

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**KOLAJEN TEMELLİ DOKU İSKELETİ ÜRETİMİ İÇİN ELEKTRİK ALAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Resul ÖZDEMİR

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

OCAK 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLAJEN TEMELLİ DOKU İSKELETİ ÜRETİMİ İÇİN ELEKTRİK ALAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Resul ÖZDEMİR
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 27/1/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Halil AŞÇI
Dr. Öğr. Üyesi Pelin AKŞİT ÇİRİŞ (Danışman)
Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem SARAÇ

ÖZET

KOLAJEN TEMELLİ DOKU İSKELETİ ÜRETİMİ İÇİN ELEKTRİK ALAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Resul ÖZDEMİR

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pelin AKŞİT ÇİRİŞ

Ocak 2022; 65 sayfa

Gelişen bilim ve artan ihtiyaçlar doğrultusunda sağlık alanındaki beklentiler giderek artmış ve günümüzde yapay doku ve organların geliştirilmesi seviyesine ulaşmıştır. Çeşitli endüstriler ile ortak altyapıyı kullanan biyoteknoloji ürünleri için başlangıçta metaller, seramikler ve plastikler sıklıkla kullanılmıştır. Bu materyaller ile hassas şekilde boyutlandırılmış, mekanik ve biyolojik açıdan dayanıklı ameliyat aletleri ve implantlar hızla üretilebilmiştir. Fakat günümüzde eğilim, biyolojik aktivite sergileyen doku ve organların üretimi için doğal doku materyallerinin kullanılması yönündedir. Bu materyallerin elde edilme şekilleri, ürüne dönüştürülme prosesleri, mekanik özellikleri, standartları ve ilgili yönetmelikleri diğer endüstriyel materyallerden oldukça farklıdır.

Biyolojik materyallerin, doğal dokularda sağladıkları gibi biyobenzetim ürünlerinde de yeterli mekanik dayanım sağlamaları beklenebilir. Fakat mevcut üretim teknikleri doğal yapılardaki ağ yapısı ve çapraz bağ oluşumunu sağlayamadığı için doğal dokular kadar kuvvetli yapılar oluşturulamamaktadır. Bununla birlikte, mekanik dayanım sağlamak için kullanılan çapraz bağlama kimyasallarının da doza bağlı olarak toksik etkilerinin olabilmesi kullanımlarını sınırlandırmaktadır.

Literatürdeki biyobenzetim çalışmaları ağırlıklı olarak hücrelere iki ya da üç boyutlu adezyon ortamı sağlanmasına ve hücrelerin doğal davranışlarını sergileyip sağlanan doku iskelesini fonksiyonel bir dokuya dönüştürmelerine odaklanmıştır. Bu amaçla doğal fiber yapısı, sinyal molekülleri ve fiziksel uyaranlar ile doğal ortam benzetimi yapılmaya çalışılmaktadır.

Bu tez çalışmasında özgün bir yaklaşımla elektrik alan etkisinin doku iskelesi üretim metodu olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Uygulamanın ekonomik ve yaygın olmasına katkı sunabileceği için elektrotlar, çözelti haznesi ve kontrol devresi modüler şekilde tasarlanmıştır. Çalışmada, canlılardaki yaygın bulunurluğu ve yapısal rolü sebebi ile literatürde sıklıkla kullanılan fakat dielektroforez etkisi ile hareket ettirildiği paylaşılmamış olan kolajen tip-1 proteini kullanılmıştır. İnşa süresi partiküllerin büyüklüğüne bağlı olduğu için büyük partiküllerin de hareket ettirilebileceği yüksek elektrik alan şiddetini sağlayacak bir düzenek tasarlanmıştır. İmal edilen elektrotlar üzerinde, asetik asit çözelti haznesindeki ~30, 70, 80, ve 1150 µm uzunluktaki kolajen partiküllerinin dielektroforez etkisi ile lineer, rotasyonel ve değişken doğrultulu hareketler sergiledikleri gözlenmiştir. Dielektroforezin hücreleri ve yapı materyallerini temas etmeksizin organize edebilme özelliğine dayanarak gelişmiş sterilizasyon altyapısına ihtiyaç duyulmadan sahada doku iskelesi üretimi için kullanılabileceği

düşünülmüştür. Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen cihaz ile “Biyolojik Materyal Yönlendirme Cihazı” başlığı ve 2021/019014 başvuru numarasıyla Türk Patent Enstitüsüne faydalı model başvurusu yapılmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Elektrik alan, Dielektroforez, Doku mühendisliği, Doku iskelesi, Kolajen, Yapay doku

