan planlanan şekilde şırıngadan malzeme çıkışı sağlanamamıştır. %3'lük aljinat çözeltisi denenip, çözeltisinin baskı için elverişli olduğu görülmüştür. Baskı işlemi sırasında cam tabla üzerine basılmış olan aljinat jel, tablaya yapışamamıştır ve şırınga içerisinde çözelti iğne ucuna doğru ilerledikçe iğnenin ucuna takılıp, tablaya akamamıştır. Bu nedenle tablada oluşturduğu şekil bozulmaya başlamıştır. Bu sorunun önüne daha düşük viskoziteye sahip çözelti ile çözüm bulunmuştur. Jelleşme prosesi için %2'lik CaCl2 çözeltisinin nem püskürtücüsü ile tablo üzerindeki aljinat baskıya püskürtülmesi deney düzeneğine eklenmiştir.

Nem püskürtme cihazını denemeden önce bu olumsuz durumun engellenmesi için tabla boyutunda ölçülüp kesilen A4 kağıdı üzerine CaCl2 çözeltisi aşamalar halinde emdirilip tablanın üzerine bırakılmıştır. Bu sayede baskı işlemi esnasında iğnenin ucundan çıkan aljinat CaCl2 solüsyonlu kâğıt ile temas eder etmez jelleşmeye başlar ve tabla üzerinde baskı işleminin gerçekleşmesi sağlar. CaCl2 sadece tablaya serilmiş kâğıt üzerinde bulunduğu zaman üst katmanlar baskılanmaya başlandığında jelleşme gerçekleşememektir ve baskıdaki jelli olan ilk katının üstüne düşen sıvı formunu korumayıp yayılmaktadır. Aljinat çözeltisinin yüzdesi arttırılıp azaltarak da bazı denemeler yapılmıştır.



Şekil 3. 10. CaCl2 Bulunan Baskı Tabanı

Bir sonraki denemede %3 içerikli aljinat çözeltisi manuel olarak eşit miktarda karıştırılarak biyo mürekkep olarak kullanılmıştır. Aljinatın jelleşme için jelatin de malzeme yapısı bakımından iyi bir jelleşme sağlayabilmektedir fakat bu jelleşme, aljinatın CaCl2 ile etkileşimindeki kadar hızlı gerçekleşememektedir. Aljinat ve jelatin ikilisinin karışımı bir süre bekletildikten sonra jelleşmesi gerçekleştiğinden iyi bir baskı aracı malzeme olarak kullanılabilir fakat jelleşme süresinin daha uzun olması nedeniyle ilk kattan sonrası denendiğinde üst katların şeklinin bozulup baskı işleminin gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Buna rağmen bu çözelti ile hazırlanmış jelden yapılan baskı bir süre 4°C sıcaklıkta bekletilirse alınan baskının şekil kalıcılığı daha da artmaktadır. Yalnız aljinat ile hazırlanmış olan baskı ürünü kısa sürede nemini kaybedip kurumaktadır. Gerekli nemin korunmasını sağlamak amacı ile nem püskürtme cihazı ile 1.katman ve her basım bittikten sonra birer dakika boyunca CaCl2 püskürtülmüştür.

4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu çalışma süreci ikiye ayrılmıştır. İlk aşamada biyo ink gruplarının kapsadığı hidrojellerin baskı süreci, ikici aşamada ise CAM'de anjiyogenez sürecinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Kimyasal reçeteleri literatürde belirtilmiş çözeltileri hazırlayarak, tasarımı Başkent Üniversitesi ekibine ait olan biyoyazıcıda baskı denemelerinin yapılması önceliklidir. Bu denemeler sırasında hazırlanan kimyasalların ve kullanılan deney malzemelerindeki farklılıklara bağlı sonuçlar değişmektedir. Çözelti yoğunluklarının farklılaştırıp denenmesi, yazıcıdaki baskı sonuçlarını ortaya çıkarmaktadır. Biyoyazıcıda kullanılan ara yüz programlarındaki parametreler özenle istenilen amaca uygun belirlenmelidir bu sayede ilaç salımı için gerekli dozaj miktarı belirlenmektedir. Parametrelere göre baskıların şekilleri, katman seviyeleri, yapılarındaki boşluk oranları vb. değişkenler belirlenmektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasındaki şekil farklılıklarına bağlı oluşumlar gözlemlenirken, bu parametrelerdeki değişkenler deneye büyük yön vermektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında civciv koryoallantoik zar modelinden yararlanabilmek için Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulundan izin alınmıştır. Ardından laboratuvar ortamında kuluçka sürecine girecek tavuk yumurtalarının temini gerçekleştirilir. Bu süreçte hava koşulları ve zamanlama çok önemlidir.

Temini kolay ve ucuz olan progesteron hormonu, embriyo gelişiminde büyük faktördür. Progesteron hormonundan yararlanılarak 3 farklı geometrili hidrojel baskılardaki ilaç salınım farklarını gözlemleyerek anjiyogenez üzerindeki etkisini gözlemlemek istenilmiştir.

Biyoyazıcılarda birçok türde biyomürekkep kullanılmaktadır. Bunların başında gelme, aljinatjelatin, agaroz ve kitosan bazlı hidrojeller gelmektedir. Bu malzemeler kullanımlarına göre kıyaslandıklarında birbirlerine göre farklılık göstererek avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Hidrojellere bakıldığında kitosan içerikli olanlar yüksek derecede biyo uyumlu ve biyo bozunabilirlik özellikleri sayesinde mühendislik alanlarında sıkça yararlanılmaktadır. Bu alandaki kullanımlarında güçsüz mekanik özelliklerinden dolayı biyo baskı işlemlerinde zorluklar da oluşmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, aljinat bazlı biyomürekkep kullanılmıştır. Anjiyogenez sürecine geçildiğinde yapılan aljinat bazlı jel içeriğine progesteron hormonu eklenerek diğer aşamaya ait kimyasal karışım

hazırlanmıştır. Yapılan kimyasal karışım CAM modeline entegre edilmeden önce UV ışık ile steril edilmektedir. Literatür araştırmalarına göre, bazı biyo mürekkeplerin içine UV kaynakları yerleştirilerek kürleşmesi sağlanabilir [7].

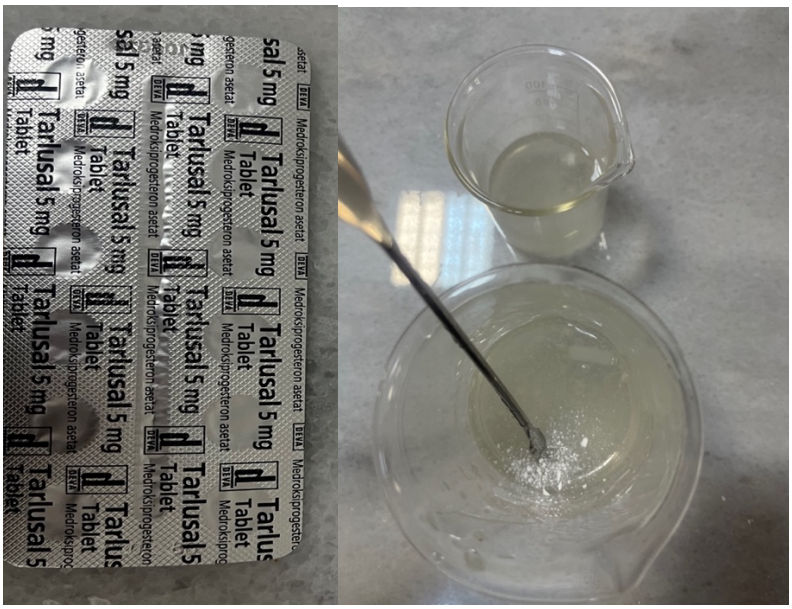
4.1. Kimyasalların Hazırlanması

Deney çalışmasında, büyüme hormonu olarak progesteron seçilmesindeki amaç; ilaç maliyetlerinin düşük ve teminin kolay olmasıdır. Kimyasal çözeltiler laboratuvar ortamında hazırlanıp, buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Çözelti miktarları 30 yumurtaya göre değil,10 yumurtaya göre hazırlanmıştır. Bu sayede şırıngadaki basıncın sabit tutulduğu baskı proseslerinde, çözeltilerin verimi azalmamış olur.

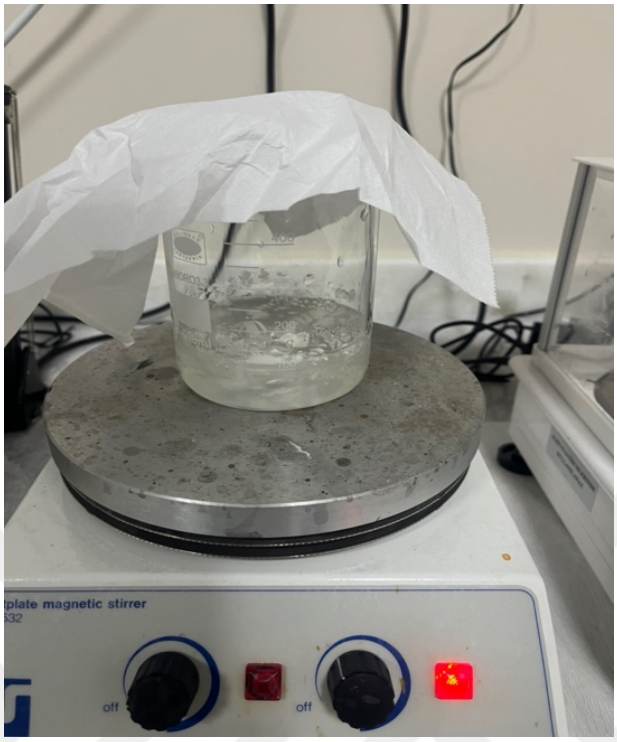
4.2. Progesteron ilaveli Jelin Hazırlanması

Deneyde Progesteron tablet 5 mg/ml (Tarlusal) kullanılmıştır. Progesteron ilaveli jel karışım hazırlanırken 100 ml saf suya hazırlanmış aljinat çözeltisinin içerisine, 2 tablet kırılıp ezilerek progesteron tablet tozu eklenir. Bu tanecikli yapı hassas terazide ölçülerek 1,5 gram olarak belirlenmiştir. Bu miktar, saf suda jelin salım süresine bağlı belirlenmiştir.



Şekil 4. 1. Kimyasal Çözeltide Kullanılan Progesteron Tablet

Toplamda 10 adet tavuk yumurtası için ezilen progesteron tabletleri homojen bir şekilde beher içerisindeki aljinat çözeltisi ile karıştırılır.



Şekil 4. 2. Progesteron Eklenmiş Aljinat Çözeltisinin Karıştırıcıda Karıştırılması

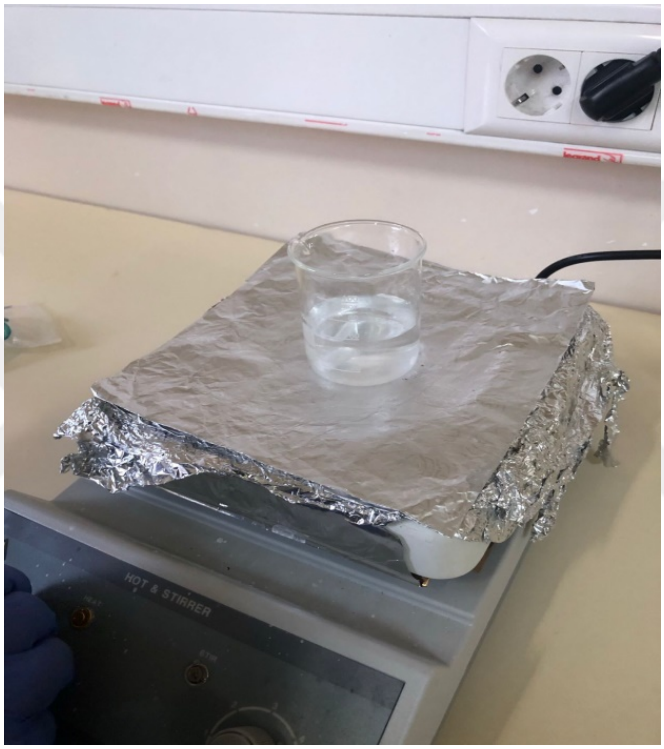
İlaç salınımının CAM modelindeki sonuçlarının kıyaslanmasından önce, ilaç ilaveli karışımın oluşturduğu hidrojellerin salınım sürelerine saf su içerisinde bakılmıştır. Her biri farklı geometrilere sahip üç farklı hidrojel baskı suya atıldığında aralarında en geç çözünme yaşayan geometri, yapısında en fazla boşluklu yapıya sahip olan olmuştur.

