



**T.C.
YALOVA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**POLİMER MALZEME MÜHENDSİLİĞİ ANABİLİM DALI
POLİMER MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI**

**HACİMSEL KAS DOKU KAYIPLARININ TEDAVİSİNE ÖZGÜ
3 BOYUTLU KOMBİNE DOKU MATRİSLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EDANUR ERTÜRK

DANIŞMAN: PROF. DR. KADRIYE TUZLAKOĞLU

**YALOVA
AĞUSTOS 2022**



T.C.
YALOVA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

POLİMER MALZEME MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
POLİMER MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

HACİMSEL KAS DOKU KAYIPLARININ TEDAVİSİNE ÖZGÜ 3 BOYUTLU
KOMBİNE DOKU MATRİSLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EDANUR ERTÜRK
195101020

DANIŞMAN: PROF. DR. KADRIYE TUZLAKOĞLU

YALOVA
AĞUSTOS 2022

ETİK BEYAN

Yalova Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım “HACİMSEL KAS DOKU KAYIPLARININ TEDAVİSİNE ÖZGÜ 3 BOYUTLU KOMBİNE DOKU MATRİSLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksinin tespiti halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Edanur ERTÜRK



İkizlere ve Ela'ya,



ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca daima destek gördüğüm, bana laboratuvarını açan ve asla yardımlarını esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU'na,

Tez çalışmamda kullanılmak üzere iskelet kasına özgü ECM eldesi tedarikinde bulunan Ankara Üniversitesi Kimya bölümünden Dr. Sedat ODABAŞ'a,

Bu çalışma için daima destek veren, yardımsever ve hoşgörülü ekip arkadaşım N.Zeynep RENKLER'e,

Her koşulda yanımda olan, beni bugünlere getiren biricik annem Kadriye SİNECEK başta olmak üzere ablam ve abime,

Bana benden bile çok inanan, kızımın biricik babası, dünyanın en anlayışlı eşi Fuat ERTÜRK'e,

Enerji ve motivasyonumu daima yüksekte tutan iyi ki var diyebildiğim Sema ERTÜRK ve değerli meslektaşım H.Songül KAÇOĞLU'na,

Bu tez çalışmasının desteklenmesine finansal olanak sağlayan TÜBİTAK, Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programına (Proje No: 118M610) teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Ağustos– 2022

Edanur ERTÜRK



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı.....	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kas Sistemi	3
2.2. İskelet Kasları.....	4
2.2.1. İskelet kaslarında hacimsel kayıplar	6
2.3. İskelet Kas Dokusu Üretimi.....	7
2.4. Kas Doku İskelesi Üretim Yöntemleri	8
2.4.1. Elektroeğirme yöntemi	8
2.4.1.1. Elektroeğirme yöntemi avantajları	11
2.4.2. 3B biyobasım tekniği	12
2.4.2.1. 3B biyobasım çeşitleri.....	12
2.4.2.2. 3B biyobasım tekniği avantajları.....	14
2.4.3. Kas hasarlarının onarımında enjekte edilebilir sistemler	14
2.4.3.1. Enjekte edilebilir kas onarım sisteminin avantajları.....	15
2.5 Kas Doku Mühendisliğinde Kullanılan Malzemeler	15
2.5.1. Doğal malzemeler	16
2.5.2. Sentetik malzemeler	17
2.5.3. Kompozit malzemeler	17
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Kullanılan Malzemeler	19
3.2. Nanofiber Membran Üretimi.....	19
3.3. 3-Boyutlu (3B) Doku Matrisleri için Kalıpların Üretilmesi	19
3.4. 3-Boyutlu (3B) Doku Matrislerinin Oluşturulması	20
3.5. Doku Matrislerinin Karakterizasyonu	21



3.5.1. Morfolojik karakterizasyon (SEM)	21
3.5.2. Yapısal analiz (FTIR)	21
3.5.3. Mekanik test	21
3.5.4. <i>In vitro</i> bozunma testleri	22
3.5.5. Elektriksel iletkenlik çalışmaları	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Morfolojik Karakterizasyon (SEM) Analizi	23
4.2. Yapısal Analiz (FTIR)	25
4.3. Mekanik Test	25
4.4. <i>In vitro</i> Bozunma Davranışları	27
4.5. Elektriksel İletkenlik Analizi	28
5. SONUÇLAR	29
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	37

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

SİMGELER

W	: Ağırlık kaybı (%)
W_i	: İlk ağırlık
W_s	: Son ağırlık
μ	: Mikro
β	: Büyüme faktörü

KISALTMALAR

DCM	: Deselülerize Matris
ECM	: Hücre Dışı Matris
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
HA	: Hiyalüronik Asit
HFIP	: 1,1,1,3,3,3- Hexafluoro-2-propanol
HSCA	: Kamforsülfonik Asit
PANI	: Polianilin
PBS	: Fosfat ile Tamponlanmış Tuz Çözeltisi
PCL	: Poli(ϵ -Kapolakton)
PDLA	: Poli(D-Laktik Asit)
PEDOT	: Poli (3,-etilendioksitiyofen)
PEG	: Polietilen Glikol
PEGDA	: Poli (etilen glikol diakrilat)
PLGA	: Poli(L-Laktik-ko-Glikolik Asit)
PLLA	: Poli(L-Laktik Asit)
PP	: Polipropilen
Ppy	: Polipirol
PT	: Politiyofen
SEM	:Taramalı Elektron Mikroskobu



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1. Kas çeşitlerinin karşılaştırmalı özellikleri	4
Çizelge 2.2. Hacimsel kas kaybı tipleri ve tedavi seçenekleri	7
Çizelge 2.3. Elektroëğirmeyi etkileyen proses parametreleri.....	9
Çizelge 2.4. 3B biyobasım yöntemlerinin malzeme seçimi, avantaj ve dezavantajları.....	14
Çizelge 2.5. İskelet kas doku yenilenmesinde kullanılan malzemelerin gruplandırılması.....	15
Çizelge 4.1. Hazırlanan membranlar ve 3B matrikslerin mekanik özellikleri (Ort±SS) (n=5)	26





ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kas çeşitlerinin gösterimi	3
Şekil 2.2. Doğal İskelet Kas Dokusu	5
Şekil 2.3. İskelet Kas Sisteminin Anatomik Yapısı.....	5
Şekil 2.4. Kasılma çeşitlerinin gösterimi	6
Şekil 2.5. Elektroğirme düzeneğinin şematik gösterimi: A) yatay, B) dikey elektroğirme düzeneği.....	9
Şekil 2.6. Taylor konisi oluşumu ve aşamaları.....	10
Şekil 2.7. 3B biyobasım tekniğinin aşamaları.....	12
Şekil 3.1. 3B yazıcı teknolojisi ile üretilmiş kalıpların içerisine yerleştirilen PCL/PANI nanofiber membranlar	20
Şekil 3.2. Mekanik test için hazırlanan kalıp	21
Şekil 3.3. Multimetre ile oluşturulan iletkenlik ölçüm düzeneği	22
Şekil 4.1. Nanofiber membranların SEM mikrogafikleri.	23
a. PCL 2000X, b. PCL/PANI 2000X, c.PCL 10000X, d. PCL/PANI 10000X.....	23
Şekil 4.2. Natural PLA filamentı ile 3B yazıcıda üretilen kalıp ve kelepçesi.....	23
Şekil 4.3. Liyofilizasyon sonrası PCL/PANI+DCM kalıptan çıkarılmış haldeki görüntüsü.....	24
Şekil 4.4. 3B kombine matriksin SEM görüntüsü. Dikey; a. 70X b.1200X c.2600X. Arayüzey görüntüleri; d.100X e.1500X. Kombine matriks bileşeni olarak liyofilize DCM görüntüsü; f.400X.....	24
Şekil 4.5. PCL/PANI ile hazırlanan filmlerin FTIR spekturumları.....	25
Şekil 4.6. PCL/PANI membranların ve PCL/PANI-DCM kombine matrikslerin in vitro ortamda fizyolojik koşullarda (PBS, pH=7.4 ve 37°C) degradasyonu.....	27



HACİMSEL KAS DOKU KAYIPLARININ TEDAVİSİNE ÖZGÜ 3 BOYUTLU KOMBİNE DOKU MATRİSLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

İskelet kasları, insan vücudunda hareket sisteminin çalışmasını sağlayan önemli bir bileşendir. Bu kaslar canlı vücudunun toplam kütesinin neredeyse yarısını oluşturmaktadır. Bu nedenle iskelet kaslarında meydana gelen bir hasar, günlük yaşamda hareket kısıtlarına ve yaşam kalitesinin düşmesine sebep olmaktadır. İncinme, burkulma veya spor kazaları sonucu oluşan basit hasarlar; dinlenme, fizik tedavi ve ilaç takviyeleri ile tedavi edilebilmektedir. Daha travmatik boyutta olan ve ateşli silah yaralanmaları, tümör cerrahisi veya iş kazaları neticesinde meydana gelen büyük kas kayıplarının iyileşme süreci ise zor, yavaş ve bazen sonuçsuz olmaktadır. Bu durumda kas dokusunun kendi kendini yenileme yeteneği yetersiz kalır. Bu tip kas hasarlarının giderilmesi için hücre temelli tedavi yöntemlerinin yanı sıra doğal veya sentetik greftlerin kullanıldığı birçok tedavi önerilmiştir. Buna karşın, sadece tek bir fonksiyonel bileşen içeren bu tip tedaviler karmaşık doku hasarını onarmak için yetersizdir.

Bu tez çalışmasında, iskelet kaslarındaki yaralanmalar sonucu oluşan büyük hacimli kas kayıplarının hızlı ve etkili tedavisi için elektroeğirilmiş polikaprolakton/polianilin (PCL/PANI) membranın liyofilize kas türevli hücresizleştirilmiş matris ile birleştirilmesi ile oluşturulmuş spiral formda 3 boyutlu (3B) matris geliştirilmiştir. PCL/PANI membranın kimyasal yapısını belirlemek amacıyla FTIR-ATR analizi yapılmıştır ve nanofiber membranların yüzeyinde her iki bileşenin varlığı doğrulanmıştır. Çift katmanlı yapının yüzey morfolojisinin ve ortalama fiber çaplarının belirlenmesinde elektron taramalı mikroskop (SEM) yüzey görüntüleri kullanılmıştır. Bu görüntülerde PCL/PANI karışımının entegrasyonunun sağlandığı spiral formun başarılı bir şekilde oluşturulduğu gözlemlenmiştir. Fizyolojik şartlarda gerçekleştirilen *in vitro* degradasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar, 90 günün sonunda 3B kombine matristeki ağırlık kaybının PCL/PANI nanofiber membranlardan daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Hazırlanan PCL/PANI nanofiber membranların elektriksel iletkenlikleri 3×10^{-9} - $2,5 \times 10^{-9}$ S/cm arasında ölçülmüştür. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, spiral şekilli kombine matrislerin hasarlı iskelet kası dokusunun yenilenmesi için uygun özelliklere sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği, İskelet kası, 3 Boyutlu doku matriksi



DEVELOPMENT OF 3D COMBINED TISSUE MATRIES SPECIFIC TO THE TREATMENT OF VOLUME MUSCLE TISSUE LOSSES

ABSTRACT

Skeletal muscles are one of the basic elements of the human movement system. These muscles are the basic elements of the main element of vitality. This is due to a development that occurs in basic life, changes in life in life. Simple incidents of injury, sprain or sports accident; Purification is supported by physics and drugs. The more traumatic and injured deaths, traumatic and injury accidents are difficult, slow and immortal in reducing muscle wastage greatly large. This muscle teaching has the ability to be self-sufficient. This tip is a valuable prospective teacher as well as student-based experience for the muscle awards contenders. In contrast, this type involving only a single user is insufficient to repair complex textures.