JÜRİ: Doç. Dr. Halil AŞÇI

Dr. Öğretim Üyesi Pelin AKŞİT ÇİRİŞ

Dr. Öğretim Üyesi Çiğdem SARAÇ



ABSTRACT

INVESTIGATION OF ELECTRIC FIELD EFFECT FOR COLLAGEN BASED SCAFFOLD PRODUCTION

Resul ÖZDEMİR

MSc Thesis in Biomedical Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Pelin AKŞİT ÇİRİŞ

January 2022; 65 pages

In line with developments in science and increasing needs, the expectations in the field of healthcare have gradually increased and today have reached the level of developing artificial tissues and organs. Initially, metals, ceramics and plastics have been often used for biotechnology products, using a common infrastructure with various industries. With these materials, precision-sized, mechanically, and biologically resistant surgical instruments and implants have been produced rapidly. However, the trend today is to use natural tissue materials to produce tissues and organs that exhibit biological activity. The way these materials are obtained, the process of converting them into products, their mechanical properties, the standards, and regulations of these materials are quite different from other industrial materials.

Biological materials can be expected to provide sufficient mechanical strength in biomimetic products as they do in natural tissues. However, since the current production techniques cannot provide the network structure and cross-link formation that exists in natural structures, structures as strong as natural tissues cannot be formed. Also, the fact that crosslinking chemicals can exhibit dose dependent toxic effects, limits their use.

Biomimicry studies in the literature have mainly focused on providing cells with a two or three-dimensional adhesion environment where these cells can exhibit their natural behaviors, transforming the provided tissue skeleton into a functional tissue. For this purpose, natural fibre structures, signal molecules and physical stimuli are used in attempts to simulate the natural environment.

In this thesis, the potential of using the electric field effect as a tissue skeleton fabrication method was investigated with a novel approach. Electrodes, solution chambers and control circuits are designed in a modular manner, as these can contribute to the cost-effectiveness and wider adoption of the application. In the study, collagen type-1 protein was used, which is frequently used in the literature due to its widespread availability and structural role in living beings, however, has not been demonstrated to move under the effect of dielectrophoresis.

Since the construction time depends on the size of the particles, a mechanism has been designed to provide high electric field intensity, which can move large particles. Collagen particles of ~30, 70, 80, and 1150 μm -length in an acetic acid solution chamber placed on the manufactured electrodes were observed to exhibit linear, rotational, and variable directional movements under the effect of dielectrophoresis. Based on the ability

of dielectrophoresis to organize cells and building materials without contact, it is thought that it can be used for tissue skeleton production in the field without the need for advanced sterilization infrastructure. With the device developed within the scope of this thesis, a utility model application was made to the Turkish Patent Institute with the title of "Biological Material Orientation Device" and application number 2021/019014.

KEYWORDS: Artificial Tissue, Collagen, Dielectrophoresis, Electric Field, Scaffold, Tissue Engineering

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Halil AŞÇI

Asst. Prof. Dr. Pelin AKŞİT ÇİRİŞ

Asst. Prof. Dr. Çiğdem SARAÇ



ÖNSÖZ

Öncelikle, özel bir ilgi duyduğum çalışma konumu daha bilimsel bir bakış açısı ile anlamam için hedefler koyarak beni odaklayan ve bu yönde ilerlemeye motive eden değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Pelin Akşit Çiriş'e,

Gerek teknik bilgi paylaşımı gerekse cihaz kullanımı konularında bana zaman ayırarak sonuca ulaşmamda önemli katkıları olan değerli hocam Doç. Dr. Özgür Kazancı'ya,

Çalışmada kullanılan COMSOL yazılımını kullanma imkânı sağlayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hamza Feza Carlak'a,

Çözelti hazırlanması aşamasında desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Hüseyin Girişken, Kadir Bülbül ve Betül Çağlıoğlu'na,