4.3. Kalsiyum Klorür Çözeltisinin Hazırlanması

Hidrojeli çapraz bağlayıcı olarak kullanılan Kalsiyum Klorür çözeltisi hazırlanırken saf su ve $CaCl_2$ kimyasalına ihtiyaç duyulmaktadır. Kalsiyum klorür ($CaCl_2$), kalsiyum ve klorun tuz formudur. İyonik halojenür gibi hareket eder ve oda sıcaklığında katı formdadır. Kalsiyum klorür inorganik bir bileşiktir, kimyasal formülü CaCl2 olan bir tuzdur. Kalsiyum Klorür, oda sıcaklığında bakıldığında beyaz renkli kristal yapılı bir katıdır ve suda çözünebilir özelliklidir. Kalsiyum Klorür bileşiği hidroklorik asidi kalsiyum hidroksitle

nötralize ederek oluşturulabilir. Yaygın adı ile Kalsiyum hidroksit olarak bilinir, sönmemiş kirece su ilave edilmesiyle elde edilen kimyasal bir bileşiktir.

Hazırlık aşamasında 2 gram katı formdaki $CaCl_2$ ve 100 ml su ile %2'lik Kalsiyum Klorür çözeltisi hazırlanmıştır. Karıştırıcıdan yardım alınarak homojen bir çözeltisi elde edilmesi amaçlanır. Karıştırıcının sıcaklık ayarı çözelti hazırlanırken açık olmamalıdır aksi takdirde kendi hidrasyon suyunda çözülüp ve soğutulduğunda sert amalgamlanmış bir katı oluşabilir.



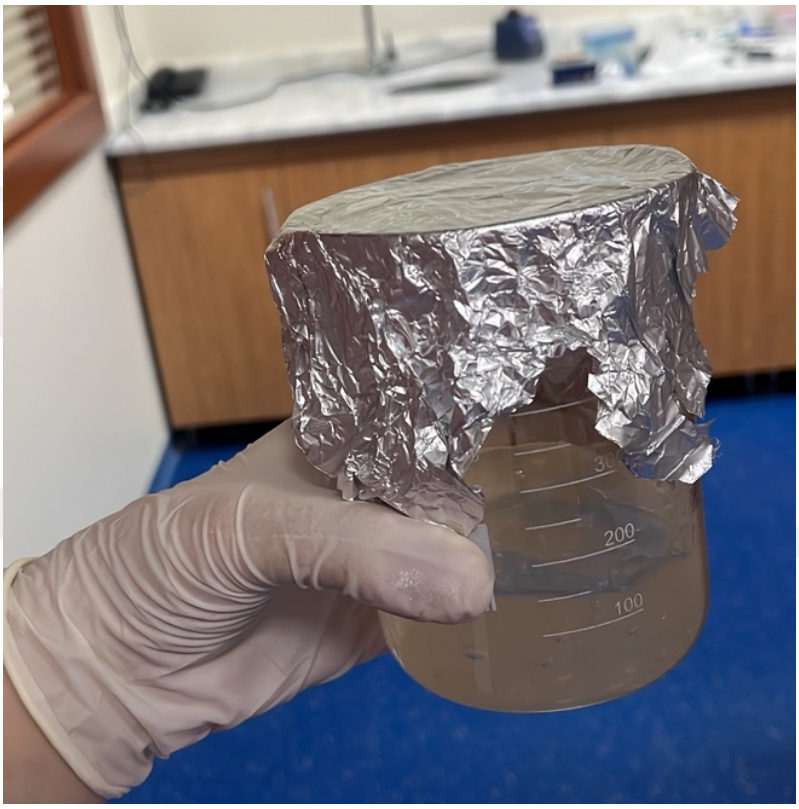
Şekil 4. 3. %2'lik Kalsiyum-Klorür Çözeltisi

4.3.1. Sodyum Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması

Sodyum Aljinat kıvam arttırıcı olarak kullanılır. Aljinatlar, nişasta bazlı kıvamlaştırıcıların aksine boyalarla reaksiyona girmez ve kolayca yıkanabilirler. Sodyum Aljinat , aljinik asidin sodyum tuzudur.

Sodyum Aljinat, soğuk su bölgelerinde yetişir ve özü kahverengi yosundan çıkarılan doğal bir polisakkarit ürünüdür. Fiziken çözünmesi soğuk ve sıcak suda güçlü ajitasyonla ile gerçekleşebilir.

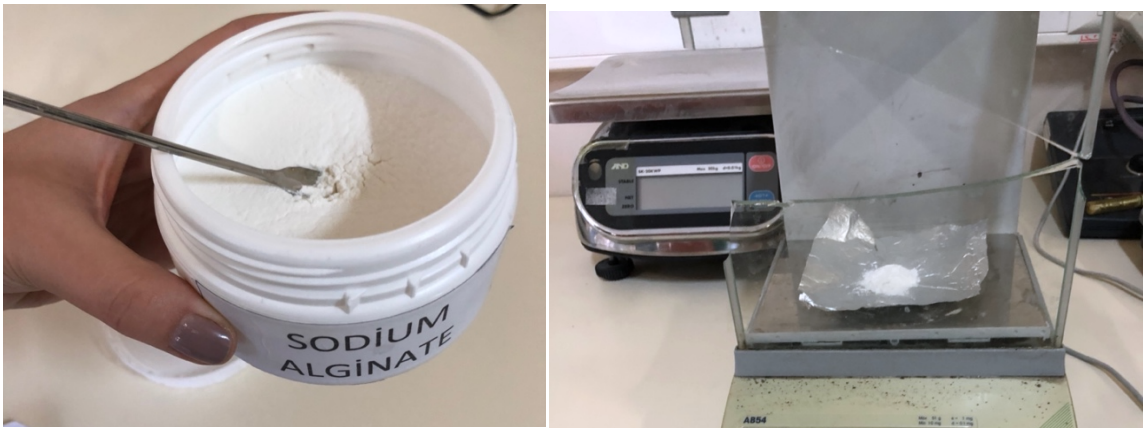
Çözelti hazırlanırken, 100 ml su ve 3 gr Sodyum Aljinat eklenerek %3'lik Sodyum aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti hacimli ve jelatinimsi yapılıdır. Aljinat çözeltisi hazırlanırken el ile karıştırıcı yardımı ile de yapılacağı gibi, hızlı karıştırıcıda balık yardımı ile de hazırlanabilir. El ile karıştırırken bazı aksilikler oluşabilir bu nedenle homojenik jelimsi yapısı elde edilemez. Daha iyi bir çözelti hazırlayabilmek için karıştırıcıdan yararlanıp ardından manuel karıştırmaya devam edilir.



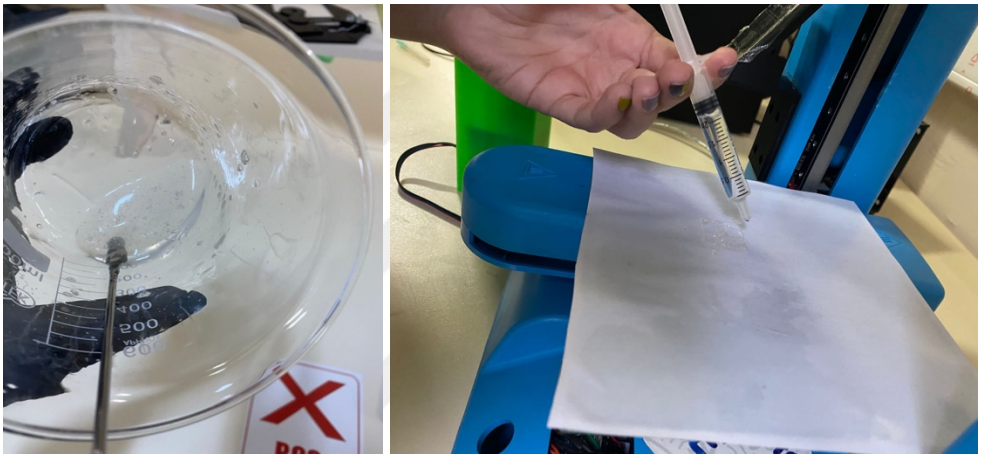
Şekil 4. 4. Aljinat Çözeltisinin Saklanma Hazırlığı

Deney süresindeki denemelerde her defasında yeniden çözelti hazırlamak yerine, Sodyum Aljinat çözeltisi hazırlandıktan sonra buzdolabında 18 °C 'de ortalama 12 gün muhafaza edilebilmektedir. Bu sayede deney aşamasında zamandan ve kimyasal malzemeden tasarruf sağlanır. Sodyum aljinatlar hem sıcak hem de soğuk suda çözünebilir olduğundan, buzdolabında daha uzun süre tuttuğumuzda kıvamını kaybetmeye başlar.

Hazırlık aşamasındaki tüm kimyasallar deneyde kullanılacak modele uygulanmadan önce ultrasonik temizleyici kullanarak steril edilmelidir.



Şekil 4. 5. 5Eklenilecek Aljinat Tozu Miktarının Hassas Terazide Ölçülmesi



Şekil 4. 6. %3'lük Sodyum Aljinat Çözeltisi



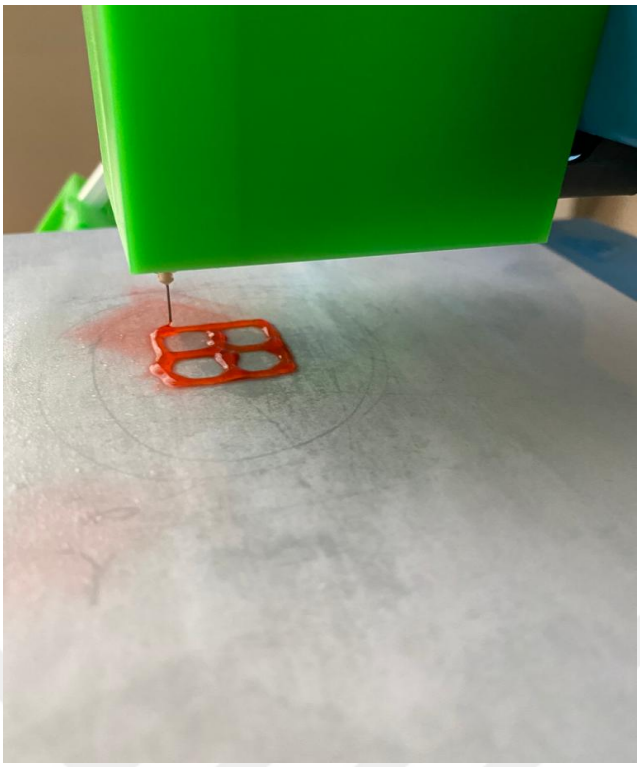
Şekil 4. 7. Çözeltilerin Ultrasonik Temizleyicide Temizlenmesi

4.4. Aljinat İçerikli Baskıların Karşılaştırılması

Yapılan laboratuvar denemelerine göre eğer bir katmanlı baskı oluşturmak isteniliyorsa %3 yoğunluklu aljinat içerikli çözeltinin yazıcı tablasına yapışmasını sağlayacak bir malzeme konulduğunda CaCl2 çözeltisi ile çapraz bağlanarak planlanan şekilde bir biyobaskı almak mümkün olacaktır. Geliştirilen baskı daha uzun süreli saklanmak istenilirse %3 yoğunluklu jelatin çözeltisi ilave edilerek sorun ortadan kalkmıştır. Deney esnasında yapılan denemelere aşağıda yer verilmiştir.