These technologies include FTIR-A drawing of 3 (3D) PCL/membrane in a chemical TR model of the membrane combined with lyophilized muscle-derived cell-free matrix of large size polycaprolactone/polyaniline (PCL/PANI) membrane for fast and efficient production of large muscle wasters and the structure of both components of the nanofiber membranes was confirmed. It was used to determine the double mean surface morphology and mean fiber diameters. In this image, it is observed that the PCL/PANI interview is effectively created for their interview. Results from *in vitro degradation studies from* physiological conditions , from approaches that appear to have a higher weight in the 90-day final 3D bonded matrix than in PCL/PANI nanofiber membranes. The electrical conductivity of the prepared PCL/PANI nanofiber membranes was measured between 3×10^{-9} - 2.5×10^{-9} S/cm. The results obtained from the structured are that the spirally made matrices are made of material suitable for the new skeletal muscle of each.

Keywords: Tissue engineering, Skeletal muscle, 3D tissue m

1. GİRİŞ

İskelet kasları, insan vücudunun toplam kütlesinin %40-50'sini oluşturmakta ve insan vücudundaki en büyük kas dokusunu temsil etmektedir. İskelet kaslarının en önemli özelliği kas grupları ile birlikte çalışarak canlı vücudunun hareketini sağlamasıdır [1]. Bunun yanında, bulunduğu organ ve kemik yapılarını da korunmakta görev alır. Bu kaslar kasılma, gevşeme, şişme gibi aktif özelliklere sahiptir. Tümör cerrahisi, ateşli silah yaralanmaları, travmatik yaralanmalar veya yüz kaslarında doğuştan meydana gelen kas yoksunlukları gibi sebeplerle iskelet kaslarında kalıcı hasarlar meydana gelebilir. İskelet kas dokusu kendini yenileme özelliğine sahip olsa da doku hücrelerinin doğal biyolojik çevresinde hasar meydana gelmişse dokunun kendine yenileme kapasitesi azalmaktadır [2]. Bunun sonucu uzun vadede ortaya çıkan hacimsel kas yoksunları, işlevsel eksikliklere neden olarak sadece hasarlı kas dokuyu değil komşu kaslar ile alt tabakada bulunan kas-iskelet sistemine de zarar verir [3]. Zararı en aza indirmek için amputasyon seçeneği düşünülebilmektedir. Diğer bir seçenek ise kas kaybının giderilmesi ve onarımın sağlanması amacıyla kas yaması kullanılasıdır. Sağlıklı kas dokusunun otogreft olarak kullanımı temeline dayanan bu yöntemde, otogreftin alındığı bölgedeki kas grubunda kayıp meydana gelmekte ve cerrahi işlemler sebebiyle vücut bütünlüğü tehlikeye girebilmektedir [4]. Bu nedenle, kas doku yenilenmesi için yeni yaklaşımların arayışına girilmiştir.

Hacimsel kas kayıplarının tedavisi amacıyla doku mühendisliği alanında çeşitli çalışmalar devam etmektedir. Doku mühendisliği, laboratuvar ortamında doğal dokuyu biyomalzemeler, hücreler, indüktif ajanlarla taklit edip üç boyutlu doku veya organ oluşturmayı amaçlayan disiplinler arası bir alandır. Doku mühendisliği yöntemleri ciddi hasarın ardından iskelet kası dokusu ile kas liflerinin yenilenmesi için umut olmuştur. Kas doku rejenerasyonları için tercih edilen malzemeler sentetik veya doğal polimerden seçilebilmektedir. Tek başlarına kullanımlarının yanı sıra bir arada kullanımları da mümkün ve çeşitli avantajlara sahiptir. Kas doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak poli-L-laktat (PLLA), poli(laktat-ko-glikolat) (PLGA) ve poli(ε-kaprolakton) (PCL) en fazla tercih edilen biyobozunur sentetik polimerlerdir [5]. PCL, FDA onaylı olup biyobozunurluk, biyoyumluluk, mekanik ve ısıl kararlılık gibi avantajlı özelliklere sahiptir. Ayrıca oluşturulan doku iskelelerinin yapısında elektriksel iletkenliği sağlayacak, kas hücrelerinin elektriksel iletkenlik sayesinde

doku oluşturma yeteneklerini hızlandıracak polimerler de kullanılır [6]. Bunların en bilinenleri polipirol (PPy), politiyofen (PT), polianilin (PANI) ve poli(3,4-etilendioksityifen) (PEDOT)'dur [7]. İskelet kas doku mühendisliği açısından oluşturulan matriksin elektriksel özellikler taşıması hücre farklılaşması ve rejenere kas dokunun hızlı oluşumu açısından önemlidir. Doku mühendisliğinde hücre temelli yaklaşımlarda polimerik matriksin destek özelliğinin yanı sıra implante edildiği bölgeye entegre olabilmesi ve komşu dokulardaki hücrelerin hasarlı bölgeye göç etmesini sağlayarak doku oluşumunu hızlandırması da gereklidir. Deselülerize matris olarak (DCM) adlandırılan taşıyıcı yapılar da biyoaktif karakterler olup yapılarında bulunan protein ve stokinler yardımıyla hücre farklılaşmasını desteklemektedirler. Uzun ve fazla sayıda miyotüp oluşturabildikleri için hasarlı bölgenin iyileşmesinde aktif rol almaktadır.

1.1.Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, hacimsel kas doku yoksunluklarının tedavisi amacıyla 3 boyutlu biyoaktif kombine doku matrikslerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Elektroēirme yönteminden yararlanılarak biyobozunur PCL ve iletken özellikteki PANI polimerlerinden nanofiber membran eldesi ile bu membranların kas hücreleri için doğal mikro-çevre oluşturan DCM ile birleştirilmesi sonucu elde edilen spiral formdaki nihai iskelenin, doku mühendisliğinde kazandırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kas Sistemi

Kas, üzerinde bulunduğu organ ve kemik yapıların korunması ve hareketinden sorumlu ve kasılma, gevşeme, şişme gibi özelliklere sahip aktif organlara denilmektedir. Canlı vücudu üzerinde hareket sisteminin başarılı bir şekilde işlemlerini sağlayan yapı, kas ve kas gruplarından oluşmaktadır [8]. Bu kaslar fonksiyonel çiftler halinde hareket edebilirler yani birkaç kas grubu yapılan harekete de bağlı olarak aynı yönde birlikte hareket edebilmektedir. Böylece iki veya daha fazla kasın aynı anda kasılması sağlanmış olur [9]. Duruşun ve şeklin korunması sırasında tek kastan çok kas grupları aktif olarak görev alırlar ve bu kas grupları sarsılmaları ve darbeleri belirli bir noktaya kadar sönümleyebilme özelliğine sahiptirler.

Tüm kas yapılarının ortak işlevleri uyarılabilirlik, iletebilme, kasılma, elastiklik ve viskozitedir. Şekilleri ise bulundukları konum ve göreve göre değişkenlik göstermektedir. Buna karşın renkleri, canlı vücudu için kan akışı ile ilişkili olarak kırmızı ve kahverengi olarak genellenabilmektedir. Kalp, dolaşım, solunum, sindirim sistemleri, göz ve genital bölgelerde de bulunarak önemli fonksiyonları gerçekleştirmektedirler. Kaslar yapı olarak 3 şekilde birbirinden ayrılmaktadır. Bunlar düz kaslar, iskelet kasları (çizgili kas) ve kalp kasıdır.

Kalp kası, iskelet kasları ve düz kaslar bulundukları konum ve işlev bakımından farklılık göstermektedir. Düz kaslar genellikle mide, bağırsak gibi organların yapısında bulunurken iskelet kasları baş, boyun ve gövde gibi kısımlarda bulunmaktadır. Kalp kası çizgili bir kas olmasına karşın kendi uyarısını oluşturması ve istemsiz çalışması nedeniyle ayrı bir grup olarak değerlendirilir [10].



Şekil 2.1. Kas çeşitlerinin gösterimi [11]

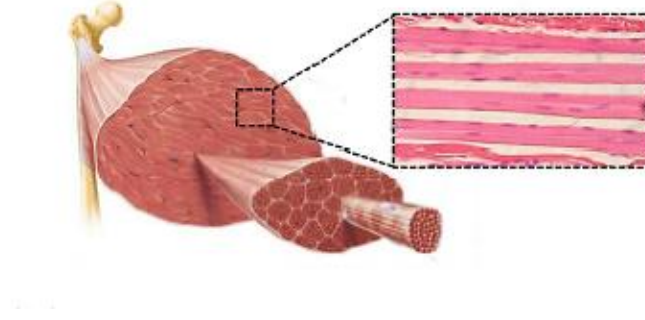
Çizelge 2.1. Kas çeşitlerinin karşılaştırmalı özellikleri [10]

Kas Tipi	Çeşidi	Çekirdek Sayısı	Çalışma Biçimi	Kasılmanın gerçekleştiği sistem	Kasılma hızı
İskelet Kası	Çizgili	Çok çekirdekli	İstemli çalışma	Somatik sinir sistemi	Yavaştan hızlıya doğru
Kalp Kası	Çizgili	Tek çekirdekli	İstemsiz çalışma	Otonom sinir sistemi ve hormon	Yavaş
Düz Kas	Çizgisiz	Tek çekirdekli	İstemsiz çalışma	Otonom sinir sistemi ve hormon	Çok yavaş

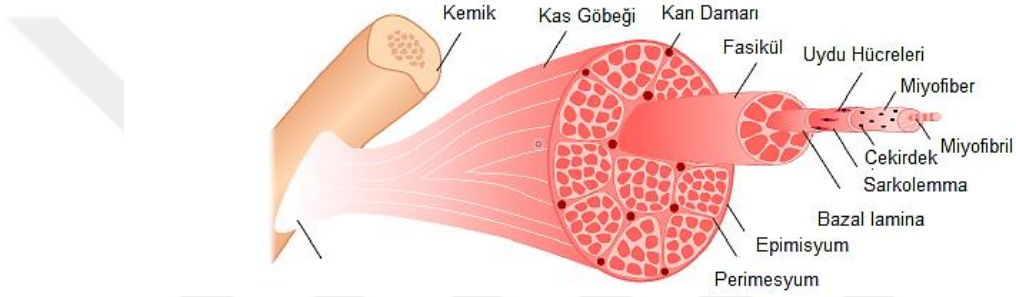
2.2. İskelet Kasları

İskelet kasları canlı vücudunun yaklaşık olarak %40'ını kapsayan, iskelet sistemine bağlı somatik motor nöronların uyarılması ile kasılan farklı kas liflerinden oluşan yapıdır [12]. İskelet kaslarının içerisinde bulunduğu sistem; bağ doku, kas hücreleri, sinir lifleri ve kan damarlarından meydana gelmektedir [13]. İskelet kas lifleri diğerlerinden farklı olarak çok çekirdekli, yapı olarak bol sinirli ve damarlıdır, demetler halinde bulunup bir kılıfla sarılmış şekildedir. Bu kasların temel görevi hareketin sağlanması ve kontrol edilmesidir. Kasılması ile birlikte koşma, yüzme, konuşma ya da nefes alıp verme gibi aktiviteler gerçekleşir. Aynı zamanda, kasılma esnasında kemikler birbirine yaklaştığı ya da uzaklaştığından vücut hareketi sağlanmış olur. Kasılma sonunda kaslar eski haline döner. Bütün bu süreç beyin ve omurilikte yer alan sinirlerden alınan uyarılar sayesinde gerçekleşmektedir.

Çizgili kaslar (iskelet kasları), endomisyum adı verilen çok sayıda kas lifinden oluşan ve her bir kas lifini saran gevşek bir bağ dokusuna sahiptir. Grup halindeki kas lifleri fasikül denilen yapı oluşturur. Fasikülleri saran bağ dokusuna ise perimisyum adı verilmektedir [12, 14]. Bu mükemmel yapıdaki içsel mekanizma sayesinde iskelet kasları vücudu dış etkilerken korurken, bir yaralanma karşısında güçlü bir yenilenme kapasitesine sahiptir. Eğer şiddetli bir travmaya maruz kalmadıysa ve kas dokunun doğal çevresinde tamamen bir bozulma yoksa iskelet kas doku kendisini yenileyebilmektedir [15].