Elektronik devre tasarımında desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşım Seyfettin Kazanır'a ve Fahri Yılmaz'a, Altium programına lisanslı erişim imkânı sağlayan Ayhan Hazır'a,

Bilime yakın olmak adına giriştiğim her çalışmada beni anlayarak destek olan sevgili aileme,

Düşüncelerimi bir deneyle gerçekleştirmek için beni destekleyerek yüksek lisansa başlamama vesile olan, bu süreçte beni aklen ve ruhen destekleyen sevgili eşim Selin Alpağan Özdemir'e, sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kolajen Temelli Doku İskeleti Üretimi İçin Elektrik Alan Etkisinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

31/01/2022

Resul ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
ÇİZELGELERLER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1 Doku Mühendisliği Yaklaşımları	4
2.2 Hücreler Arası Matriks ve Doku Mühendisliği İlişkisi.....	6
2.3 Kolajen Proteinleri ve Yapıları.....	7
2.3 Kolajen Tip-1 Proteini Sentezi ve Yapısı.....	10
2.4 Doku İskelesi İmal Metotları.....	13
2.4.1 Dondurarak kurutma metodu	15
2.4.2 3D baskı metotları	18
2.4.3 Elektro eğirme metodu	19
2.4.4 Elektroforez metodu	22
2.5 Dielektroforez Metodu	23
2.5.1 Dielektroforezin temel ilkesi.....	23
2.5.2 Dielektroforez düzenekleri ve kullanım alanları.....	26
3. MATERYAL METOT	31
3.1 Çözelti Haznesi Hazırlanması	32
3.2 Elektrik Alan Gradyanı ve Polarizasyon Analizi	34
3.3 Elektronik Devre ve PCB Tasarımı.....	34
4. BULGULAR.....	39
4.1 Partikül Boyutunun Çözelti Derişimi ile Ayarlanması	39
4.2 Elektrik Alan Gradyanı ve Polarizasyon Analizi Bulguları	39
4.3 Yüksek Potansiyel Fark Üretilmesi.....	40
4.4 Lineer Partikül Hareketinin Elde Edilmesi	43
4.5 Rotasyonel Partikül Hareketinin Elde Edilmesi.....	45

4.6 Değişken Doğrultulu Partikül Hareketinin Elde Edilmesi	46
5. TARTIŞMA	48
5.1 Lineer Partikül Hareketinin Değerlendirilmesi	48
5.2 Rotasyonel Partikül Hareketinin Değerlendirilmesi	49
5.3 Değişken Doğrultulu Partikül Hareketinin Değerlendirilmesi	50
5.4 Laboratuvar Ölçeğinde Üretimden Endüstriyel Ölçekte Üretime Geçişin Gerektirdiği Yatırımlar ve Önerilen Metodun Bu Süreçteki Olası Katkıları	50
6. SONUÇLAR.....	52
7. KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Å	: Angstrom
d	: Devir
D	: Çap
E	: Elektrik alan
L	: Uzunluk
Re	: Kutupsal koordinatların reel kısmı
s	: Saniye
σ	: Elektriksel iletkenlik
V	: Volt
ϵ	: Elektriksel geçirgenlik
ω	: Frekans
π	: Pi sayısı
.	: Ondalık ayırıcı
∇	: Del ya da Nabla operatörü
%	: Yüzde

Kısaltmalar

2D	: İki boyutlu
3D	: Üç boyutlu
BSA	: Sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin)
CAD	: Bilgisayar destekli tasarım (Computer Aided Design)
CLAC	: Kolajen-benzeri amiloidojenik bileşen
CRISPR	: Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

dak	: Dakika
DC	: Doğru akım
DEP	: Dielektroforez
DHT	: Dehidrotermal işlem
dH ₂ O	: Distile su
DIY	: Kendin yap (Do It Yourself)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECM	: Ekstrasellüler matriks, hücre dışı ortam (Extra Cellular Matrix)
ER	: Endoplazmik retikulum
FACIT	: Kesintili üçlü sarmallara sahip fibrille ilişkili kollajenler (Fibril-Associated Collagens With Interrupted Triple Helices)
F _{DEP}	: Dielektroforetik kuvvet
FR-4	: Alev geciktirici-4 (Flame Retardant-4)
g	: Gram
GelMA	: Jelatin metakrilat
GHz	: Gigahertz
GPa	: Gigapascal
HAp	: Hidroksiapatit
HFIP	: 1,1,1,3,3,3 hekzafloro-2-propanol
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Örgütü (International Standardization Organization)
kDa	: Kilodalton
kHz	: Kilohertz
kV	: Kilovolt
K(ω)	: Clausius-Mossotti faktörü