Şekil 4. 8. %3'lük Aljinat İle Yapılmış Bir Deneme [1]



Şekil 4. 9. %3'lük Aljinatın Kırmızı Mürekkep ile Basılması [1]



Şekil 4. 10. %3'lük Aljinatın Çaprazlanmış Formu [1]

4.5. Baskısı Planlanan 3 Boyutlu Hidrojellerin Cura Yazılımındaki Ayarları

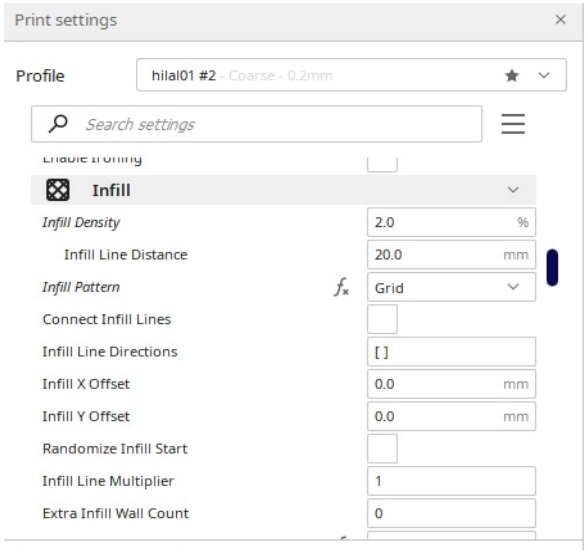
Geometrisindeki boşluklu yapısına göre ilaç salınım ve çapraz bağlanma süresi değişmektedir. Bu yapıların geometrilerinin değiştirilebilir olması, uygulama alanlarına göre büyük avantaj sağlamaktadır. Aşağıdaki örneklerde, parametre ayarlarına ve geometrilerin x,y,z eksenleri üzerindeki sanal görüntülerine yer verilmiştir.

Parametre ayarlarına bakıldığında:

- Dolgu yoğunluğu
- Dolgu hattı mesafesi
- Dolgu deseni
- Dolgu bağlayıcı hat
- Dolgu başlangıcının rastgele seçilmesi
- Dolgu hattı çoklayıcı
- Ekstra dolgu duvar sayısı gibi parametreler mevcuttur.

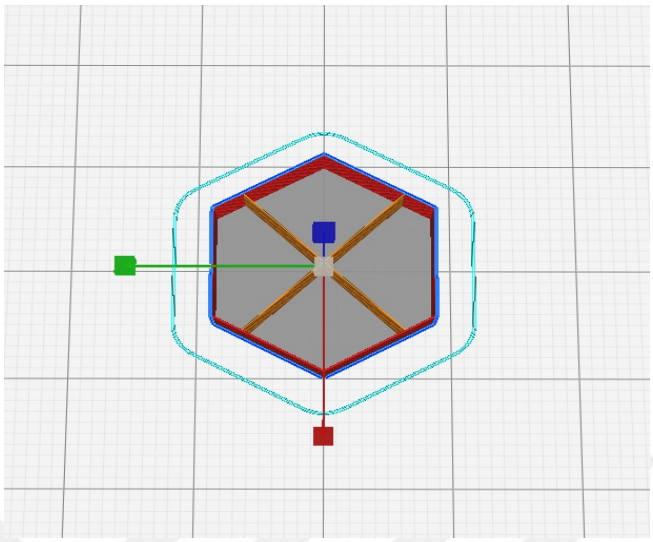
Bu parametrelerde değişiklikler yaparak 3 Boyutlu görüntü Cura'da ön görülür, ardından baskı işlemine başlanır. Farklı dolgu parametrelerine sahip bu yazılımda, tek seferde birden fazla geometri de basılabilir.

- Grid (Izgara) Geometrisi



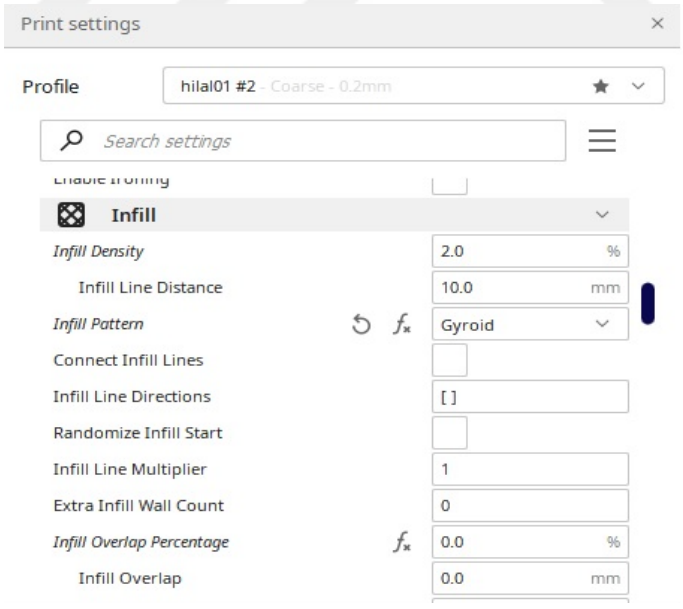
Grid geometrisinde dolgu hattı mesafesi uzunluğu 20.0 mm'dir.

Şekil 4. 11. Grid Geometrisi için Şekil Ayarları



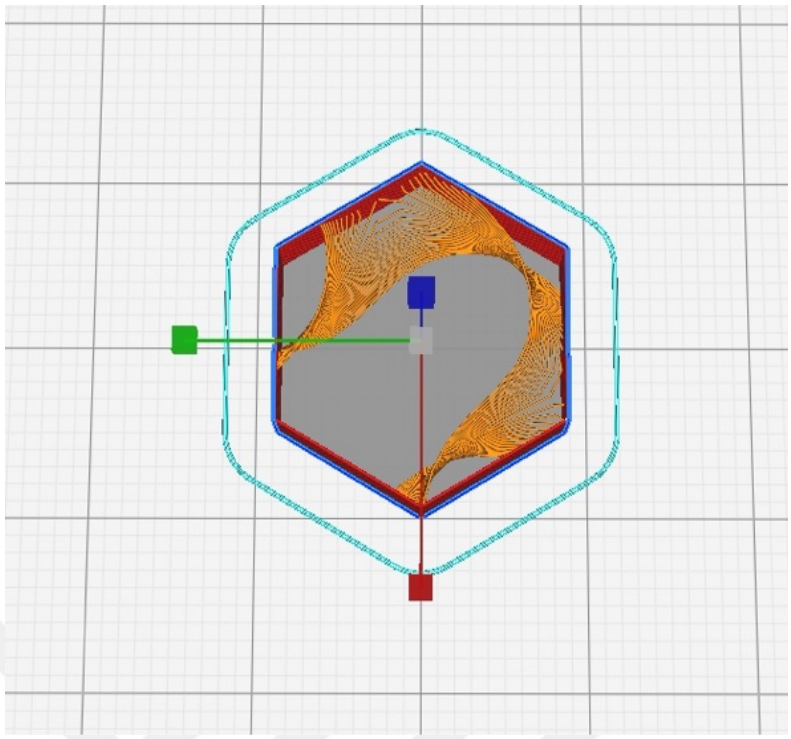
Şekil 4. 12. x,y,z Düzleminde Grid Şekli

- Gyroid (Grafen) Geometrisi



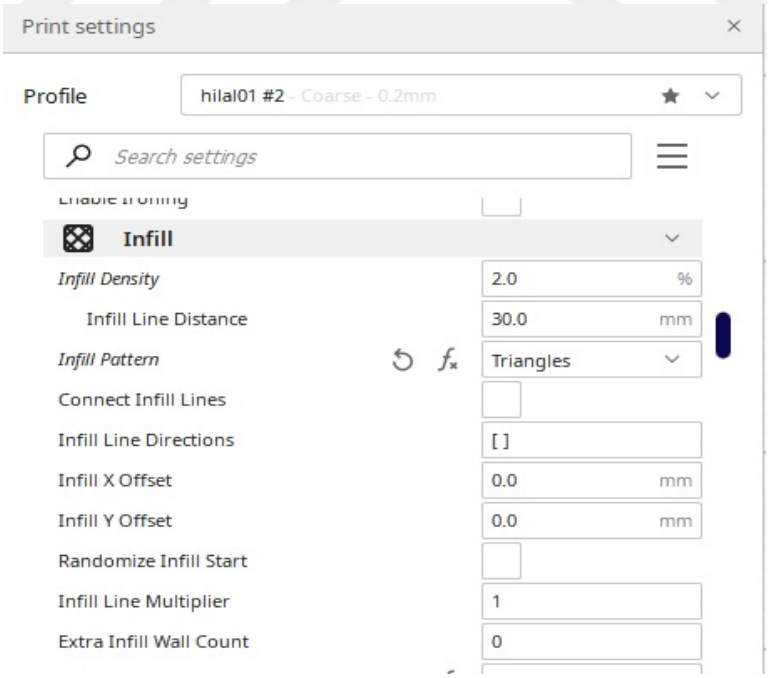
Şekil 4. 13. Gyroid Geometrisi için Şekil Ayarları

Grid geometrisinde dolgu hattı mesafesi uzunluğu 10.0 mm'dir.



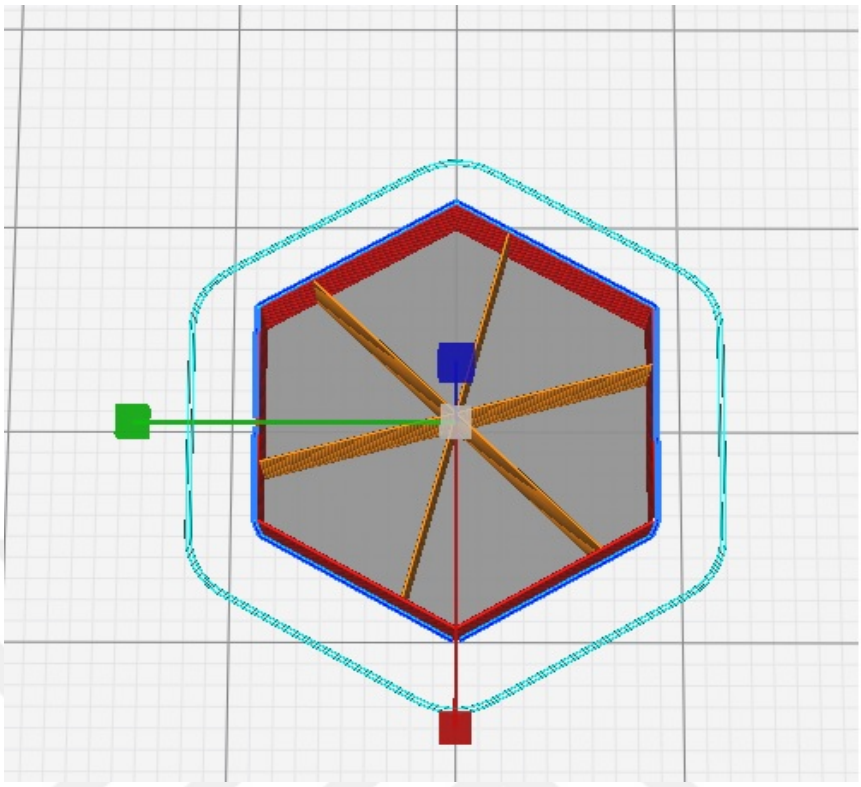
Şekil 4. 14. x,y,z Düzleminde Gyroid Şekli

- Triangle (Üçgen) Geometrisi



Şekil 4. 15. Triangle Geometrisi için Şekil Ayarları

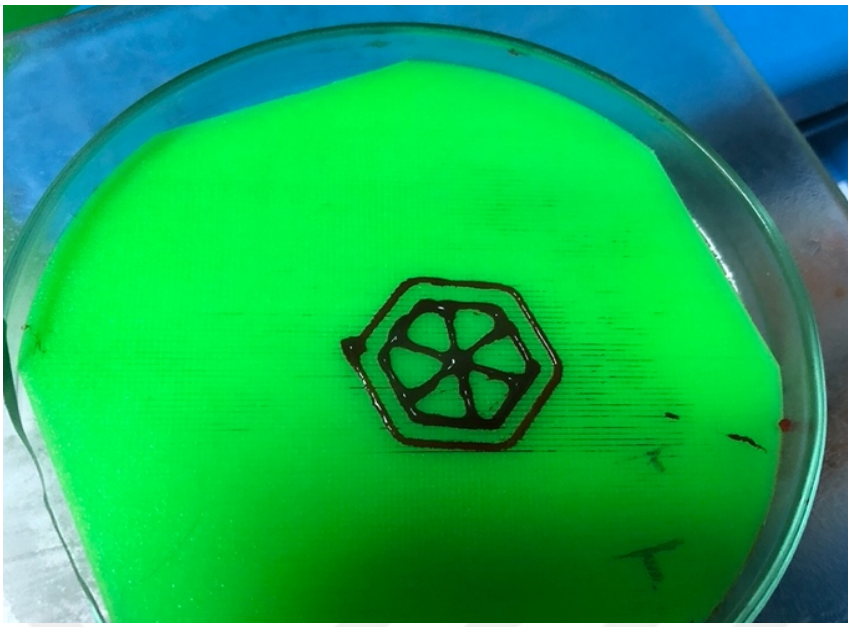
Triangle geometrisinde dolgu hattı mesafesi uzunluğu 30.0 mm'dir.