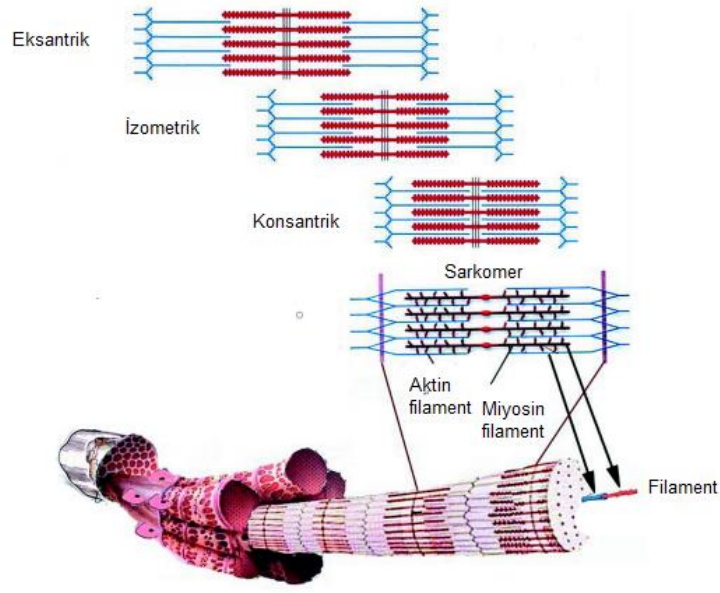


Şekil 2.2. Doğal İskelet Kas Dokusu [16]



Şekil 2.3. İskelet Kas Sisteminin Anatomik Yapısı [17]

İskelet kasları mikroskop altında incelendiğinde kas lifi boyunca açık ve koyu çizgilenmiş bantlar dikkat çekmektedir. Açık bantlar I (izotrop), koyular ise A bandı (anizotrop) olarak isimlendirilirler. I bantlarının açık renkli olma sebebi ince filamentleri barındırmasıdır, ışığı bir defa kırarlar bu bölgede sadece aktin filamentleri bulunur. A bandının koyu renkli çizgilenmelere sahip olmasının sebebi ise hem kalın hem ince filamentleri içermesidir. Işığı iki defa kırar ve bu bölgede aktin ve miyozin filamentleri birlikte bulunur [18]. A bandının açık renkli kısmı ise H bandı olarak isimlendirilir ve ışığı nispeten daha fazla kıran kısımdır. H bandını tam ortadan kesen çizgilenme M çizgisini oluşturur. M çizgisi proteinlerden oluşmuş olup, sarkomerin yapısını belirlemekle görevlidir. Ayrıca I bandının ortasında Z çizgisi bulunur ve sarkolemmaya yapışarak tüm yapının stabilitesini sağlar [12, 19].



Şekil 2.4. Kasılma çeşitlerinin gösterimi [12, 18]

2.2.1. İskelet kaslarında hacimsel kayıplar

İskelet kasları kendini yenileyebilme özelliğine sahip kas gruplarından oluşsa da rejenerasyonda sınırlar vardır. Bu sınırlardan birini hacimsel kayıplar (Volumetrik Muscle Loss, VML) oluşturmaktadır. VML, kişide doğuştan meydana gelebildiği gibi (örneğin; yarı dudaklı doğum vb.) sonradan da meydana gelmiş olabilir (örneğin; savaş yaralanmaları, tümör cerrahisi, iş kazaları vb.). Bu sınırlamaları ortadan kaldırmak, canlı yaşam kalitesini arttırmak veya tamamen estetik kaygıların önüne geçilebilmesi için klinik çalışmalar devam etmektedir.

İskelet kas doku yenilenmesi için literatürde geçen klinik çalışmalarda kas grefti ve kas flebi transferi gibi yöntemler mevcuttur. Ancak bu yöntemler donör kısıtlılığı, verici bölgede oluşan hasar vb. dezavantajlar sebebi ile doku yenilenmesinde sorun oluşturabilmektedir. Bu durum, kas doku rejenerasyonları için yeni arayışların başlamasına neden olmuştur [20]. Günümüzde, iskelet kas doku rejenerasyonları için biyomalzemeler, hücreleştirilmiş dokular, nanolifler, iletken matrisler kullanımı ve bunların hücreler ile etkileşimleri fiziksel, kimyasal ve mekanik davranışları incelenmesi konusunda birçok çalışma mevcuttur [21]. Literatürde VML ile ilgili yapılan bir çalışmada hacimsel kas kayıpları ve tedavi seçenekleri incelenmiştir

(Çizelge 2.2). Çalışmada VML, diz altı ve üzerinde kısmi bölge kaybı ve hasarlı bölgede toplam kayıp olarak iki kategoriye ayrılmıştır [22].

Çizelge 2.2. Hacimsel kas kaybı tipleri ve tedavi seçenekleri [22]

Kayıp tipi	Tedavi Seçeneği
Diz altında kısmi kayıp	Destek, Rejeneratif Tıp ⁱ
Diz üstünde kısmi kayıp	Kuvvetli Destek, Rejeneratif
Diz altında toplam kayıp	Destek
Diz üstü toplam kayıp ⁱⁱ	Kuvvetli Destek ⁱ

ⁱ Gelecekteki olası tedavi seçeneği

ⁱⁱ Bu çalışma için daha önce tanımlanmış vaka yok

2.3. İskelet Kas Dokusu Üretimi

Çizgili kas doku özdeşlerini üretmek için doku mühendisliğinin temel bileşenleri olan hücre, doku iskelesi ve biyomoleküllere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda hücre tipi olarak, oluşan hasarlarda kas hücrelerine dönüşerek dokuyu tamir edebilme özelliğine sahip, laboratuvar ortamında çok miktarda çoğaltılabilen ve kas hücrelerine dönüşme potansiyeli yüksek olan kas öncül hücreleri (miyoblastlar) kas doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır. *In vitro* ortamda hazırlanan doku iskelelerinin performansını etkileyen çeşitli parametreler mevcuttur. Kullanılan malzemenin kimyasal yapısı, fiziksel, mekanik ve termal özellikleri ve daha da önemlisi yüzey kimyası doku iskelesi için malzeme seçiminde dikkat edilmesi gereken unsurların başında gelir [23].

Kas doku iskeleleri için bir diğer önemli özellik ise biyobozunurluktur. Doku iskelesi, yeni doku oluşum hızı ile ters orantılı olacak şekilde bir bozunma hızı göstermelidir. Malzemenin kendisinin yanı sıra bozunma ürünlerinin de toksik özellik göstermemesi gereklidir. Biyoyumlu malzemeler olarak metal, seramik, polimerler ya da bunların bir veya birkaçının birleşiminden oluşturulan kompozitler tercih edilebilir. Ancak biyobozunurluk özellikleri incelendiğinde metal ve seramik malzemelerin kullanımı daha kısıtlıdır. İskelet kas doku iskelesi için işlenme kolaylığı, biyobozunurluk ve biyoyumluluk açısından biyobozunur polimerler tercih edilmektedir [23, 24]. Kullanılan polimerler *in vivo* ortam şartlarına göre ve uygulama yapılacak bölgeye göre değişiklik gösterebilmektedir.

Hücre dışı matriks (ECM)'in hücreleştirilmesi ile elde edilen hücreleştirilmiş matriksler (DCM), tek başına veya diğer malzemeler ile kompozit şeklinde doku iskelesi üretiminde kullanılmaktadır. ECM'in temel görevi hücrelere fiziksel destek sağlamaktır, kan hücreleri istisna olmak üzere neredeyse tüm hücreler ECM' e ihtiyaç duyarak büyüme gerçekleştirirler. ECM varlığı ile birlikte hücre morfolojisi, farklılaşması, göçü gibi fonksiyonlar gerçekleşebilmektedir [25]. DCM, memelilerin mesene, ince bağırsak, kan damarları, kemik ya da dermis vb. kısımların hücreleştirilmesi ile elde edilebilmektedir [26].

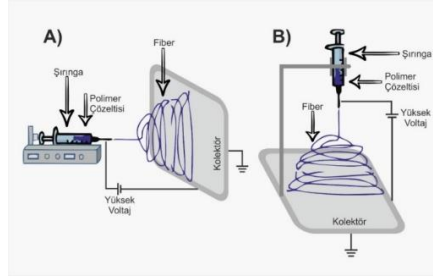
2.4. Kas Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Çeşitli sebeplere bağlı olarak meydana gelen kas doku yaralanmaları yılda yaklaşık 4,5 milyon rekonstrüktif ameliyatla sonuçlanmaktadır [14]. Bu durum, kas doku rejenerasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmasının başlıca sebebidir. Kas doku iskelesi üretim yöntemleri, doku iskelesinde tercih edilecek özelliklere göre belirlenmektedir. İleri rejenerasyon yöntemlerinden biri olan doku mühendisliği yaklaşımında, kullanılacak doku iskelesinin üretimi için istenen gözenek boyutu, kullanılacak malzemenin özellikleri ile yüzey özellikleri, 3B yapının nihai özellikleri belirlendikten sonra uygun üretim tekniği seçilmelidir. Örneğin; 3B biyobasım tekniği ile elektroğirme yönteminde numune hazırlama kolaylığı, mikro gözenekli yapı oluşturabilme, geniş malzeme seçimi gibi avantajlar mevcuttur [27]. Enjekte edilebilir hidrojeller ile kas doku iskeleleri oluşturulduğunda ise daha kısa süreli sonuçlar alınabilmektedir. Çeşitli avantaj ve dezavantajlar kas doku iskelesi üretim tekniği seçilirken göz önünde bulundurulmaktadır.

2.4.1. Elektroğirme Yöntemi

Elektroğirme yöntemi, elektrik alan etkisi ile mikro ya da nano düzeyde ve uygulama alanına göre yönlenmiş ya da yönlenmemiş fiberlerin elde edildiği bir lif çekim yöntemidir. Elektroğirme düzeneğinin kurulabilmesi için bir güç kaynağı, polimer çözeltisi, enjektör, enjektör ucu ve toplayıcıya ihtiyaç vardır (Şekil 2.5) [28]. Uygun koşullar altında, polimer çözeltisi iğne içinden itilirken, elektrostatik kuvvetler iğnedeki yüzey gerilimini yenerek Taylor konisi adı verilen ve ucundan ince bir jetin çıktığı konik (veya neredeyse konik) bir yapı oluşur. Uçtaki jet zemine veya negatif

yüklü toplayıcıya doğru hareket ettikçe, çözücünün buharlaşmasına ve polimer liflerinin ayrı katmanlarda toplanmasına izin veren bir hareket meydana gelir [29].



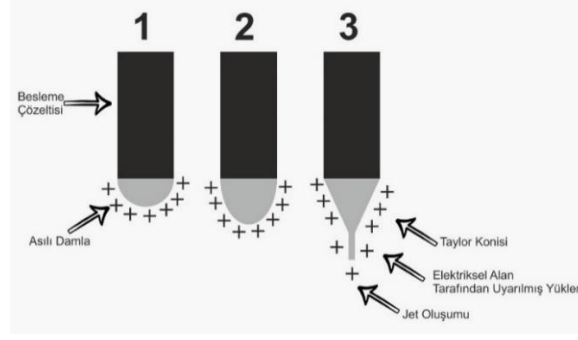
Şekil 2.5. Elektroëğirme düzeneğinin şematik gösterimi: A) yatay, B) dikey elektroëğirme düzeneği

Elektroëğirme yöntemini etkileyen parametreler çözelti kaynaklı, işlem kaynaklı ve ortam kaynaklı parametreler olarak sınıflandırılır (Çizelge 2.3). Parametrelerdeki değişim ile lif oluşumu ve/veya lif morfolojisinde değişimler meydana gelir.