LED	: Işıık yayan diyot (Light-Emitting Diode)
M	: Molalite
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MÖ	: Milattan önce
MPa	: Megapascal
MOSFET	: Metal Oksit Yarı İletkenli Alan Etkili Transistör (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor)
nm	: Nanometre
nDEP	: Negatif dielektroforez
PAM	: Poliakrilamid
PCB	: Basılı devre kartı (Printed Circuit Board)
PCL	: Polikaprolakton
pDEP	: Pozitif dielektroforez
PDMS	: Polidimetilsiloksan
PET	: Polietilen Tereftalat
PGA	: Poliglikolik asit
pH	: Potansiyel hidrojen
PI	: Poliimid
PLA	: Polilaktik asit
pN	: Pikonewton
PU	: Poliüretan
PVA	: Polivinil alkol
PWM	: Sinyal genişlik modülasyonu (Pulse Width Modulation)

RPM	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions Per Minute)
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
SFF	: Katı Bağımsız Form Fabrikasyon (Solid Freeform Fabrication)
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope)
TFE	: Trifloroethanol
TW-DEP	: Hareketli dalga dielektroforezi (Traveling Wave Dielectrophoresis)
TSPCs	: Tendon kök hücreleri (Tendon stem/progenitor cells)
UV	: Morötesi (Ultraviyole)
VDC	: Volt doğru akım
V _{PP}	: Peak-to-peak voltage (Tepeden tepeye voltaj)
μm	: Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2 ve 3 boyutlu mikro ortamlardaki hücrelerin, etkiyen mekanik kuvvetler ve kimyasal farklılıklar nedeniyle çevreleri ile farklı şekilde etkileşimleri (Duval vd. 2017)	7
Şekil 2.2. Fibril formu kolajenlerin fonksiyonel alanlarının tasvirini de içeren şematik birincil yapısı (Karsdal 2019).....	8
Şekil 2.3. Membran kolajenlerinin fonksiyonel alanlarının tasvirini de içeren şematik birincil yapısı (Karsdal 2019).....	9
Şekil 2.4. Kolajenlerin oluşturduğu üst yapıların şematik gösterimi (Karsdal 2019).....	9
Şekil 2.5. Kolajen tip-1 proteininin sentez ve fibril form oluşturma süreci (Scott vd. 2012).....	11
Şekil 2.6. Kolajen yapısal bölgelerinin isimlendirilmesi (Fan vd. 2012).....	11
Şekil 2.7. a) Kolajen tip-1 fibrillerinin SEM görüntüsü; b) Kolajen tip-1'in D-Banding yapısını gösteren TEM görüntüsü (Greiner vd. 2019).....	12
Şekil 2.8. a) Süngerimsi ve sıkı kemik doku (Gunson vd. 2013); b) Tendon dokusu (Franchi vd. 2007); c) Kornea stoma dokusunda kolajen fibrillerinin birbirine dik lameller halinde dizilimi (Abhari vd. 2018).....	14
Şekil 2.9. a) Karaciğer hepatosit organizasyonu (Lorente vd. 2020); b) Böbrek glomerulus yapısı (Tryggvason ve Wartiovaara 2005).....	15
Şekil 2.10. a) Doğal kemik makro yapısı ve vaskülaritesi (McCarthy 2006); b-c) Dondurarak kurutma ve SFF metotlarının birlikte kullanımı ile elde edilen süngerimsi yapılar (Wahl vd. 2007).....	17
Şekil 2.11. Elektroegirme metodu ile UV ışıkla çapraz bağ oluşturma metotlarının birlikte uygulandığı bir çalışmanın şematik anlatımı (Sadat-Shojai vd. 2016).....	21
Şekil 2.12. a) İnsan plasentasından elde edilmiş kolajen tip-1'in SEM görüntüsü; b) Sığır derisinden elde edilmiş kolajen tip-I'in elektroegirme işleminden sonra TEM görüntüsü (ölçek çizgisi uzunluğu 100nm), 67 nm olan doğal kolajen fibril deseni gözleniyor; c) Kolajen tip-I'in üzerinde düz kas hücrelerinin tutunmuş olduğu gözleniyor (Matthews vd. 2002)	21
Şekil 2.13. a) pH gradyanı oluşturmak üzere hazırlanan düzeneğin temsili gösterimi; b) Uygulama sırasında kolajenin izoelektrik noktası sıfır olan noktada ($\sim$ pH 5.5) toplanması; c) Kolajen çözeltisi içindeki elektrotlara uygulanan potansiyel fark aracılığı ile oluşturulan pH gradyanı; d) Elde edilen kolajen fibril yapısı (Cheng vd. 2008).....	22
Şekil 2.14. a) Elektrik alan gradyanındaki (kesikli çizgiler) bir partikül boyunca dağılan +Q ve -Q yükleri ve onlara etki eden $E(r)$ ve $E(r+d)$ şiddetine sahip elektrik alan vektörleri; b) Q yüklerinin elektrik alan vektörleri ile etkileşiminden doğan F1 ve F2 kuvvetlerinin partiküle etkimesinin illüstrasyonu görülmektedir (Pethig 2017) ..	24
Şekil 2.15. Ortam ve partikül arasındaki elektriksel geçirgenlik farkına bağlı DEP kuvveti yönünün gösterimi a) Pozitif DEP ($\epsilon_m < \epsilon_p$); b) Negatif DEP ($\epsilon_p < \epsilon_m$) (Pethig 2017).....	25