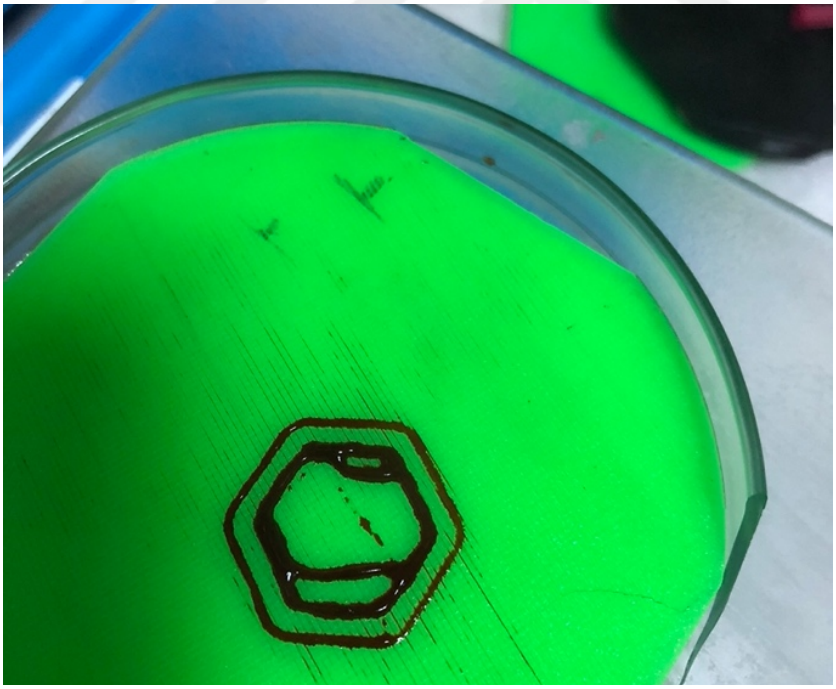
Şekil 4. 16. x,y,z Düzleminde Triangle Şekli

4.6. Biyoyazıcıda Basılmış Hidrojel Örnekleri

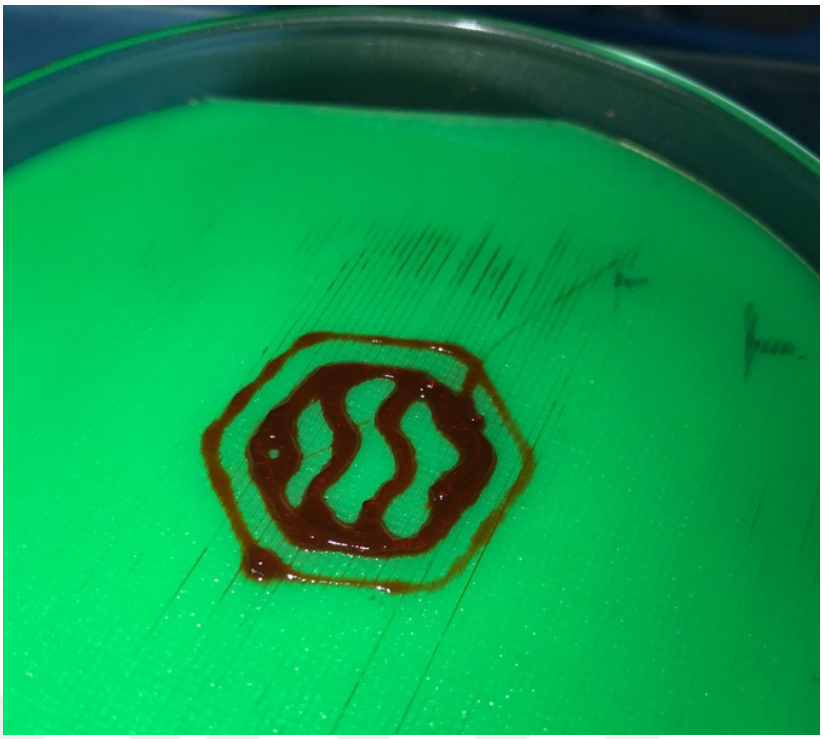
Cura isimli 3 Boyutlu baskı modellemesi için kullanılan program aracılığıyla birçok 3 boyutlu hidrojel baskılar alınmıştır. Parametrelerdeki değişikliklere bağlı, bilgisayar ortamında ön görülen baskı geometrisi görülür. Ayarlamalar yapılırken şekildeki dolgu boşluk yüzdeleri ve hattı mesafeleri değiştirilerek aşağıdaki şekiller dizini geliştirilmiştir.



Şekil 4. 17. Katman Basılmış Triangle Geometrisi



Şekil 4. 18. Katman Basılmış Gyroid Geometrisi



Şekil 4. 19. Katman Basılmış Lines Geometrisi

4.7. CAM Modeli için Döllenmiş Yumurtaların Hazırlanması

Deney için gerekli 30 adet döllenmiş yumurta, Başkent Üniversitesi Tavuk Çiftliği'nden temin edilmiştir. Bu çalışma,Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.Yumurtalar ilk alındıklarında 37°C' de bir gün karanlık odada bekletilmiştir. Ertesi gün karanlık odadan çıkarılan yumurtalar 3 gruba ayrılmıştır.

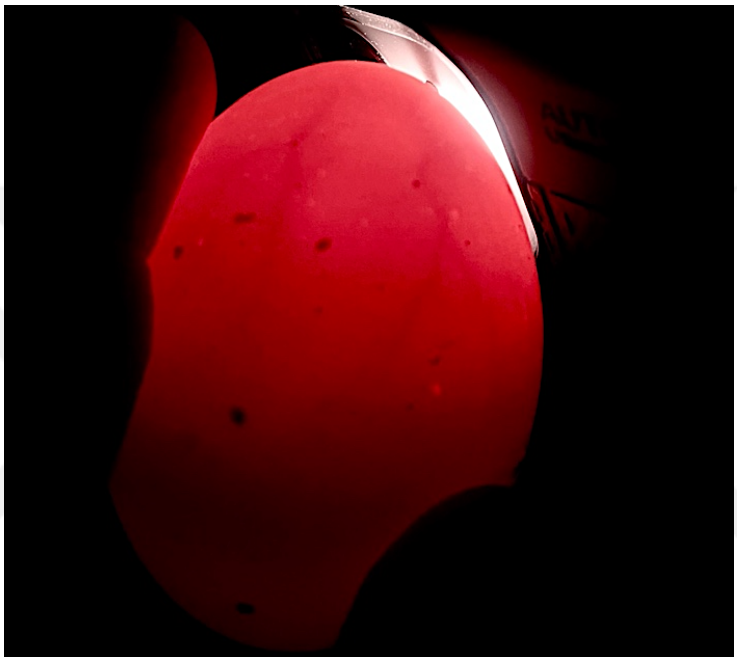


Şekil 4. 20. Etüve Konulmadan Önce Yumurtaların Alkol ile Silinmesi



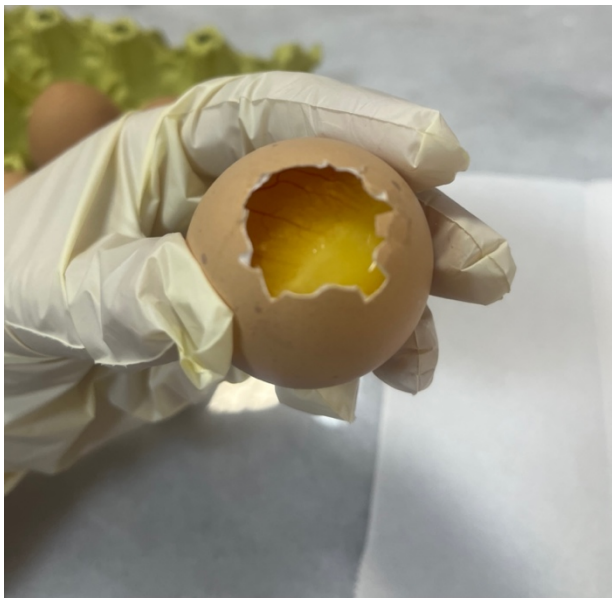
Şekil 4. 21. Etüvde Bekletilen Yumurtalar

Karanlıkta 24. Saat kalan yumurtalar, etüve aktarılarak (37°C ısı) 6 gün bekletildiler. 6. günün sonunda yumurta kabukları alkolle silinmiş ve her biri 3 gruba ayrılmıştır. 6 günün ardından karanlık ortamda halojen ışık yardımı ile damarlanması kontrol edilen yumurtalar etüve tekrar konulur. Sonrasında, periyodik olarak her gün kontrolü gerçekleşen yumurtalar 10. Güne kadar bekletilip tekrar alkol ile dış yüzeyleri silinir ve kabuklarının üst kısımları soyulur.



Şekil 4. 22. 6.Gün Damarlanma Kontrolü Yapılan Yumurta Örneği

Hazırlanan gruplar üzerinden her bir yumurtanın CAM kısmı sterilize edilmiş cımbız ile açılmıştır. Kabukların açılması sırasında inflamatuar etkinin en aza indirgenebilmesi için küçük cımbız darbeleri ile kırılıp, yavaş bir şekilde soyulur. Bu sayede yumurtanın içine kabuk düşmesi engellenir.Her gruba belirlenen geometrideki progesteronlu hidrojel baskılar eklenmeden önce, hidrojel baskılar uv ışığın altında bekletilerek steril edilir.



Şekil 4. 23. Alkolle Silinip Kabuğu Açılmış Yumurta Örneği

Kabukları açılıp damarlanması en iyi gözlemlenen 10 adet yumurta etüvden alınıp, hidrojellerin eklenmesi için ayrılır. Farkı dolgu hattı mesafesi ve boşluğuna sahip geometrilerdeki hidrojel baskılar yumurtalara eklenir.



Şekil 4. 24. Yumurtanın İç Yapısına Triangle Geometrisi Eklenirken



Şekil 4. 25. Gruplanıp 3 Farklı Geometride Hidrojel Eklenmiş Hali

Yumurtaların streç film ile kaplanıp etüve eklendiği aşamada, yumurtaların kabuk içi kısmının oksijen ve ısı ile direl temas etmemesi çok önemlidir. Bu nedenle, iki kez çift taraflı yönde streç film ile kaplanır.

İşlemin sonunda yumurtalar 36- 37°C olacak şekilde 2 günlük süreyle etüve konularak kontrol edilmiştir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Literatür araştırmalarında biyomürekkeplerin geliştirildiği,simüle edildikleri ve belirli reçetelere sahip olduğu görülmüştür. Sodyum aljinat ile CaCl2 karışımı sonucunda esnek, yumuşak katı kıvamlı jel bir yapı elde edilmiştir. Daha sonra aynı işlem ekstrüzyon tabanlı biyo-baskı işleminde tekrarlanmıştır. Sonrasında, simüle edilen değerler ile biyo-baskı ile elde edilen değerler örtüşürse, proje devamı olarak, hücreleri de hidrojel içeriğine dahil ederek biyo-uyumlu iskele yapısını oluşturmak hedeflenmiştirBu deneme sonucunda, deneyi daha ileri götürüp bu kıvamlı jel ile 3 Boyutlu baskı elde edilmesi planlanmıştır. Başkent Üniversitesine ait biyoyazıcı kullanılarak bu amaca varılmıştır. Deneyde yeni bir çaprazlama yöntemi düşünülerek "nem püskürtme cihazı" kullanılmıştır. Bu cihaz sayesinde yüzde birbirine karışmadan aljinat çapraz bağlanarak daha vizkos bir form elde edilmiştir. Bahsi geçen nem püskürtme cihazı, çok ucuz ve kolay yolla temin edilebilen şarjlı bir nemlendirme aracıdır.