Çizelge 2.3. Elektroëğirmeyi etkileyen proses parametreleri [30]

Çözelti	İşlem	Ortam
• Viskozite • Molekül ağırlığı • Konsantrasyon • Yüzey gerilimi • Çözelti iletkenliği	• Voltaj • Akış hız • Toplayıcı plaka • İğne ucu-toplayıcı mesafesi	• Nem • Sıcaklık

- Akış hızı: Akış hızının artırılması sonucu boncuk oluşumu ve fiber çaplarında kalınlaşma meydana gelebilir. Gerekli olan akış hızından düşük hız kullanılması sonucu polimer jet oluşumunda kesintiler ortaya çıkar ve fiber oluşumunda süreklilik yitirilmiştir olur [29] .
- Voltaj: Voltaj ile fiber oluşumu arasında önemli bir bağlantı vardır ve direkt olarak fiber morfolojisini etkilemektedir [31, 32]. Uygulan voltaj ile birlikte başlangıçta yani düşük voltajlarda çözelti damlacık halinde kendisini gösterir. Voltajın artırılması ile birlikte oluşan Taylor konisi gittikçe küçülerek konik şeklini kaybeder böylece fiber oluşumu sağlanmış olur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Taylor konisi oluşumu ve aşamaları

- **Toplayıcı Plaka:** Plaka seçimi istenilen nihai özelliklere göre belirlenmektedir. Plaka çeşitleri; döner silindir, düz plaka, halka, paralel çubuklar vb. şeklindedir. Seçilen plakaya göre fiberlerin yönlenme durumlarında değişiklik gözlenir. Örneğin; düz plaka kullanımında yönlenmemiş fiberler elde edilirken, döner silindir ile yönlenmiş fiberler elde etmek mümkündür. Aynı zamanda toplayıcı plakanın hangi malzemeden yapıldığı da önemlidir. Pirinç, bakır, alüminyum toplayıcılar ile yapılan çalışmalar sonucunda kullanılan toplayıcı malzemesinin lif çapı, lif dizilimleri, lifler arası boşluk gibi lif morfolojisi üzerine etkisi olduğu görülmüştür [33].
- **İğne ucu ve toplayıcı arası mesafe:** İstenilen fiber morfolojisine ulaşmak için en uygun mesafe belirlenmelidir. Optimum mesafeden daha kısa mesafelerde fiberler toplayıcıya ulaşırken kurumak için yeterli zamanı bulamadıklarından boncuklu bir yapı gözlenir. Tam tersi olarak mesafe olması gerekenden fazla olduğunda ise, daha ince fiberler elde edilir.
- **Bağıl nem:** Ortam koşulları sınıflandırmasına giren bağıl nemde artış olması durumunda fiberlerin yüzeyinde gözenekler oluşması ve fiber çaplarında artış söz konusu olabilir. Nem artışı ile birlikte fiber üzerindeki gerilmede azalma olur ve böylece yapıda bulunan gerilme azalır fiber çapında değişim yaşanır.
- **Sıcaklık:** Elektroegirme yönteminde kullanılan polimer çözeltisi ile bağlantılı bir parametredir. Sıcaklıktan etkilenen polimer çözeltileri, enzimler ya da proteinlerin varlığında çözeltide bozunmalar olacağından fiber oluşumu gözlenmeyebilir. Bu nedenle ortam koşulları üretim esnasında sürekli kontrol edilmelidir.

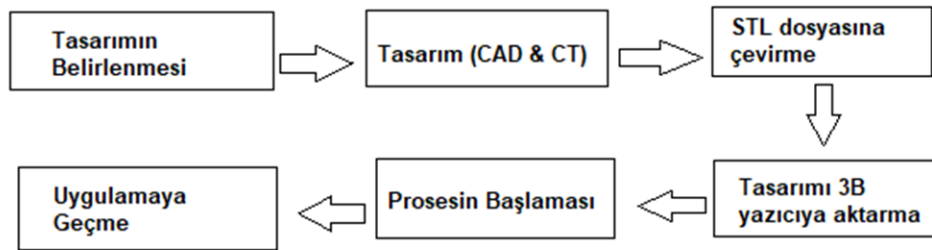
- Polimerin moleköl ağırlığı: Kullanılan polimerin moleköl ağırlığının yüksek olması çözelti viskozitesini etkiler. Molekül ağırlığı arttıkça polimer zincir etkileşimin artar ve polimer zincirinde dolaşıklıklar meydana gelir. Bu da zincir hareketini sınırladığından çözelti viskozitesinde artış gözlenir. Olması gereken moleköl ağırlığının çok altındaki değerlerde ise fiber gözlenmeyebilir [30]. Bu nedenle polimerin moleköl ağırlığı elektroegirme yönteminde önemli rol oynamaktadır.
- Çözelti konsantrasyonu: Optimumdan daha yüksek çözelti konsantrasyonlarında, sıvı polimer çözeltisinin enjektör içerisinde çıkması zorlaşır ve toplayıcıda fiber oluşumu gözlenmez. Bunun sebebi artan çözelti konsantrasyonu ile viskozitede yaşanan değişimdir. Düşük konsantrasyonlarda ise çözücünün uçması için yeterli süre olmayacağından fiberler üzerinde boncuksu yapılar gözlenir [30]. Sonuç olarak, çözelti konsantrasyonu ile fiber oluşumu ve oluşan fiberlerin çaplarında değişimler meydana gelir [34].
- Yüzey gerilimi: Yüzey gerilimi ile birlikte yüzey alanı da düştüğünden boncuk oluşumu gözlenebilir. Bu sorunun önüne yüzey gerilimini düşüren yüzey aktif madde kullanılarak geçilebilmektedir [35].
- ✓ Çözelti iletkenliği: Elde edilen liflerin çaplarında büyüme ya da küçülme olmasına sebep olmaktadır. Çözelti iletkenliği fazla
- ✓ Yüksek verim elde edilebilmesi
- olan polimer çözeltilerinde liflerde incelme meydana gelmektedir [29]. İletkenliği olması gerekenden az olan çözeltilerde ise boncuk oluşumu söz konusudur.

2.4.1.1. Elektroegirme yöntemi avantajları

- ✓ Sistem parametrelerinin deneme yanılma yöntemi ile optimize edilebilmesi
- ✓ Fiber yönlendirilmesinin kontrolünün sağlanabilmesi
- ✓ Birden fazla malzeme ile birlikte çalışma imkânı
- ✓ Biyomalzemeler açısından geniş çalışma alanı
- ✓ Gözenekli yapının elde edilebilmesi

2.4.2. 3B biyobasım tekniği

Üç boyutlu biyobasım tekniği, biyomalzemelerin canlı hücreler varlığında katmanlar halinde istiflenmesi ile doku analogları üreten eklemeli bir üretim teknolojisidir [27]. Bu teknikte seramik, doğal ya da sentetik polimerler malzeme olarak kullanılabilir. Doku mühendisliğinde hücrelerin canlılığını koruması, oksijen ve besin alışverişı yapması için gözenekli yapılara ihtiyaç vardır [36]. Bu nedenle 3B biyobasım teknolojisi, doku iskeleleri ve organlarda kullanılmak üzere 3B yapı üretmek için en uygun yöntemlerden biridir. 3B biyobasım tekniği ile gözenek hacmi, gözenek boyutu dağılımı ve yapı iskelelerinin gözenekler arası bağlantılarını kontrol edilebilmektedir. Doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen üç boyutlu biyobasım tekniğinde doku iskeleleri için kullanılacak malzemenin yanı sıra yapılacak olan tasarım da önemlidir. Tasarım, doku iskelesinde istenen özelliklere göre şekillenir ve buna göre 3B biyobasım tekniklerinden hangi yöntemin kullanılacağına karar verilir.



Şekil 2.7. 3B biyobasım tekniğinin aşamaları [37]

2.4.2.1. 3B biyobasım çeşitleri

Doku mühendisliği çalışmalarında avantajlarından dolayı tercih edilen bu basım tekniğinin yaygın olarak kullanılan 5 temel yöntemi vardır. Bunlar; stereolitografi aparatı (SLA, stereolithography apparatus), dijital ışık prosesi (DLP, Digital Light Processing), seçici lazer sinterleme (SLS, Selective Laser Sintering), erimiş filament üretim (FFF, Fused Filament Fabrication) ve mürekkep püskürtmeli yazıcı (inkjet)'dir. Bu yöntemler kullanılan malzeme ve baskıdaki farklılıklar olarak birbirinden ayrılmaktadır [36].

- SLA; Bu baskı tekniği vat fotopolimerizasyon (fıçı/tekne fotopolimerizasyonu) ile 3 boyutlu yapıları katmanlar şeklinde oluşturmaya dayalıdır. Bu yöntemin en önemli özelliği üretim esnasında UV ışığı kullanılmasıdır. Çalışma prensibi bakımından tipik bir mürekkep püskürtmeli yazıcıya benzer. Besleme ünitesine beslenen malzeme bir nozül vasıtası ile katmanlı üretime başlar ve ardından UV ışığı ile kürlleme işlemi gerçekleştirilir [36].
- DLP; SLA tekniği ile benzer olarak vat fotopolimerizasyon kullanılır. DLP yönteminden farkı ise ark lambası ya da sıvı kristal panel kullanmasıdır.
- SLS; 3B yapının oluşması için lazer kaynağının kullanıldığı bir yöntemdir. Toz sinterleme ile doku iskelesini oluşturma mantığına dayanır. Biyomalzemelerle geniş bir kullanım alanı sağladığından doku mühendisliğinde bu yöntem ile yapılmış çalışmalar mevcuttur [38]. Metal, seramik, polimer gibi malzemelerle işlem gerçekleştirilebilmektedir.
- FFF; Bu yöntemde termoplastik malzemeler kullanılabilmektedir ve malzemenin sıcaklık ile eritilip nozül vasıtası ile katmanlı olarak işlenmesi prensibine dayanmaktadır. Basılan doku iskelesinin x, y, z koordinatları ve diğer özellikleri yazıcı ile koordineli bir bilgisayar vasıtası ile kontrol edilebilir. Yöntemde sadece termoplastik malzemelerin kullanılabilmesi bir dezavantaj oluştursa da çözücü içermemesi doku iskelesi üretimde avantaj olarak değerlendirilir [36].
- Inkjet 3B basım; Bu yöntemde 3B modelleme vasıtasıyla prototipleme ve katmanlı imalat gerçekleştirilmektedir. Inkjet yazıcıda biyo-mürekkep kullanılmaktadır. Bu sebeple doku mühendisliğinde en yaygın tercih edilen basım-yazıcı türüdür. Öte yandan biyo-mürekkep seçimi bu yöntem için çok önemlidir. Seçilen biyo-mürekkep biyouyumlu, mekanik olarak uygun özellikte, doku büyümesinin hızıyla eşleşebilecek bir bozunma hızına sahip bir yapıda olmalıdır. Bu yöntemin hastalara özel üretim sağlayabilmesi avantajına karşın mekanik özelliklerde zayıflıklar sergilemesi dezavantajları arasındadır [36, 39].

Yukarıda söz edilen yöntemlerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.4’te tablo halinde sunulmuştur.