Şekil 2.16. DEP etkisi ile hücre ayrıştırması sağlayan düzenek; a) Trombosit ve eritrositlerin akış profilini göstermek üzere videodaki görüntülerin üst üste eklenmesiyle oluşturulan görüntü; b) DEP etkisi yaratmak için potansiyel fark uygulanan elektrotların dizilimi (Piacentini vd. 2011).....	26
Şekil 2.17. Dielektroforez ile kanal etkisi yaratarak konsantrasyon artışı sağlayan elektrot tasarımı ve sırasıyla a) 0 V; b) 8 Vpp@3 MHz; c) 16 Vpp@3 MHz potansiyel fark uygulanırken partikül dağılımları (Choi vd.2012).....	27
Şekil 2.18. DEP çalışmalarında sıklıkla kullanılan çalışma düzeneği (Bahrieh vd. 2014)	28
Şekil 2.19. a) Ayrılmadan önce oran 1:1 iken ayrılmadan sonra ölü hücreler %90 oranında uzaklaştırılmıştır; b) Ayrılmadan önce ölü ve canlı hücrelerin karbon yapılı dizi üzerindeki dağılımları; c) Ayrılmadan sonra canlı hücrelerin dağılımları (Yıldızhan vd. 2017)	28
Şekil 2.20. a) Düşük maliyetli tanı kiti üretimi için önerilen sistemin prototipi; b) Önerilen sistem ile tek bir maya hücresinin diğer hücrelerden ayrılıp tutulabildiğini gösteren fotoğraf (Esfandypour vd. 2017)	29
Şekil 2.21. a) DEP etkisi elde etmek için üretilen elektrot; b) COMSOL yazılımı ile yapılmış elektrik alan dağılımı analizi; c) Elektrotlar etrafında yoğunlaşmış hücrelerin görüntüsü (Chen vd. 2021)	30
Şekil 3.1. Lineer hareket gözlemek üzere imal edilen PCB-1	35
Şekil 3.2. Rotasyonel hareket gözlemek üzere imal edilen PCB-2.....	35
Şekil 3.3. Değişen doğrultularda hareket eden partikülleri gözlemek için imal edilen PCB-3	36
Şekil 3.4. a) Dielektroforetik kuvvet oluşumunu tetiklemek ve yönetmek üzere senaryo parametrelerinin kontrol edildiği sistem; b) PCB'lere iletilen yüksek voltaj etkisi ile yüzeydeki su haznesi ve PCB arasında plazma oluşumu	36
Şekil 3.5. Gözlemlerin yapıldığı düzenek, a) 0-30VDC güç kaynağı; b) 3Hz-1MHz kare dalga PWM sinyal jeneratörü; c) Osiloskop; d) Görsel kontrol için kullanılan LED dizgi; e) Polyimid (PI) izolasyonlu yüksek voltaj kabloları; f) Çeşitli PCB'ler; g) Çözelti gözlem haznesi; h) Eozin ile boyanmış kolajen çözeltisi; i) 4X dijital mikroskop; j) Mikroskop için kalibrasyon cetveli.....	37
Şekil 3.6. a) Gözlem haznesine damlatılmış kolajen partikülleri; b) Gözlem haznesine distile su (dH ₂ O) eklenmesiyle kolajen partiküllerinin yayılımı; c) Partiküllerin gözlenmesi için kullanılan 4X dijital mikroskop ve PCB adaptörü.....	38
Şekil 4.1. a) Çözelti-1 ile elde edilen partiküller; b) Çözelti-2 ile elde edilen partiküller; c) Çözelti-3 ile elde edilen partiküller	39
Şekil 4.2. a) Homojen elektrik alan oluşturan paralel plakalı model; b) Farklı elektriksel geçirgenlikteki partiküllerin çevresinde homojen elektrik alan etkisiyle oluşan elektrik alan gradyanı ve polarizasyon; c) Homojen olmayan elektrik alan oluşturan model; d) Farklı elektriksel geçirgenlikteki partiküllerin çevresinde homojen olmayan elektrik alan etkisiyle oluşan elektrik alan gradyanı ve polarizasyon.....	40
Şekil 4.3. Transformatörlerin sırayla yüksek voltaj üretmesi için MOSFET'lere uygulanan sinyal	41
Şekil 4.4. Bir nolu MOSFET'in Gate ucuna ulaşan sinyalin osiloskop görüntüsü	41
Şekil 4.5. Bir nolu transformatörün çıkış ucu ile nötr uç arasında oluşan gerilim (107 kHz, ~600 V)	42