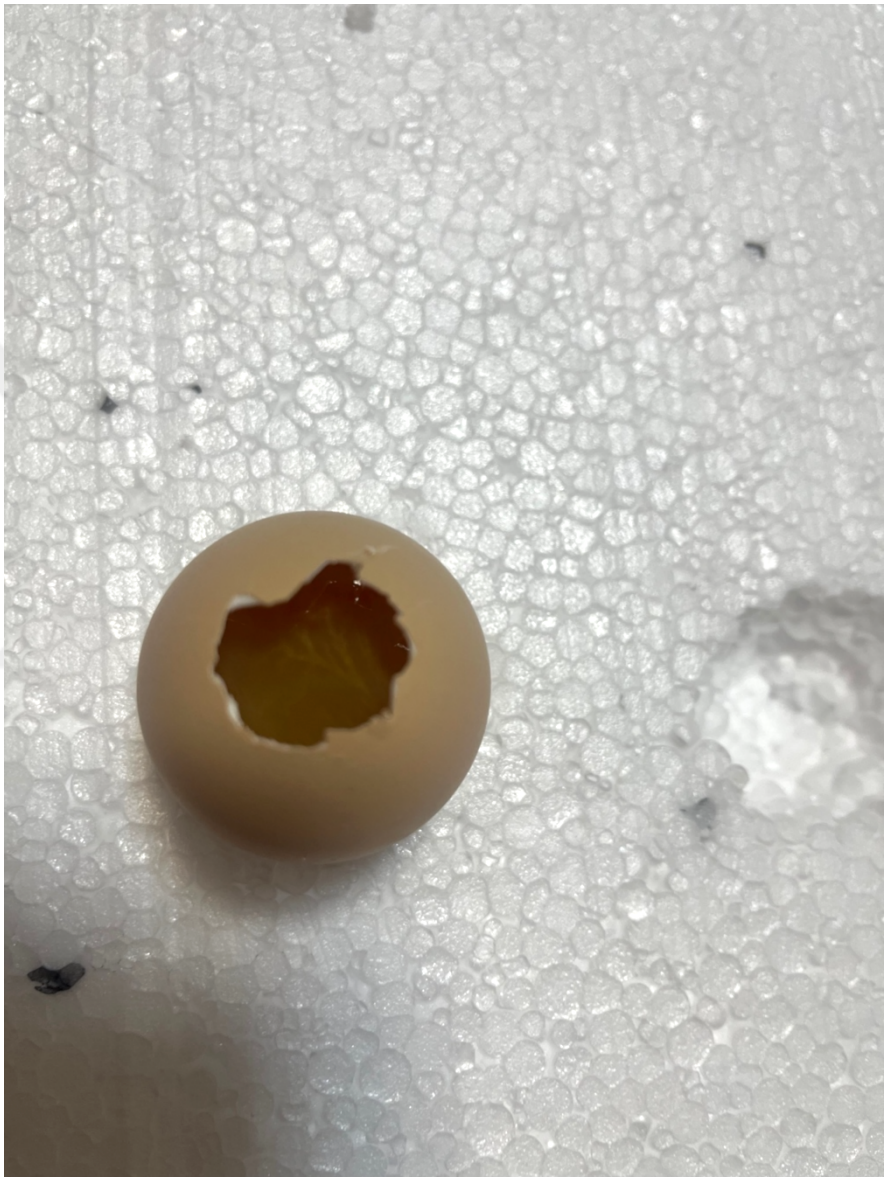
Hidrojel sentezindeki çalışmaları, özetlersek, çapraz bağlama oluşturabilmek için kullanılan CaCl2 hücre canlılığını etkiler. Sadece aljinat kullanımında daha güçlü ama hücre canlılığını etkiler. Hidrojellerin düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığı artıyor fakat bu yapılırsa da stabilizasyon azalıyor .Stabilizaston, hidrojellerin CAM'e uyarlanması için büyük bir ön koşuldur. Literatür taramalarında GelMa isimli biyomürekkep mekanik özelliklerine bakıldığında canlı hücrelerle çalışma esnasında en kullanışlı olduğu vurgulanmıştır fakat bu malzemenin temini çok pahalı ve kolay değildir. Bu nedenle, hedeflenen biyomürekkep aljinat bazlı üretilip, konsantrasyonu ile oynanıp büyüme hormonu eklenerek hücre canlılığındaki etkisine bakılmıştır.

Projenin devam aşamasında üretilen biyomürekkep CAM modeline simüle edilerek çalışmanın anjiyogeneze etkisi gözlenilmiştir. Laboratuvar ortamında hücre canlılığına bakılırken, tavuk embriyosundan yararlanılarak ilaç salınımı izlenerek sonuçlar elde edilmiştir. Burada bahse geçen sonuçlar, ilk olarak 16 günlük süreçte öncesi ve sonrası görsellerle kıyaslanıp, fotoğraflanmıştır.

5.2. Bulgular

Aşağıdaki şekilde yer verilen yumurtalar numaralandırılmıştır. Numaralar sayesinde hangi yumurtaya hangi geometrideki hidrojel baskı eklenmiş kıyaslanır.

Deneyin ikinci aşaması olan anjiyogenez sürecine geçildiğinde, CAM'de yumurtalar ayırt edici olması için numaralandırılmıştır. Bu sayede farklı geometrili eklenmiş 3 boyutlu hidrojel baskıların etkisi kıyaslanabilir. Şekil 5.1'de 0 ile numaralandırılmış yumurta örneğinin 12. Günün sonunda kabuğu soyulmuş ve alkol ile steril edilmiş görselidir.



Şekil 5. 1. 0 Numaralı Yumurta

0 numaralı yumurta iç yapısına herhangi bir biyobaskı eklenmeden 12 gün boyunca etüvde bekletiliğ, ardından çıkartılıp alkol ile steril edilip kabuğu soyulmuştur. Bu yumurta

modeli nötr olarak adlandırılabilir. Progesteron içerikli çözeltinin biyomürekkep olarak kullanılıp alınan biyobaskı eklenmiş yumurtalar ile anjiyogenez süreci kıyaslanırken, 0 numaralı yumurtadan yararlanılmıştır.

İç yapısı incelendiğinde, şekilde de görüldüğü üzere 0 numaralı yumurtanın 12.günün sonunda çıkartılarak hidrojel baskı eklenir. 14.günün sonunda etüvden çıkartılıp bakıldığında damarlar belirginleşmiştir. İnce yapılı ve çok sık değildir.

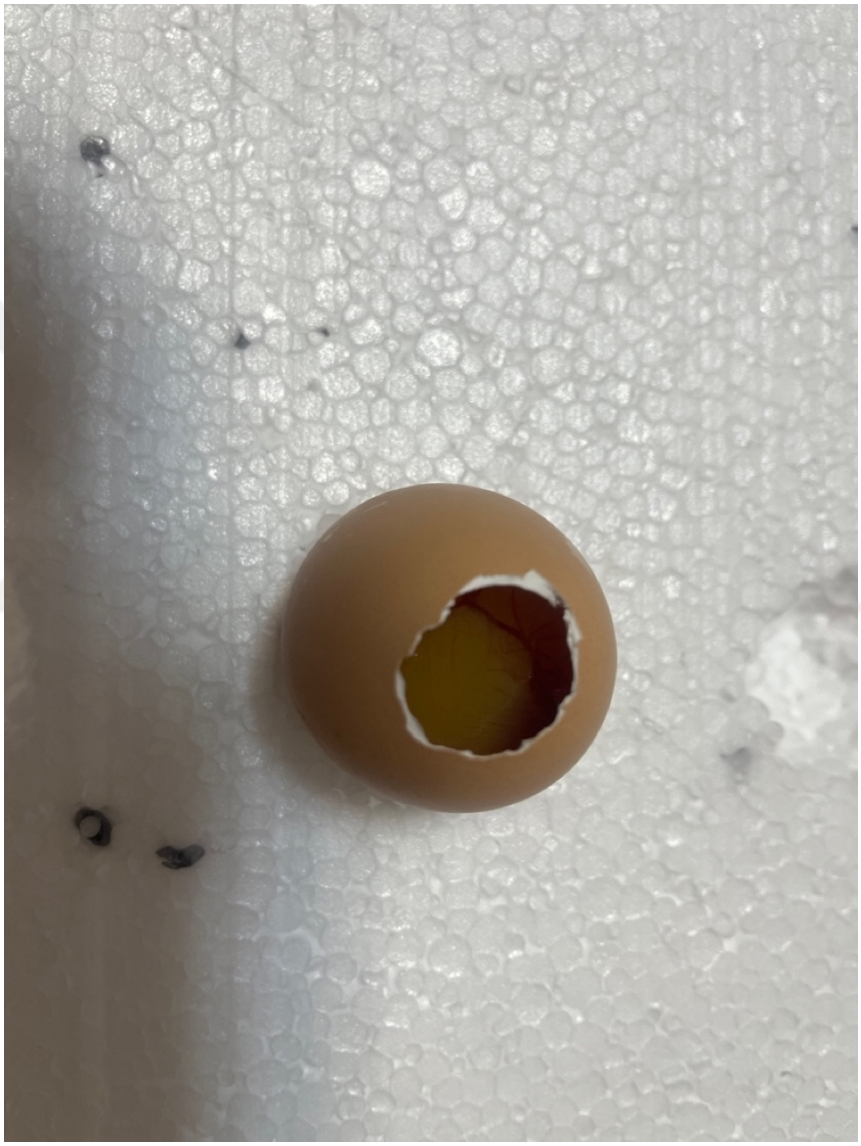
Şekil 5.2'de 1 numaralı yumurta yer almaktadır. 1 numaralı yumurta 12 gün boyunca etüvde bekletilirken içine gyroid geometrili 10.0 mm dolgu hattı mesafesine sahip 3 boyutlu hidrojel baskı eklenmiştir. 14.günün bitiminde yumurtalar etüvden tekrar çıkartılıp 0 numaralı yumurta ile kıyaslandığında, damar kalınlığı, damarlanma sayısında artış görülmemiştir ve renk kırmızıdan beyaza dönmeye başlamıştır.