Çizelge 2.4. 3B biyobasım yöntemlerinin malzeme seçimi, avantaj ve dezavantajları

Metot	Avantaj	Dezavantaj	Kullanılabilen Malzeme
SLA,DLP	Kolay üretim tekniği	Pahalı ekipman	PEG, PCL, PEGDA
FFF	İyi mekanik özellikler	Sınırlı malzeme seçimi	PCL, PLGA
SLS	Geniş biyomalzeme seçimi	Yüzey sertliği	PCL/HA,PCL,Titanyum
Inkjet	Hücre ve hidrojel baskılama	Düşük mekanik özellikler	Kollojen/PDL,Fibrin, Jelatin

2.4.2.2. 3B biyobasım tekniği avantajları

- ✓ Doku mühendisliği için geniş biyomalzeme seçimi
- ✓ Gözenekli yapının ve kontrolünün bu teknik ile sağlanabilmesi
- ✓ Elde edilen baskı yapısının yumuşak olması
- ✓ Tasarımın özelleştirilebilmesi
- ✓ Klinik olarak kullanılabilirlik

2.4.3. Kas hasarlarının onarımında enjekte edilebilir sistemler

İskelet kas doku yenilenmesi için çalışılan stratejilerden biri de enjekte edilebilir sistemlerdir. Bu sistemlerin çoğu fizyolojik sıcaklıklarda jelleşen, hücrelerin/biyomalzemelerin bir şırınga yoluyla hasarlı bölge çevresinde birikmesine izin veren, ısıya duyarlı bir hidrojel sistemlerine dayanır [40]. Hasarlı ya da büyük hacimde kayba uğramış kas dokusunun yenilenmesi için geliştirilen örnek bir çalışmada miyoblastları belirlenen bölgeye transfer edilmesi amaçlanmıştır. Yeni kas dokusunun oluşumunu hızlandıracak bu yöntemde, fibrinojen ve trombin içeren iki yönlü bir şırınga (Duploject) kullanılarak enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon sonrası oluşan fibrin jeller bir iskele görevi görerek kas hücrelerinin büyümesi için gerekli ortamı oluşturmuş ve kas hücrelerinin yardımıyla hasarlı bölgede iyileşme gözlemlenmiştir [41].

2.4.3.1. Enjekte edilebilir kas onarım sisteminin avantajları:

- ✓ Minimal zararlı doku oluşumu (implantasyon sonrası patolojik reaksiyonlar)
- ✓ İşlemin nispeten hızlı olması (hasarlı bölgenin dolma süresi)
- ✓ Hasta iyileşme süresinin kısa olması

2.5 Kas Doku Mühendisliğinde Kullanılan Malzemeler

Kas doku yenilenmesini sağlamak amacıyla doku kaybının bulunduğu bölgeye en iyi şekilde iyileşme sağlayacak malzemeler seçilir, bunun için kas doku yenilenmelerinde farklı malzemelerden yararlanılır [42]. Polimerler diğer malzemelere göre biyolojik olarak bozunabilme, mekanik özellikler, istenilen gözeneklilikte üretilme kolaylığı gibi önemli avantajlar sergilediğinden doku mühendisliğinde diğer malzemelere göre daha çok tercih edilmektedir [43]. 3B iskele yapısını oluşturmak için polimerler belirli kriterlere göre seçilmektedir. Biyobozunur ve biyouyumlu olmak, hücreler için uygun ortamı sağlanabilme, mekanik olarak beklentiyi karşılayabilme, işlenme kolaylığı hatta malzemenin ucuz ya da pahalı olması gibi özelliklere göre polimerik malzeme seçimi yapılır. İskelet kas doku yenilenmesi için kullanılan malzemelerin sınıflandırılması Çizelge 2.5'deki gibidir.

Çizelge 2.5. İskelet kas doku yenilenmesinde kullanılan malzemelerin gruplandırılması [42, 44]

Doğal Malzemeler	ECM kaynaklı, Polisakkaritler, Proteinler, Poliesterler, Diğer polimerler
Kompozit Malzemeler	PCL/Kollajen, PLGA/HA, PVP/PLA, PLGA/Jelatin
Sentetik Malzemeler	Poliamidler, Poliesterler, Polivinilalkol, Polianhidritler

2.5.1. Doğal malzemeler

ECM, dokular ve organlar için yapısal destek, şekil ve güç sağlayan ve başlıca bileşenleri kolajen ve glukozamino glikanlar olan bir yapıdır. Yapısal ve mekanik özelliklerinin yanı sıra, hücre davranışını etkileyen sinyaller ve moleküller için bir bilgi yolu olduğu artık yaygın olarak kabul edilmektedir [45], [46]. İskelet kası rekonstrüksiyonunu/rejenerasyonunu desteklemek için çeşitli türlerden, çeşitli doku ve organlardan izole edilen ECM'ler iki boyutlu levhalar, basit boru şeklinde içi dolu/boş yapılar, üç boyutlu organ formunda veya hidrojel olarak genişletilmiş klinik uygulamalar için önerilmiştir.

ECM temelli doku iskeleleri tipik olarak memeli doku ve organlarının hücreleştirilmesiyle elde edilir. İnce bağırsak, dermis, idrar kesesi, perikard ve kalp kapaklarının ECM'si, yumuşak doku onarımı için FDA onaylı doku iskelesi örnekleridir [47]. ECM'in çeşitli yöntemler ile hücreleştirilmesi ile elde edilen DCM ise kolajen molekülleri (diğerlerinin yanı sıra tip I, III, IV, V, VI, VII), laminin, fibronektin ve heparin, heparan sülfat, kondroitin sülfat ve hyaluronik asit dahil glikozaminoglikanlar (GAG'ler) ve çeşitli büyüme faktörleri (örneğin, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF β) içeren bir yapıdır [48],[49]. ECM dışında kullanılan doğal malzemeler; elde edilen kaynağa göre bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklı veya yapılarına göre polisakkaritler ve proteinler olarak sınıflandırılırlar [50]. Bunlar memelilerin ECM'den saflaştırılan kolajenler, fibronektin, fibrin, laminin, hyaluronik asit ve kondroitin sülfat olabileceği gibi kabuklulardan elde edilen kitin ve kitosan, ipekböceği kozalarından elde edilen fibroin, algler ve deniz yosunlarından elde edilen aljinat ve agaroz olabilir. Doğal malzemelerin avantajı doğal dokuda ya da çok benzeri yapıda olmalarıdır. Bu nedenle hücre büyüme ve farklılaşmasını sentetik malzemelere göre çok daha fazla destekleme yeteneğine sahiptirler. Ancak, elde edildiği kaynaklardan (sığıır, domuz, vb.) insana hastalık geçme riski söz konusudur. Ayrıca, sterilizasyonlarındaki zorluklar, mekanik dayanımlarının düşük olması ve yüksek sıcaklıklarda yapısal bozunmalar olabilmesi gibi dezavantajları mevcuttur. Oluşturulacak doku iskelesinde avantajlarından dolayı doğal polimer tercih edilirse ve mekanik özelliğindeki dezavantajın önüne geçilmek

istenirse bu durumda da uygun bir çapraz bağlayıcı kullanılarak mekanik problemlerin önüne geçilmeye çalışılır [51].

2.5.2. Sentetik malzemeler

Sentetik temelli polimerler; ilaç salınım sistemleri, kas, kemik, kırık doku mühendisliği ve implantlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Doku iskelesi oluşturmak üzere poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA), poli(ε-kaprolakton) (PCL), polipropilen (PP) ve bunların kopolimerlerinin kullanımı oldukça yaygındır. Bu malzemelerin tercih edilme sebepleri mekanik, fiziksel ve kimyasal bakımdan doğal malzemelere göre avantaj sağlamalarıdır [42]. Ayrıca sentetik polimerlere ulaşım kolaydır ve dolayısıyla kaynak sıkıntıları yoktur.

Sentetik temelli polimerin avantajları kadar dezavantajları da mevcuttur. Bunlar; bazılarının hidrofobik özellik sergilemesi nedeniyle hücre yapışması ve yayılmasında problem yaratması, tek başlarına özelliklerinin yeterli olmaması nedeniyle modifiye edici farklı malzemelere ihtiyaç duyulması, çözücülerin kimilerinin yüksek maliyete sahip olmasıdır.

2.5.3. Kompozit malzemeler

Kompozit malzemeler iki ya da daha fazla malzemenin bir araya uyumlu bir şekilde gelmesi ile oluşmaktadırlar. Polimerik malzemenin tek başına yeterli özellik sergileyememesi ya da oluşturulacak doku iskelesinden birden fazla farklı fonksiyonellik beklenmesi gibi durumlarda tercih edilirler. Özellikle 3B doku iskeleleri oluşturulurken, iyi mekanik özellikler, hücresel aktivitenin desteklenmesi, biyobozunurluk, biyouyumluluk gibi özellikler beklenmektedir. Bu durumda da uygun malzemeler ile kompozit yapılar kullanılması, istenilen özellikte doku iskelesi elde edilmesine olanak sağlar. Aynı zamanda yüksek maliyet de kompozit malzemelerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Yüksek maliyetteki bir polimerik malzemenin kullanımının yerine daha düşük maliyetli fakat benzer özelliklere sahip farklı malzemelerin bir araya getirilmesiyle de 3B doku iskeleleri oluşturulabilmektedir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Malzemeler

Yönlendirilmiş, nanofiber yapıda elektriksel iletkenliğe sahip membranların üretiminde kullanılan Poli(ϵ -kaprolakton) (ortalama $M_n=70,000-90,000$) Sigma Aldrich (Almanya) firmasından, Polianilin (emeraldin bazlı ortalama $M_n=100,000$), kamporsülfonik asit (HSCA) ve çözücü olarak kullanılan 1,1,1,3,3,3- Hexafluoro-2-propanol (HFIP) Merck (Almanya) satın alınmıştır.

3.2. Nanofiber Membran Üretimi

Elektroeğirme prosesi için kullanılacak çözelti iki aşamada hazırlanmıştır. İlk olarak, HSCA ve HFIP toplamda 5 dk. olacak şekilde muamele edilmiştir. Daha sonra HSCA ile eşit orandaki PANI polimeri de HFIP içerisinde çözünmeye bırakılmıştır. Homojenliğin sağlanması amacıyla gece boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 100 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra 4 kez 5'er dk. süre ile ultrasonik banyoda tutulmuştur. İkinci karışımın hazırlanması amacıyla PCL granülleri HFIP çözücüsü içerisine aynı parametrelerde manyetik karıştırıcıda çözünmeye bırakılmıştır. Toplam çözelti konsantrasyonu %12 (g/ml) olarak belirlenmiştir. Aynı çözünme sağlandıktan sonra her iki karışım birleştirilmiş ve bir süre daha manyetik olarak karıştırılarak homojenlik sağlanmıştır. Varsa çözünmemiş partiküllerin giderilmesi amacıyla 0.2 μ m gözenek çaplı filtreden geçirilmiştir.

Elektroeğirme düzeneği için mikro şırınga pompası Syringe Pump (New Era Pump Systems, Inc, New York), voltaj kaynağı OptoSense (Orlando, Florida), toplayıcı levha olarak döner silindir kullanılmıştır. Yönlendirilmiş nanofiber membranların üretiminde 1 ml/h akış hızı, 19,5 kV voltaj ile 15 cm enjektör iğnesi ve toplayıcı arasında mesafe kullanılmıştır. Tüm elektroeğirme çalışmaları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.3. 3-Boyutlu (3B) Doku Matrisleri için Kalıpların Üretilmesi

Doku matrislerinin istenilen form ve ölçülerde olması amacıyla natural PLA, 3D80 2.85 mm (İspanya) filamentini satın alınmıştır. Ölçüleri 2,5 x 2,5 cm olarak SOLID WORKS programında çizilip CURA programında katman kalınlığı, yazıcı tabla

konumu, filament doluluk oranı ve baskı süresi gibi parametreler ayarlandıktan sonra 3B yazıcı SD Kartı vasıtasıyla kalıp çizimleri somut olarak elde edilmiştir.

3.4. 3-Boyutlu (3B) Doku Matrislerinin Oluşturulması

Hücreleştirilmiş DCM ve PANI/PCL nanofiber membrandan oluşan matrisler hazırlanması amacıyla ilk olarak önceden hazırlanan ve sığır iskelet kas dokusunun mekanik, kimyasal ve enzimatik hücreleştirme yöntemlerinin modifikasyonu ile elde edilen DCM, 0,01M HCL içerisinde 0,03 g/ml konsantrasyonda olacak şekilde çözünmüştür. Homojen bir yapı ile istenen viskozite elde edilmesi amacıyla oda sıcaklığında bir gece 100 rpm olmak üzere mekanik karıştırıcıda işlem devam ettirilmiştir. 3B doku matrislerinin belirlenen ölçülerde elde edilmesi amacıyla daha önceden 3 boyutlu yazıcıda (Ultimaker 2-Go, Ultimaker, Netherlands) basılmış olan kalıplar kullanılmıştır (Şekil 3.1). İlk olarak kalıba yerleştirilen nanofiber membranların üzerine DCM çözeltisi konulmuş ve kelepçeler sayesinde sızdırmazlığından emin olunduktan sonra -20°C'de dondurulmuştur. Örnekler daha sonra liyofilizatörde (Labconco Corporation, USA) 0,030 mBar basınç ve -50 °C sıcaklıkta 24 saat boyunca bekletilerek kuruması sağlanmıştır. DCM+PCL/PANI matrisi elde edildikten sonra kullanıma kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. 3B yazıcı teknolojisi ile üretilmiş kalıpların içerisine yerleştirilen PCL/PANI nanofiber membranlar

3.5. Doku Matrislerinin Karakterizasyonu

3.5.1. Morfolojik karakterizasyon (SEM)

Elektroeğirme ile elde edilen PCL/PANI membranının ve liyofilize DCM'in morfolojik özellikleri, fiber yapıları ve fiber çapları hakkında bilgi edinmek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM, XL30 ESEM-FEG, FEI-Philips, Hollanda) ile inceleme yapılmıştır. Burada örnekler 3mm yüksekliğinde kesildikten sonra dikey görüntüleme yapılmıştır. Bunun yanı sıra 3B kombine doku matrisleri oluşturulduktan sonra da örnekler 1x1 cm boyutlarında kesilerek SEM altında incelenmiştir.

3.5.2. Yapısal analiz (FTIR)

Nanofiber membranda her iki bileşiğin varlığını ispatlamak açısından PCL/PANI membranının kimyasal yapısı FTIR-ATR analizi (FTIR, Perkin Elmer, Spectrum 100 ,USA) ile 4000–400 cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. Mekanik test

PCL/PANI membranların tek başına ve DCM varlığındaki mekanik özellikleri belirlemek amacıyla çekme testi cihazı (1.000 N ve 20.000 N, Zwick/Roell, Almanya) kullanılmıştır. Bu amaçla, örnekler 3.5x 0.5 cm boyutlarında kesilerek cihazın çeneleri arasına yerleştirildikten sonra oda sıcaklığında 10 mm/dk sabit çekme hızıyla çekilerek test edilmiştir (Şekil 3.2). Ölçümler için 5 örnek hazırlanıp (n=5), test boyunca çekme gerilimine karşı % uzama değerleri kaydedilerek sonuçlar ortalama değerler ve standart sapmaları olarak sunulmuştur.



Şekil 3.2. Mekanik test için hazırlanan kalıp

3.5.4. *In vitro* bozunma testleri

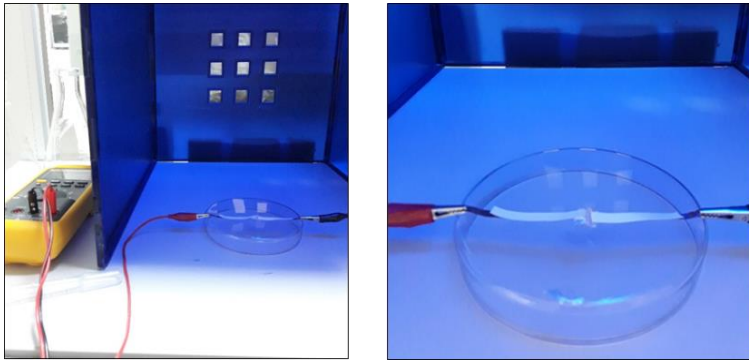
Hazırlanan PCL/PANI nanofiber membranlar ve ayrıca DCM+PCL/PANI 3B doku matrislerinin *in vitro* bozunma testleri 15,30,45,60 ve 90 günlük periyodlar halinde gerçekleştirilmiştir. Biyobozunma testleri için membranlar 2x2 cm boyutunda kesildikten sonra test öncesi ağırlığın belirlenmesi amacıyla tartıma alınmıştır. Örnekler, %2 oranında sodyum azid (NaN₃) içeren fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS, pH=7,4) içerisine daldırılarak 37°C'deki etüve konulmuştur. Bozunma çözeltileri her örnek için eşit miktarda olup 15 günde bir tazelenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında örnekler çözeltiden çıkarılmış ve saf su ile yıkandıktan sonra 37 °C'deki etüvde 24 saat boyunca kurutulmuştur. Süre sonunda örneklerin tekrar tartımı alınarak aşağıdaki denkleme göre (3.1) ağırlık kaybı hesaplamaları yapılmıştır [52].

$$\% W = [(W_i - W_s) / W_i] \times 100 \quad (3.1)$$

Denklem (3.1)'de yer alan W (%); yüzde ağırlık kaybını, W_i ; örneklerin ilk ağırlık kaybını ve W_s ; son ağırlık kaybını ifade etmektedir.

3.5.5. Elektriksel iletkenlik çalışmaları

PCL/PANI elektroçözülmüş nanofiber membranlar 1x1 cm boyutlarında kesilerek ölçüm için hazırlanmıştır. Örnekler sıvı gümüş vasıtasıyla bakır tel ile temas ettirilmiştir. Membran iletkenliğini gözlemleyebilmek için iki tel arasına membran boşluğu bırakılmıştır. İletkenlik çalışmaları multimetre cihazı (Fluke 87V) kullanılarak yapılmıştır. Multimetre cihazının her iki probunun temiz olmasına dikkat edilerek, manyetik alandan etkilenmeden oda sıcaklığında ölçüm düzeneği kurulmuştur (Şekil 3.3).

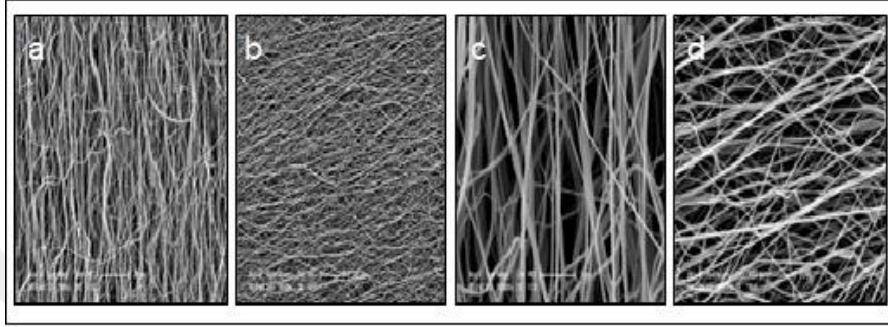


Şekil 3.3. Multimetre ile oluşturulan iletkenlik ölçüm düzeneği

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Morfolojik Karakterizasyon (SEM) Analizi

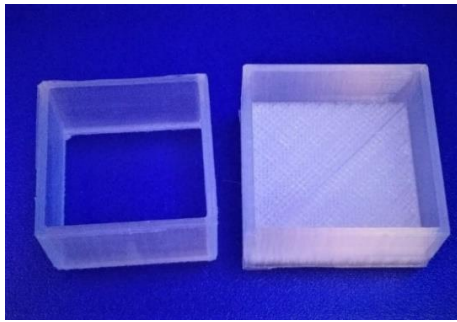
Analiz kapsamında ilk olarak PCL/PANI nanofiber membranın morfolojik yapısı incelenmiştir. Bu kısımda önemli olan membranda bulunan fiberlerin yönlenmelerini inceleyebilmektir. Doğal kas dokusunda olduğu gibi nanofiber membranda da yönlenmeler olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Nanofiber membranların SEM mikrografikleri

a. PCL 2000X, b. PCL/PANI 2000X, c. PCL 10000X, d. PCL/PANI 10000X

Hedeflenen spiral yapının oluşturulması için ilk olarak PLA filamenti ile kalıplar üretilmiştir (Şekil 4.2). Bu kalıplar vasıtasıyla nanofiber membran ile DCM dondurarak kurutma işlemine alınmıştır ve sonucunda Şekil 4.3’ de olduğu gibi katmanlı bir yapıya sahip olmuştur.

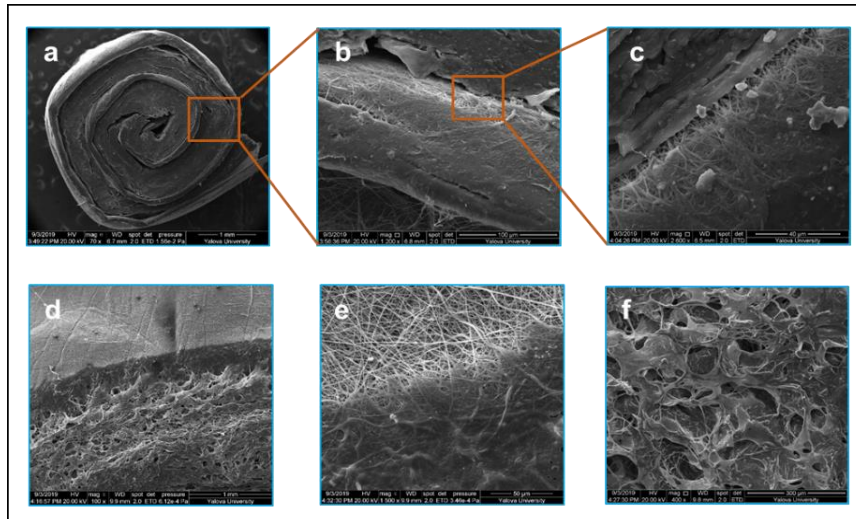


Şekil 4.2. Natural PLA filamenti ile 3B yazıcıda üretilen kalıp ve kelepçesi



Şekil 4.3. Liyofilizasyon sonrası PCL/PANI+DCM kalıptan çıkarılmış haldeki görüntüsü

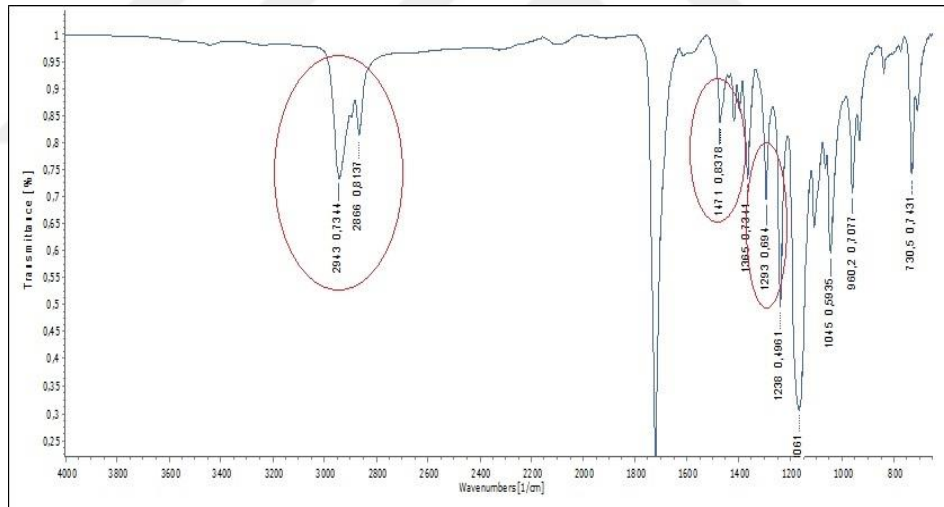
Süngerimsi DCM ile yönlendirilmiş nanofiber yapının birbirine entegrasyonunu gözlemlemek çok önemlidir çünkü dairesel katlama yöntemi ile oluşturulan 3B kombine doku matrisi sayesinde mekanik mukavemet sağlanmanın yanında doğal kas dokusu ile benzerlik sağlamak mümkündür. Spiral formun bu önemli avantajlarından yararlanmak için kusursuz bir entegrasyon olmalıdır. Yine bu avantajlardan faydalanmak için doku yenilenmelerinde kullanılmak üzere spiral formda doku matrisleri literatürde de mevcuttur [53]. Şekil 4.4'te görüldüğü üzere liyofilize DCM ve PCL/PANI nanofiber membran birbirine çok iyi entegre olarak bütünleşik bir görüntüye sahiptir.