Şekil 5. 2. 1 Numaralı Yumurta

(3 boyutlu hidrojel baskı eklenmiş hali)

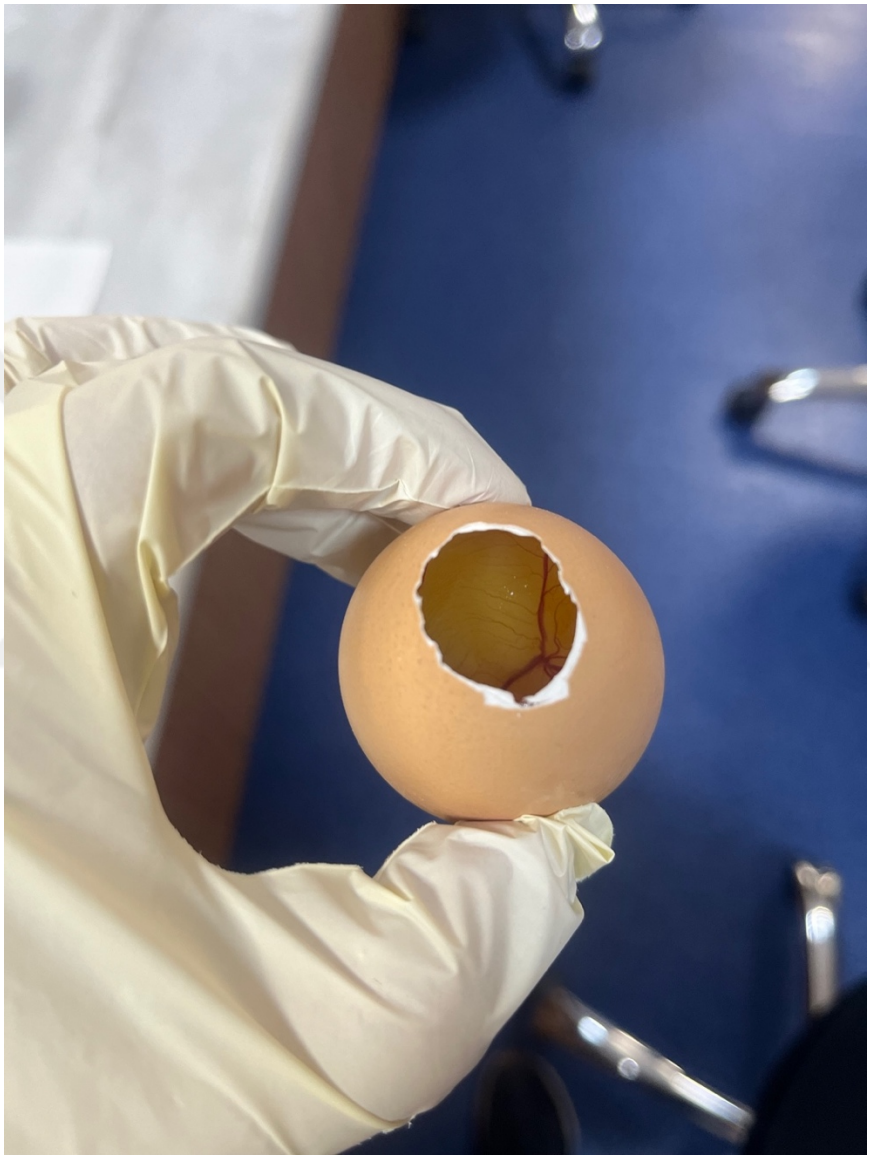
Aşağıda yer alan şekil 5.3'teki yumurta görseli 14.günün sonuna aittir. 12 gün boyunca kabuğu soyulmadan etüvde bekletilen 1 numaralı yumurta, 12.günde çıkartılıp soyuldu ve. İçerisine gyroid geometrili 10.0 mm dolgu hattı mesafesine sahip hidrojel + progesteron içerikli 3 boyutlu baskı eklenmiştir. Şekil 5.2 ile kıyaslandığında, damarlı yapı kırmızı renge dönmüş ve damarlar kalınlaşmıştır.



Şekil 5. 3. İlaç Salınımından Sonra 1 Numaralı Yumurta

(3 boyutlu hidrojel + progesteron baskı eklenmiş hali)

Şekil 5.4’te 2 numaralı yumurta yer almaktadır. 2 numaralı yumurta 12 gün boyunca etüvde bekletilirken içine grid geometrili 20.0 mm dolgu hattı mesafesine sahip 3 boyutlu hidrojel baskı eklenmiştir. 14.günün bitiminde yumurtalar etüvden tekrar çıkartılıp 0 numaralı yumurta ile kıyaslandığında, damar kalınlığı artmıştır.

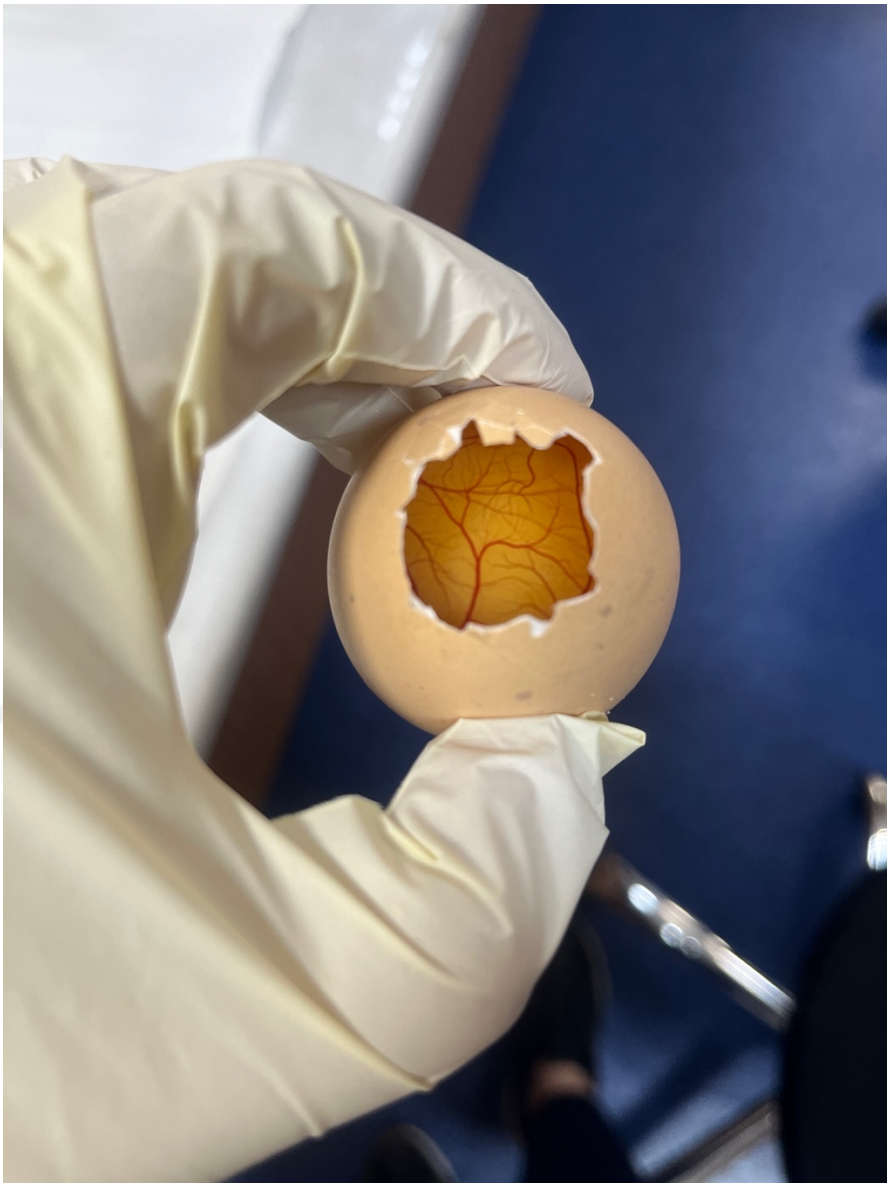


Şekil 5. 4. 2 Numaralı Yumurta

(3 boyutlu hidrojel baskı eklenmiş hali)

Aşağıda yer alan şekil 5.5’teki yumurta görseli 14.günün sonuna aittir. 12 gün boyunca kabuğu soyulmadan etüvde bekletilen 2 numaralı yumurta, 12.günde çıkartılıp

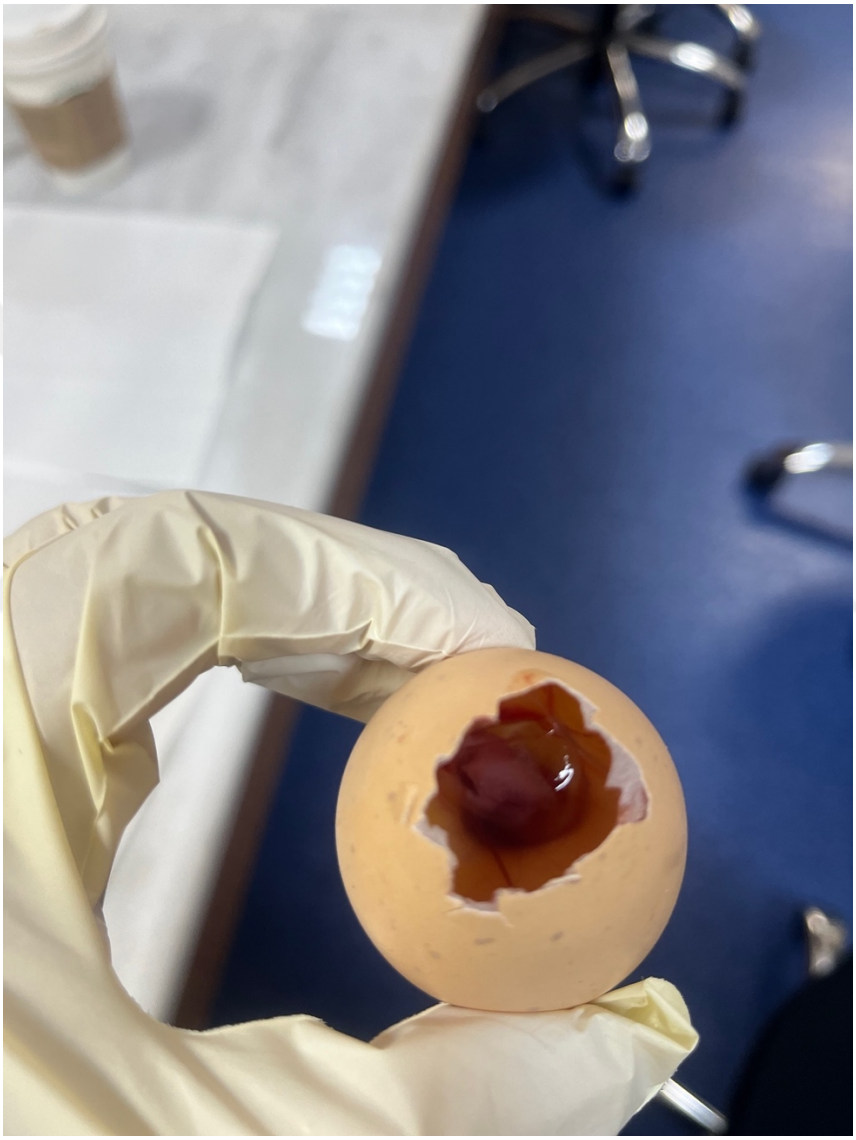
soyuldu ve. İçerisine lines geometrili 20.0 mm dolgu hattı mesafesine sahip hidrojel + progesteron içerikli 3 boyutlu baskı eklenmiştir. Şekil 5.4 ile kıyaslandığında, damarlardaki dallanma sayısı ve yumurtanın ağırlığı artmıştır.



Şekil 5. 5. İlaç Salınımından Sonra 2 Numaralı Yumurta

(3 boyutlu hidrojel + progesteron baskı eklenmiş hali)

Şekil 5.6’da 3 numaralı yumurta yer almaktadır. 3 numaralı yumurta 12 gün boyunca etüvde bekletilirken içine triangle geometrili 30.0 mm dolgu hattı mesafesine sahip 3 boyutlu hidrojel baskı eklenmiştir. 14.günün bitiminde yumurtalar etüvden tekrar çıkartılıp 0 numaralı yumurta ile kıyaslandığında, damar kalınlığı artmıştır ve içinde keseye benzer damarlı bir yapı oluşmuştur. Yumurtanın ağırlığı oldukça artmıştır.



Şekil 5. 6. 3 Numaralı Yumurta

(3 boyutlu hidrojel baskı eklenmiş hali)

Son yumurta yapısına bakıldığında, sıradaki yumurta 3 numaralıdır. Aşağıda yer alan şekil 5.7’deki yumurta görseli 14.günün sonuna aittir. 12 gün boyunca kabuğu soyulmadan

etüvde bekletilen 2 numaralı yumurta, 12.günde çıkartılıp soyuldu ve. İçerisine triangle geometrili 30.0 mm dolgu hattı mesafesine sahip hidrojel + progesteron içerikli 3 boyutlu baskı eklenmiştir. Şekil 5.4 ile kıyaslandığında, bu yumurta örneğinde kese içerisindeki damarlanmaların kaybolduğu görülmüştür. Yumurta ağırlığı diğerleri ile kıyaslandığında maksimum ağırlıktadır. Yumurta içerisindeki kese yapı yerini uzuvları olan embriyo benzeri bir yapıya bırakmıştır. Yumurta içerisinde kötü vb. bir koku yoktur.