Şekil 4.4. 3B kombine matrisin SEM görüntüsü. Dikey; a. 70X b.1200X c.2600X. Arayüzey görüntüleri; d.100X e.1500X. Kombine matris bileşeni olarak liyofilize DCM görüntüsü; f.400X

4.2. Yapısal Analiz (FTIR)

Bu tez çalışması kapsamında meydana getirilen polimerik membranın ana bileşenleri biyobozunur olan PCL polimeri ile elektrik iletkenliğe sahip olan PANI polimeridir. Dolayısı ile yapı içerisinde bu polimerlerin varlığını ispatlamak amacıyla kimyasal yapılarına bakılarak analiz yapılmıştır. Gerçekleştirilen FTIR-ATR analizi sonuç grafiği Şekil 4.5'te gösterilmektedir. Bu verilere göre PCL polimerine ait olan C=O gerilmesi, 1728 cm^{-1} dalga sayılarında mevcuttur [54]. Ayrıca yine PCL'e ait olarak CH_2 gerilmesi $2866\text{--}2943\text{ cm}^{-1}$ karakteristik bantlar gözlemlenmiştir [55]. PANI için inceleme yapıldığında PANI moleküler zincirinde benzoid yapısal birimler ve kinoid yapısal birimler karşımıza çıkmaktadır. Bu bilgi ışığında PANI polimeri için karakteristik bantlar; benzen halkası C-H gerilmesi 830 cm^{-1} , kinoid halka gerilmesi 1061 cm^{-1} , C-N gerilmesi 1293 cm^{-1} ve N benzoid halka verilmesi 1471 cm^{-1} dalga boylarındadır [55] [56]. Böylece oluşturulan membranın ana bileşenlerinin her ikisinin de varlığı ispatlanmıştır.



Şekil 4.5. PCL/PANI ile hazırlanan filmlerin FTIR spekturumları

4.3. Mekanik Test

Kas doku iskeleleri için nanofiber membranlar üretildiğinde sahip oldukları mekanik özellikler nihai ürünü de doğrudan etkilemektedir. Bu etki üretim esnasında fiberlerin yönelme şekline, ortam şartlarından ve hatta polimerin kendisinden kaynaklanabilmektedir. Örneğin, PANI kas doku mühendisliği uygulamalarında elektriksel iletkenlik özelliği nedeni ile fazlaca tercih edilen bir polimerdir fakat bunun yanında yapısı gereği kırılgan ve hassasiyete de sahiptir [54]. Bu gibi kısıtlamalardan

doğabilecek sorunları gözlemleyebilmek, nihai yapı için en kusursuz şekilde mekanik özelliklere sahip olmak amacı ile mekanik testler yapılmaktadır. Bunun yanı sıra dikkat edilmesi gereken önemli konulardan biri de oluşturulan doku iskelesinin hacimsel hasarı onarana kadar mekanik olarak bölgeye destek verebilmesidir. Maruz kaldığı yükü ya da gerilmeyi karşılayamayan, iyileşme sağlayamadan mekanik stabilitesini kaybeden yapılar bu ve benzeri çalışmalar için uygun değildir. Bahsedilen bu sebeplerden ötürü polimerik membranlar ile 3B matrikslere çekme testi uygulanmıştır. Spiral formdaki matriksler çekme test cihazındaki çenelere tutturulamadığından doğru ölçüm alınması mümkün olmamıştır. Bu nedenle çekme dayanımı hakkında bilgi sahibi olmak için iki boyutlu olan ve belirli standarda göre kesilen örnekler üzerinde testler yapılarak çekme gerilimi ve uzama hakkında veriler elde edilmiştir. Bu veriler Çizelge 4.1’ deki gibidir.

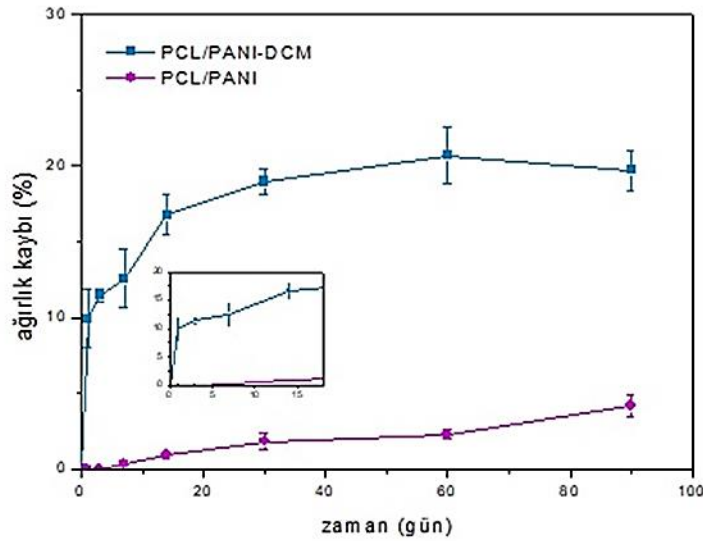
Çizelge 4.1. Hazırlanan membranlar ve 3B matrikslerin mekanik özellikleri (Ort±SS) (n=5)

Örnek adı	Elastisite modülü (MPa)	Kopma noktasındaki uzama değeri (%)
PCL	16±6,8	36,7±15,6
PCL/PANI	11,5±3,8	82,5±14,3
PCL/PANI-DCM	2,1±0,1	56,4±5,9

Veriler karşılaştırıldığında DCM içermeyen polimerik membranların elastik dayanımlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum süngerimsi yapının gerilime karşı daha zayıf mekanik özellikler sergilediğini göstermektedir. Sadece PCL/PANI polimerik membrana nazaran DCM içeren yapılarda daha yüksek gözeneklilik ve boşluklar mevcuttur [57]. Bu durum mekanik özellikleri büyük ölçüde etkilemektedir. Süngerimsi yapının zayıf fiziksel özelliklere sahip olması ve yapıya dahil olması ile birlikte elastisite modülünde azalma meydana gelmiştir. Öte yandan nanofiber membran kendi içerisinde incelendiğinde PANI ile birlikte elastik modülde azalma meydana gelmesine karşın kopmadaki yüzde uzama değeri artmıştır. Bunun sebebi olarak yukarıda da bahsedilen PANI polimerinin sınırlayıcı özellikleri olduğu düşünülmektedir. PANI konsantrasyonunun artması ile elastik modülde düşüş görülmesi benzer olarak, Chen ve ark. çalışmalarında da görülmektedir [54].

4.4. In vitro Bozunma Davranışları

Bu çalışmada hacimsel kas doku yoksunluğunun onarımını sağlayacak 3B doku matriksinden beklenen işleyiş onarımın sağlanması sonrası bölgeden uzaklaşmasıdır. Bu sebeple hazırlanmış olan nanofiber membranda biyobozunur polimer tercih edilmiştir. PCL, doku mühendisliği çalışmalarında çokça tercih edilen, biyoyumlu aynı zamanda biyobozunur özelliğe sahip bir polimerdir [58, 59]. Ana bileşenlerinden biri PCL olan nanofiber membran ile nihai 3B matriksin bozunma davranışlarını gözlemlemek için zamana bağlı ağırlık kayıpları incelenmiştir. DCM olmaksızın hazırlanan nanofiber membranlar, DCM içeren doku iskelelerine göre daha yavaş bozunma göstermiştir. Burada, süngerimsi yapıda olan DCM' in bozunmayı hızlandırarak ortalama ağırlık kaybını arttırdığı açıkça görülmektedir. Bu durum hücreleştirilmiş matriksin mekanik açıdan güçlü olmaması ve kolayca bozunabilmesi ile açıklanabilmektedir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda da PCL'in biyobozunurluğunun yavaş olduğu gözlenmiştir [58, 60]. Bu durumun sebebi PCL yapısında bulunan, tekrarlı $-CH_2$ gruplarının hidrofobik olmasından kaynaklıdır [61]. DCM içeren ve içermeyen iki grubun karşılaştırılması yapılırsa 30 günlük süreçte aynı koşullara sahip örneklerden DCM+PCL/PANI yaklaşık olarak %20 ortalama kayıp sergilerken PCL/PANI nanofiber membranlarda ortalama %2'ye yakın kayıp izlenmiştir.



Şekil 4.6. PCL/PANI membranların ve PCL/PANI-DCM kombine matrikslerin in vitro ortamda fizyolojik koşullarda (PBS, pH=7.4 ve 37°C) degradasyonu

4.5. Elektriksel İletkenlik Analizi

Elektriksel iletkenlik, özellikle kaslar gibi uyarılabilir dokular için önemli bir özelliktir dolayısıyla iletken polimerler kullanılarak birçok alanla birlikte kas doku mühendisliğinde de çalışmalar halen devam etmektedir. Bu çalışmada iletkenlik özelliğinden faydalanılan polimer polianilindir. Polianilin (PANI) kolay iletkenlik kontrolüne sahip, sentezi ve ulaşılabilirliği kolay bir polimerdir [62]. Bu sebeplerden tercih edilmiş olup bu tez çalışmasında elektrik iletkenliği büyük ölçüde etkileyen ana etkindir. PCL/PANI nanofiber membran için multimetre ile yapılan iletkenlik ölçümleri neticesinde elde edilen değerler 3×10^{-9} - $2,5 \times 10^{-9}$ S/cm aralığındadır. PCL ve PANI ile daha önceden de yapılan iletkenlik çalışmalarında filme PANI dahili ile iletkenlik önemli ölçüde artmıştır ancak yalnızca PCL analiz edildiğinde iletkenlik değeri 3×10^{-12} S/cm olarak gerilemiştir [63]. Bu çalışmalar da değerlendirildiğinde ulaşılan sonuca göre PANI iletkenliği ile nanofiber membrandaki varlığı doğrulanmıştır.

5. SONUÇLAR

- Sonuç olarak bu tezde kendi kendine yenilenmesi güç olan hasarlı kasların tedavisinde kullanılmak üzere 3 boyutlu doku matriksi geliştirilmiştir. İlk olarak elde edilen nanofiber membranın DCM ile uygun şekilde entegre hale gelmesi amacıyla PLA filament kullanılarak 3 boyutlu yazıcı ile basılan kalıplar başarılı bir şekilde üretilmiştir.
- DCM ve PCL/PANI nanofiber membrandan oluşan matriksin entegre hale gelmesi ve hedeflenen spiral forma getirilmesi için liyofilizasyon uygulanmıştır. Bu işlem neticesinde çift katmanlı yapının ön ve arka yüzleri incelendiğinde hedeflenen entegrasyona ulaşıldığı görülmektedir.
- Elde edilen nanofiber membranda, doğal kas dokusunda olduğu gibi yönelmeler sağlanmıştır ve üretiminde ise avantajlarından dolayı elektro eğirme kullanılmıştır. Nanofiber katmanda biyouyumlu olan polikaprolakton ve elektrik iletken özelliğe sahip olan polianilin polimeri tercih edilmiştir.
- F-TIR analizi ile birlikte kinoid-benzoid halkaların varlığı ayrıca C=O gerilmesi, CH₂ gerilmesi gözlenerek her iki polimerin de yapıda varlığı ispatlanmıştır. Nanofiber membranın üst katmanında bulunan liyofilize DCM ile birlikte kas hücreleri için doğal bir ortam oluşturulmuş böylece büyüme için gerekli olan ortam sağlanmıştır. Geliştirilen matriksin tasarımı mekanik olarak mukavemet sağlaması ve doğal kas dokusunu taklit amacıyla spiral olacak şekilde yapılmıştır.
- Hem çift katmanlı yapının hem de nanofiber yapının SEM görüntüleri incelendiğinde, nanofiber yapıda yönelme olduğu ve doğal kas dokusunun taklidinin başarılı olduğu gözlemlenmektedir. Buna ek olarak, çift katmanlı yapının bütünleşmiş olduğu ve entegrasyon sonucunda bir hasar meydana gelmediği görüntüler ile desteklenmiştir. Tüm görüntülerde yüzeyin pürüzsüz olduğu boncuk oluşumunun meydana gelmediği saptanmıştır.
- Üretilen 3B matriksin mekanik özelliklerinin belirlenmesi için çekme testi yapılmıştır ancak verilerin daha gerçekçi olması ve test kolaylığı açısından çift katman yapıda spiral form kullanılmamıştır. Belirlenen standart kullanılarak

yapılan çekme testi sonucu hücreleştirilmiş deselülerize matriks ile birlikte elastik dayanımda azalmalar olduğu gözlemlenmiştir.