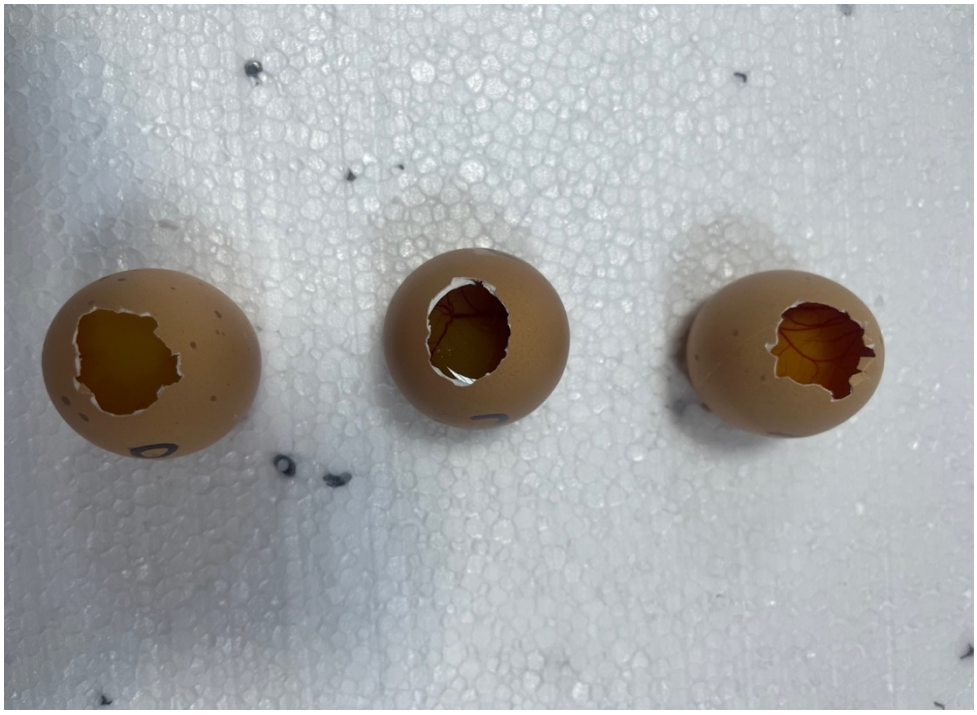
Şekil 5. 7. İlaç Salınımından Sonra 3 Numaralı Yumurta

(3 boyutlu hidrojel + progesteron baskı eklenmiş hali)

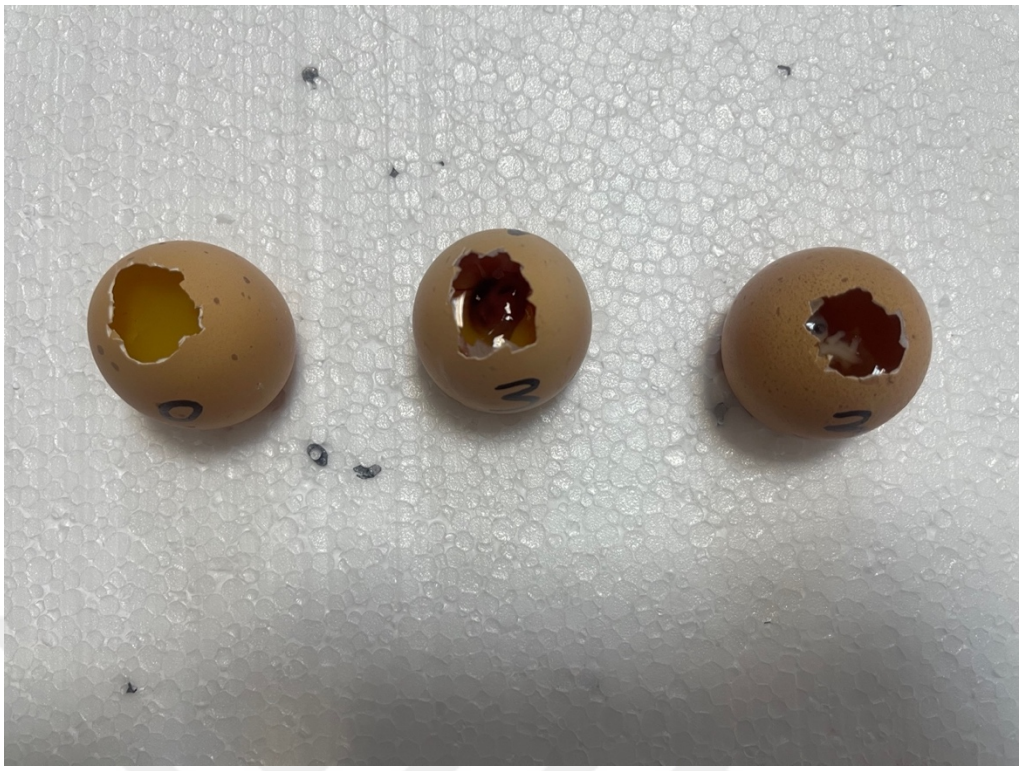
5.2.1. Deney Sonucundaki Kıyaslama Görüntüleri



Şekil 5. 8. 0-1-1' görüntüsü



Şekil 5. 9. 0-2-2' görüntüsü



Şekil 5. 10. 0-3-3' görüntüsü

Deney sonucunda yumurtaların etüvde geçecek kuluçka süresine kadar geçirdiği süreçte yaşanan olumsuz hava koşulları düşünüldüğünde, 30 adet yumurta içerisinde belirlenen 10 adet yumurta ile deney çalışması yapılmıştır.

Anjiyogenez sürecinde görülmesi hedeflenen nokta farklı geometrilerin anjiyogenez sürecine etki edip etmemesidir. Bu geometrilerin temel farkı yapıları içerisindeki boşluklardır. Boşluk yapıları büyükten küçüğe: gyroid, triangle ve lines olarak sıralanır.

Aynı koşullar altında, aynı progesteron dozuna sahip çözeltilerle üretilen hidrojeller 1, 2 ve 3 numaralı yumurtalara uygulandığında: 2 numaralı yumurtadaki damarlanma süreci en iyi gözlemlenmiştir.

Özetle aljinat bazlı hidrojeller saf su içerisinde yaklaşık 36 saat boyunca erimeden kalabilirken, yumurta içerisinde yumurta akının viskozitesi ve pH'ı nedeni ile çok daha hızlı erirler. Bu erime ve hidrojel baskının yok olma süresi 14 saat civarıdır. Deney süresince beklenen, hidrojel baskıların yumurta içerisinde temas eden alanları arttıkça ilaç salınım süresinin hızlanmasıdır. Temas eden alanlar, doku katman mesafeleri ve yüzdeleri ile belirlenmiştir.

Hedeflenen sonuç anjiyogenez sürecinin, hidrojel geometrilerindeki boşluk yapılarını ile ters oranda olmasıdır. 14 günlük deney sürecinin sonunda, anjiyogenez gelişimi açısından en iyi 2 numaralı yumurtada gözlem yapılmıştır. 10 mm doku katman seviyeli yani 3 numaralı yumurtada, anjiyogenez süreci dışına çıkılarak embriyo oluşumu gerçekleşmiştir. Bahsi geçen embriyo gelişimi, anjiyogenez sürecinin olumlu ilerlemesi sonucu gelişmiştir.

6. TARTIŞMA

6.1. Deney Kısıtları

Deney sürecinin en başında yaşanılan en büyük sıkıntıların başında, geliştirilen jelin tabla üzerine yapışmaması ve şırınga ucunda toplanarak istenilen şekli oluşturamaması gelmiştir.

Baskı denemelerinde en büyük problem iskele yapısının stabilizasyonunda gerçekleşmiştir. İlk karşılaşılaşılan problem kullanılan insülin şırıngasının iğne ucunun 0.45 mm çapında yani ince olmasından kaynaklı viskoz olan kremi basarken nozülde çok fazla basınç oluşturarak iğne ucunu tıkaması olmuştur.

Son olarak biypyazıcının kalibrasyon detaylarına bakıldığında sürekli kalibrasyon yapılmasına sebep olan bir durumdan bahsedilmelidir. Bu da kullanılan iğnenin ucunun akış hacmine etkisidir. Standart iğne uçları eğik kesimlidir ve bu durum baskı işleminde hacmin kontrol altında tutulamamasına neden olur. Bu nedenle her seferinde baskıya başlamadan önce iğne uçları dramel kullanılarak düz bir şekilde kesildi. Bu da aslında kolay bir işlem değildir. İğne ucunu düzleştirmek için yapılan kesme işlemini standardize etmek mevcut şartlarda olası değildir. Oluşan problemin nozül tutucusu sayesinde giderebilineceği ön görülmüştür fakat deneye uyarlanmamıştır.

Anjiyogenez sürecindeki zorlukların başında ise yumurta temini esnasındaki hava koşulları gelmektedir. CAM'den yararlanılacağında bu modeldeki yumurtalar kuluçkalık olarak adlandırılan yapıda olur. Kuluçka süresinde yumurta optimal sıcaklığından uzaklaştığında yapısındaki döl ölmektedir. Bunun önüne geçebilmek için, yumurtalar temin edildiği alandan sıcak su torbaları ile getirilmiştir.

KAYNAKLAR

[1] H. Hasan And H. Kul, "Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı Düşük Maliyetli 3 Boyutlu Biyo Yazıcı Tasarlanıp Gelistirilmesi."

[2] "Kemik Hasarları İçin Vaskülarize Doku Mühendisliği: 3b Biyoyazıcı İle Hidrojel/Hücre/Biyosinyal Sistemlerin Hazırlanması Vascularızed Tıssue Engıneerıng For Bone Defects: Preparatıon Of Hydrogel/Cell/Bıosıgnal Systems By 3d."

[3] S. Ud-Din *Et Al.*, "Angiogenesis İs İnduced And Wound Size İs Reduced By Electrical Stimulation İn An Acute Wound Healing Model İn Human Skin," *Plos One*, Vol. 10, No. 4, Apr. 2015, Doi: 10.1371/Journal.Pone.0124502.

[4] A. Tufan And N. Satiroglu-Tufan, "The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane As A Model System For The Study Of Tumor Angiogenesis, Invasion And Development Of Anti-Angiogenic Agents," *Curr Cancer Drug Targets*, Vol. 5, No. 4, Pp. 249–266, Jun. 2005, Doi: 10.2174/1568009054064624.

[5] P. Nowak-Sliwinska, T. Segura, And M. L. Iruela-Arispe, "The Chicken Chorioallantoic Membrane Model İn Biology, Medicine And Bioengineering," *Angiogenesis*, Vol. 17, No. 4. Kluwer Academic Publishers, Pp. 779–804, Oct. 01, 2014. Doi: 10.1007/S10456-014-9440-7.

[6] P. Mühendisliği, A. Dalı, P. M. Programı, H. Mühendislik, B. Programı, And H. Program, "Ekim 2016 Yalova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kitosan Esaslı Yeni Doğal Hidrojellerin Sentezi Ve İlaç Salınım Sistemi Uygulamalarında Kullanımı Yüksek Lisans Tezi Merve Ünal."

[7] Mehmet Onur Aydoğdu And D. Doç Oğuzhan Gündüz Eş-Danışman Serdar Salman, "3 Boyutlu Biyo Baskı Yöntemi İle Hidrojel Katkılı Doku İskeleti Üretimi Metalurji Ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Metalurji Ve Malzeme Mühendisliği Programı Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü."

[8] S. V. Murphy And A. Atala, "3d Bioprinting Of Tissues And Organs," *Nature Biotechnology*, Vol. 32, No. 8. Nature Publishing Group, Pp. 773–785, 2014. Doi: 10.1038/Nbt.2958.

[9] M. Nakamura, S. Iwanaga, C. Henmi, K. Arai, And Y. Nishiyama, "Biomatrices And Biomaterials For Future Developments Of Bioprinting And Biofabrication," *Biofabrication*, Vol. 2, No. 1, 2010, Doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014110.

[10] A. Shafiee And A. Atala, "Printing Technologies For Medical Applications," *Trends İn Molecular Medicine*, Vol. 22, No. 3. Elsevier Ltd, Pp. 254–265, Mar. 01, 2016. Doi: 10.1016/J.Molmed.2016.01.003.