- Hazırlanan yapıların *in vivo* bozunma davranışları incelendiğinde sadece nanofiber membranın bozunma hızı hücreleştirilmiş deselülerize matrise göre daha azdır. DCM 'in yapıya dahil olması ile birlikte bozunma hızının 10 kat arttığı gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlar ışığında hedeflenen nihai yapının hedeflenen özellikleri sağladığı kas doku mühendisliği için yeni bir alternatif olabileceği kanısına varılmıştır. Böylece kas dokuda büyük hacimli kayıpları olan hastalar için de umut vadetmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] Sandri, M., Autophagy in skeletal muscle. *FEBS letters*, 2010. **584**(7): p. 1411-1416.
- [2] Nakayama, K.H., M. Shayan, and N.F. Huang, Engineering biomimetic materials for skeletal muscle repair and regeneration. *Advanced healthcare materials*, 2019. **8**(5): p. 1801168.
- [3] Smoak, M.M. and A.G. Mikos, Advances in biomaterials for skeletal muscle engineering and obstacles still to overcome. *Materials Today Bio*, 2020: p. 100069.
- [4] Jana, S., S.K.L. Levengood, and M. Zhang, Anisotropic materials for skeletal-muscle-tissue engineering. *Advanced Materials*, 2016. **28**(48): p. 10588-10612.
- [5] Sicari, B.M., R. Londono, and S.F. Badylak, Strategies for skeletal muscle tissue engineering: seed vs. soil. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015. **3**(40): p. 7881-7895.
- [6] Ma, P.X., Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 2008. **60**(2): p. 184-198.
- [7] Batrinescu, G., et al., Conductive polymer-based membranes. *Conducting Polymers*, 2016.
- [8] Shaffer, F. and R. Neblett, Practical anatomy and physiology: The skeletal muscle system. *Biofeedback*, 2010. **38**(2): p. 47-51.
- [9] Kroemer, K.H., Assessment of human muscle strength for engineering purposes: a review of the basics. *Ergonomics*, 1999. **42**(1): p. 74-93.
- [10] Serbest, K. and O. ELDOĞAN, İskelet kaslarının yapısı ve biyomekaniği. *Academic Platform Journal of Engineering and Science*, 2014. **2**(3): p. 41-51.
- [11] Dong, R., P.X. Ma, and B. Guo, Conductive biomaterials for muscle tissue engineering. *Biomaterials*, 2020. **229**: p. 119584.
- [12] Huard, J., Y. Li, and F.H. Fu, Muscle injuries and repair: current trends in research. *JBJS*, 2002. **84**(5): p. 822-832.
- [13] McLaughlin, S.W., et al., ■ Skeletal Muscle Regenerative Engineering, in *Regenerative Engineering*. 2013, CRC Press. p. 379-404.
- [14] Grasman, J.M., et al., Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta biomaterialia*, 2015. **25**: p. 2-15.
- [15] Qazi, T.H., et al., Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends. *Biomaterials*, 2015. **53**: p. 502-521.

- [16] Wang, L., et al., Nanofiber yarn/hydrogel core-shell scaffolds mimicking native skeletal muscle tissue for guiding 3D myoblast alignment, elongation, and differentiation. *ACS nano*, 2015. **9**(9): p. 9167-9179.
- [17] Carnes, M.E. and G.D. Pins, Skeletal muscle tissue engineering: biomaterials-based strategies for the treatment of volumetric muscle loss. *Bioengineering*, 2020. **7**(3): p. 85.
- [18] Grefte, S., et al., Skeletal muscle development and regeneration. *Stem cells and development*, 2007. **16**(5): p. 857-868.
- [19] Sjöstrand, F. and E. Andersson-Cedergren, The ultrastructure of the skeletal muscle myofilaments at various states of shortening. *Journal of ultrastructure research*, 1957. **1**(1): p. 74-108.
- [20] VanDusen, K.W., et al., Engineered skeletal muscle units for repair of volumetric muscle loss in the tibialis anterior muscle of a rat. *Tissue Engineering Part A*, 2014. **20**(21-22): p. 2920-2930.
- [21] Tang, X., et al., Skeletal muscle regenerative engineering. *Regenerative engineering and translational medicine*, 2019. **5**(3): p. 233-251.
- [22] Grogan, B.F., J.R. Hsu, and S.T.R. Consortium, Volumetric muscle loss. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2011. **19**: p. S35-S37.
- [23] CAN, N. and M.S. ERSOY, NANOLİF YAPILI POLİMERİK DOKU İSKELELERİ. *Journal of Textiles & Engineers/Tekstil ve Mühendis*, 2014. **21**(95).
- [24] Puppi, D., et al., Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in polymer Science*, 2010. **35**(4): p. 403-440.
- [25] Rizzi, R., et al., Tissue engineering for skeletal muscle regeneration. *Muscles, ligaments and tendons journal*, 2012. **2**(3): p. 230.
- [26] Cittadella Vigodarzere, G. and S. Mantero, Skeletal muscle tissue engineering: strategies for volumetric constructs. *Frontiers in physiology*, 2014. **5**: p. 362.
- [27] Kang, M.S., et al., Advanced techniques for skeletal muscle tissue engineering and regeneration. *Bioengineering*, 2020. **7**(3): p. 99.
- [28] Sunar, B.S. and C. Hasçıçek, Elektroeğrilmiş Nanoliflerin İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak ve Doku Mühendisliğinde Kullanımı. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2017. **21**(3): p. 425-435.
- [29] Sill, T.J. and H.A. Von Recum, Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 2008. **29**(13): p. 1989-2006.
- [30] Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, 2010. **28**(3): p. 325-347.

- [31] Bosworth, L. and S. Downes, Biocompatible three-dimensional scaffolds for tendon tissue engineering using electrospinning, in Cellular response to biomaterials. 2009, *Elsevier*. p. 3-27.
- [32] Tan, S.-H., et al., Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*, 2005. **46**(16): p. 6128-6134.
- [33] Mülazım, İ. and M.F. CANPOLAT, Farklı Tipteki Toplayıcı Plakaların Elektrostatik Çekim ile Elde Edilen Nanoliflerin Morfolojisi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. *Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*. **29**(1): p. 161-170.
- [34] Deitzel, J.M., et al., The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 2001. **42**(1): p. 261-272.
- [35] Zeng, J., et al., Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *Journal of controlled release*, 2003. **92**(3): p. 227-231.
- [36] Gu, B.K., et al., 3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications. *Biomaterials research*, 2016. **20**(1): p. 1-8.
- [37] Campbell, T.A. and O.S. Ivanova, 3D printing of multifunctional nanocomposites. *Nano Today*, 2013. **8**(2): p. 119-120.
- [38] Kanczler, J.M., et al., Biocompatibility and osteogenic potential of human fetal femur-derived cells on surface selective laser sintered scaffolds. *Acta biomaterialia*, 2009. **5**(6): p. 2063-2071.
- [39] Zhuang, P., et al., Bioprinting of 3D in vitro skeletal muscle models: A review. *Materials & Design*, 2020. **193**: p. 108794.
- [40] Qazi, T.H., et al., Cell therapy to improve regeneration of skeletal muscle injuries. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 2019. **10**(3): p. 501-516.
- [41] Beier, J.P., et al., Tissue engineering of injectable muscle: three-dimensional myoblast-fibrin injection in the syngeneic rat animal model. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006. **118**(5): p. 1113-1121.
- [42] Wolf, M.T., et al., Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Advanced drug delivery reviews*, 2015. **84**: p. 208-221.
- [43] Dhandayuthapani, B., et al., Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International journal of polymer science*, 2011. **2011**.
- [44] John, M.J. and S. Thomas, Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate polymers*, 2008. **71**(3): p. 343-364.
- [45] Turner, N.J. and S.F. Badylak, Regeneration of skeletal muscle. *Cell and tissue research*, 2012. **347**(3): p. 759-774.

- [46] Mase Jr, V.J., et al., Clinical application of an acellular biologic scaffold for surgical repair of a large, traumatic quadriceps femoris muscle defect. *Orthopedics*, 2010. **33**(7).
- [47] Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 2011. **32**(12): p. 3233-3243.
- [48] DeQuach, J.A., et al., Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture. *PloS one*, 2010. **5**(9): p. e13039.
- [49] Marçal, H., et al., A comprehensive protein expression profile of extracellular matrix biomaterial derived from porcine urinary bladder. *Regenerative medicine*, 2012. **7**(2): p. 159-166.
- [50] Asghari, F., et al., Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 2017. **45**(2): p. 185-192.
- [51] Mitra, T., et al., Studies on cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen. *Materials Research*, 2013. **16**(4): p. 755-765.
- [52] Barbeck, M., et al., Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components—Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioactive materials*, 2017. **2**(4): p. 208-223.
- [53] Jiang, T., et al., Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in polymer Science*, 2015. **46**: p. 1-24.
- [54] Chen, M.-C., Y.-C. Sun, and Y.-H. Chen, Electrically conductive nanofibers with highly oriented structures and their potential application in skeletal muscle tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 2013. **9**(3): p. 5562-5572.
- [55] Low, K., et al., Polyaniline/poly (ϵ -caprolactone) composite electrospun nanofiber-based gas sensors: optimization of sensing properties by dopants and doping concentration. *Nanotechnology*, 2014. **25**(11): p. 115501.
- [56] Zeng, X.-R. and T.-M. Ko, Structures and properties of chemically reduced polyanilines. *Polymer*, 1998. **39**(5): p. 1187-1195.
- [57] Suwantong, O., Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. *Polymers for Advanced Technologies*, 2016. **27**(10): p. 1264-1273.
- [58] Abedalwafa, M., et al., Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. *Rev. Adv. Mater. Sci*, 2013. **34**(2): p. 123-140.
- [59] Mohamed, R.M. and K. Yusoh, A review on the recent research of polycaprolactone (PCL). *Advanced materials research*, 2016. **1134**: p. 249-255.

- [60] Shi, R., et al., Structure, physical properties, biocompatibility and in vitro/vivo degradation behavior of anti-infective polycaprolactone-based electrospun membranes for guided tissue/bone regeneration. *Polymer degradation and stability*, 2014. **109**: p. 293-306.
- [61] Hao, J., M. Yuan, and X. Deng, Biodegradable and biocompatible nanocomposites of poly (ϵ -caprolactone) with hydroxyapatite nanocrystals: Thermal and mechanical properties. *Journal of applied polymer science*, 2002. **86**(3): p. 676-683.
- [62] Cho, M.S., et al., Synthesis and electrical properties of polymer composites with polyaniline nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 2004. **24**(1-2): p. 15-18.
- [63] Borriello, A., et al., Optimizing PANi doped electroactive substrates as patches for the regeneration of cardiac muscle. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2011. **22**(4): p. 1053-1062.



ÖZGEÇMİŞ

2014 yılında Yalova Üniversitesi Polimer Matzeme Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimini almaya başlamış ve 2019 yılında mezun olmuştur.

TEZDEN TÜRETİLEN YAYIN VE ESERLER

N. Z. Renkler, **E. Selam**, S. Gokyer, E. Ergene, M. Goker, S. Odabas, P. Yilgor Huri, K.Tuzlakoglu “ Development of 3D combined bioactive tissue matrices and evaluation of myogenic cell activities on these matrices under electrical stimulation” 31 st European Conference on Biomaterials, Berlin, Germany, Eylül 2021