[11] T. Xu, W. Zhao, J. M. Zhu, M. Z. Albanna, J. J. Yoo, And A. Atala, "Complex Heterogeneous Tissue Constructs Containing Multiple Cell Types Prepared By İnkjet Printing Technology," *Biomaterials*, Vol. 34, No. 1, Pp. 130–139, Jan. 2013, Doi: 10.1016/J.Biomaterials.2012.09.035.

[12] B. S. , 1 E. M. H. L. And L. J. B. Danıel L. Cohen, " Direct Freeform Fabrication Of Seeded Hydrogels İn Arbitrary Geometries," *Tissue Eng*, 2006.

[13] L. Shor *Et Al.*, "Precision Extruding Deposition (Ped) Fabrication Of Polycaprolactone (Pcl) Scaffolds For Bone Tissue Engineering," *Biofabrication*, Vol. 1, No. 1, 2009, Doi: 10.1088/1758-5082/1/1/015003.

[14] D. F. Williams, "On The Mechanisms Of Biocompatibility," *Biomaterials*, Vol. 29, No. 20, Pp. 2941–2953, Jul. 2008, Doi: 10.1016/J.Biomaterials.2008.04.023.

[15] H. Akkuş, B. Günaydın, And C. Ustundag, "Doku Mühendisliğinde 3 Boyutlu Biyo-Baskı İçin Biyofonksiyonel Mürekkepler," *International Journal Of 3d Printing Technologies And Digital Industry*, Dec. 2020, Doi: 10.46519/İj3dptdi.795922.

[16] R. Cornock, S. Beirne, B. Thompson, And G. G. Wallace, "Coaxial Additive Manufacture Of Biomaterial Composite Scaffolds For Tissue Engineering," *Biofabrication*, Vol. 6, No. 2, 2014, Doi: 10.1088/1758-5082/6/2/025002.

[17] W. E. Hennink And C. F. Van Nostrum, "Novel Crosslinking Methods To Design Hydrogels," *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 64, No. Suppl. Pp. 223–236, Dec. 2012. Doi: 10.1016/J.Addr.2012.09.009.

[18] K. V. And S. G. Piyush Gupta, "Hydrogels: From Controlled Release To Ph-Responsive Drug Delivery," *Research Focus*, 2002.

[19] C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, A. S. Dubovik, N. V. Grinberg, T. V. Burova, And V. Y. Grinberg, "Temperature-Sensitive Chitosan-Poly(N-İsopropylacrylamide) İnterpenetrated Networks With Enhanced Loading Capacity And Controlled Release Properties," *Journal Of Controlled Release*, Vol. 102, No. 3, Pp. 629–641, Feb. 2005, Doi: 10.1016/J.Jconrel.2004.10.021.

[20] G. Geliştirilmesi, S. Shahirdavarpanah, And M. Gümüşderelioğlu, "Hydrogel-Based Tissue Expanders."

[21] D. Wang, D. J. T. Hill, F. Rasoul, And A. K. Whittaker, "A Study Of The Swelling And Model Protein Release Behaviours Of Radiation-Formed Poly(N-Vinyl 2-Pyrrolidone-Co-Acrylic Acid) Hydrogels," *Radiation Physics And Chemistry*, Vol. 80, No. 2, Pp. 207–212, Feb. 2011, Doi: 10.1016/J.Radphyschem.2010.07.034.

[22] M. Gümüşderelioğlu Tez *Et Al.*, "Doku Genişletme Amaçlı Hidrojel Sentezi, Karakterizasyonu ve Şişme Kinetiği Hydrogel Synthesıs As A Tıssue Expander, Characterızatıon And Swellıng Kınetıcs Elif Suna Sop."

[23] Ö. Aydın And İ. Ünlüel, "Enkapsülasyon Teknikleri ve Kontrollü Salım," *European Journal Of Science And Technology*, Jan. 2022, Doi: 10.31590/Ejosat.1039736.

[24] N. A. Peppas And A. R. Khare, "Preparation, Structure And Diffusional Behavior Of Hydrogels İn Controlled Release," 1993.

[25] C. Sayil And O. Okay, "Macroporous Poly(N-İsopropyl)Acrylamide Networks: Formation Conditions." [Online]. Available: Www.Elsevier.Nl/Locate/Polymer

[26] "Jelatin Hidrojellerinin Sentezlenmesi, Şişme/Bozunma Davranışlarının İncelenmesi Ve Uygun İmmobilize Lipaz-Jelatin Hidrojel Sisteminin Oluşturulması Gülen Oytun Akalın Yüksek Lisans Tezi Kimya Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ocak 2011 Ankara."

[27] K. Chwalek, L. J. Bray, And C. Werner, "Tissue-Engineered 3d Tumor Angiogenesis Models: Potential Technologies For Anti-Cancer Drug Discovery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 79. Elsevier B.V., Pp. 30–39, Dec. 15, 2014. Doi: 10.1016/J.Addr.2014.05.006.

[28] J. Logiudice And A. K. Gosain, "Clinical Overview Pediatric Tissue Expansion: Indications And Complications."

[29] X. Cui *Et Al.*, “Advances İn Extrusion 3d Bioprinting: A Focus On Multicomponent Hydrogel-Based Bioinks,” *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 9, No. 15. Wiley-Vch Verlag, Aug. 01, 2020. Doi: 10.1002/Adhm.201901648.

[30] S. T. Aydin *Et Al.*, “Yara Örtüsü Uygulamaları İçin Nanopartikül ve Antibiyotik Yüklü Doku İskelelerinin 3d Basımı.”

[31] K. F. Leong, C. M. Cheah, And C. K. Chua, “Solid Freeform Fabrication Of Three-Dimensional Scaffolds For Engineering Replacement Tissues And Organs,” *Biomaterials*, Vol. 24, No. 13, Pp. 2363–2378, 2003, Doi: 10.1016/S0142-9612(03)00030-9.

[32] “Compatibility, Applications, And Future Of Peptıde-Based Bioinks.,” 2019, Accessed: Apr. 03, 2023. [Online]. Available: Https://Web.Archive.Org/Web/20210426114224/Https://Www.Biogelx.Com/Compatibility-Applications-And-Future-Of-Peptide-Based-Bioinks/

[33] T. Danışmanı And A. Alev Karagözler Aydın, “Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı 2012-Yl-022 Aljinat/Kitosan Nanopartiküllerin Tamoksifen Salımında Kullanılmasının Araştırılması Çağdaş Sunna.”

[34] K. Ranga Rao And K. Padmalatha Devi, “Swelling Controlled-Release Systems" Recent Developments And Applications,” 1988.

[35] X. Yin, A. S. Hoffman, And P. S. Stayton, “Poly(N-İsopropylacrylamide-Co-Propylacrylic Acid) Copolymers That Respond Sharply To Temperature And Ph,” *Biomacromolecules*, Vol. 7, No. 5, Pp. 1381–1385, May 2006, Doi: 10.1021/Bm0507812.

[36] G. M. Cruise, D. S. Scharp, And J. A. Hubbell, “Characterization Of Permeability And Network Structure Of İnterfacially Photopolymerized Poly(Ethylene Glycol) Diacrylate Hydrogels,” 1998.

[37] C. C. Lin And A. T. Metters, “Hydrogels In Controlled Release Formulations: Network Design And Mathematical Modeling,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 58, No. 12–13. Pp. 1379–1408, Nov. 30, 2006. Doi: 10.1016/J.Addr.2006.09.004.

[38] B. Jeong, H. Bae, And S. W. Kim, “Drug Release From Biodegradable İnjectable Thermosensitive Hydrogel Of Peg-Plga-Peg Triblock Copolymers,” 2000. [Online]. Available: Www.Elsevier.Com/Locate/Jconrel

[39] F. Ungaro *Et Al.*, "Microsphere-İntegrated Collagen Scaffolds For Tissue Engineering: Effect Of Microsphere Formulation And Scaffold Properties On Protein Release Kinetics," *Journal Of Controlled Release*, Vol. 113, No. 2, Pp. 128–136, Jun. 2006, Doi: 10.1016/J.Jconrel.2006.04.011.

[40] D. S. Kohane And R. Langer, "Polymeric Biomaterials İn Tissue Engineering," 2008.

[41] C. J. Chun, S. M. Lee, S. Y. Kim, H. K. Yang, And S. C. Song, "Thermosensitive Poly(Organophosphazene)-Paclitaxel Conjugate Gels For Antitumor Applications," *Biomaterials*, Vol. 30, No. 12, Pp. 2349–2360, Apr. 2009, Doi: 10.1016/J.Biomaterials.2008.12.083.

[42] N. Bhattarai, J. Gunn, And M. Zhang, "Chitosan-Based Hydrogels For Controlled, Localized Drug Delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 62, No. 1. Pp. 83–99, Jan. 31, 2010. Doi: 10.1016/J.Addr.2009.07.019.

[43] T. Özgürtaş, "Anjiyogenezde Bir İn-Vivo Model: Civciv Koriyoallantoik Membran."

[44] "Anjiyogenez." Https://Tr.Wikipedia.Org/Wiki/Anjiyogenez (Accessed Apr. 03, 2023).

[45] R. Hamutoğlu, "The Role Of Angiogenesis İn Physiological And Pathological Conditions," *Istanbul Bilim University Florence Nightingale Transplantation Journal*, Vol. 2, No. 2, Pp. 56–62, Nov. 2017, Doi: 10.5606/Fng.Transplantasyon.2017.010.

[46] M.Şahin Doktora Tezi Tez Danıģmanı Prof. Dr. Saadet Gümüşlü Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Tarafından Desteklenmiştir, "Likopenin Anjiyogenez Oluşumuna Etkilerinin İncellenmesi"

[47] M. K. Gupta And R.-Y. Qin, "Mechanism And İts Regulation Of Tumor-İnduced Angiogenesis Mechanısm Of Angıogenesıs," *World Journal Of Gastroenterology World J Gastroenterol*, Vol. 9, No. 6, Pp. 1144–1155, 2003, [Online]. Available: Http://Www.Wjgnet.Com/1007-9327/9/1144.Asp

[48] D. M. Noden, "Embryonic Origins And Assembly Of Blood Vessels 1-3."

[49] J. J. Giles And J. G. Bannigan, "The Effects Of Lithium On Vascular Development İn The Chick Area Vasculosa," 1999.

[50] B. L. Vallee *Et Al.*, “Experientia Reviews Tumor-Derived Angiogenesis Factors From Rat Walker 256 Carcinoma: An Experimental Investigation And Review 1,” 1985.

[51] T. Leng, J. M. Miller, K. V Bilbao, D. V Palanker, P. Huie, And M. S. Blumenkranz, “The Chick Chorioallantoic Membrane As A Model Tıssue For Surgical Retinal Research And Simulatıon,” 2004.

[52] D. Ribatti, B. Nico, A. Vacca, L. Roncali, P. H. Burri, And V. Djonov, “Chorioallantoic Membrane Capillary Bed: A Useful Target For Studying Angiogenesis And Anti-Angiogenesis In Vivo,” 2001.

[53] G. Melkonian, N. Munoz, J. Chung, C. Tong, R. Marr, And P. Talbot, “Capillary Plexus Development İn The Day Five To Day Six Chick Chorioallantoic Membrane is Inhibited By Cytochalasin D And Suramin,” *Journal Of Experimental Zoology*, Vol. 292, No. 3, Pp. 241–254, Feb. 2002, Doi: 10.1002/Jez.10014.

[54] O. Baum *Et Al.*, “Vegf-A Promotes İntussusceptive Angiogenesis In The Developing Chicken Chorioallantoic Membrane,” *Microcirculation*, Vol. 17, No. 6, Pp. 447–457, Aug. 2010, Doi: 10.1111/J.1549-8719.2010.00043.X.

[55] A. Ş. Ürkmez, U. D. Seçkin, C. Görgün, And Y. Uyanıkgil, “Deri Doku Mühendisliği Amaçlı Üç Boyutlu Biyobaskı ve Keratinosit Kültürü,” *Dicle Tıp Dergisi*, Pp. 9–14, Mar. 2018, Doi: 10.5798/Dicletip.363931.