Şekil 4.6. a) TW-DEP etkisinin Comsol yazılımı ile gösterimi; b) Kolajen partikülünün PCB üzerindeki başlangıç konumu, partikülün büyüklüğü ve 5. ve 51. Saniyeler sonunda partikülün kat ettiği mesafeler	44
Şekil 4.7. a) PCB-2 üzerinde kolajen partikülünün konumu; b) Partikülün elektrotlara uzaklıkları; c) Partikülün, konum değiştiren elektrik alan etkisi ile kendi ekseninde dönüşü	45
Şekil 4.8. a) Partikül hareketlerinin üst üste eklenmesi ile oluşturulan görsel; b) Partikülün 14 saniye boyunca PCB üzerindeki konumları ve ölçüleri.....	46
Şekil 4.9. a) Partikülün PCB üzerindeki konumunu tarif eden çizim; b) Partikülün 8 saniye içinde bulunduğu dört farklı konumun üst üste getirilmesi ile oluşan görsel...	47



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımlarının genel işleyişi.....	5
Çizelge 3.1. Doku iskelesini oluşturacak partikül boyut ve sayısının tespiti tablosu	31
Çizelge 3.2. Kolajen çözeltisi hesap çizelgesi	33
Çizelge 4.1. Elektrotlara uygulanan voltaj değerleri ve partikülün uzaklığına göre oluşması öngörülen elektrik alan şiddeti değerleri.....	43



1. GİRİŞ

İnsanoğlu kazalar, saldırılar ve hastalıklarla mücadelesinde çeşitli teknikler geliştirmeye uzun zaman önce başlamıştır. Kesikleri dikmek için sütür kullanıldığına dair 32 bin yıl önceye ait kayıtlara rastlanmıştır (Scott 1983; Ratner vd. 2004; Sakr vd. 2021). İlk kez MÖ 600'lü yıllarda Sushruta Samhita'nın çalışmaları ile kişinin kendi vücudunun bir bölgesinden alınan deri dokusunun başka bir bölgesine nakli (otogrefti) gerçekleştirilmiştir (Sushruta 1963; Saraf ve Parihar 2007). Bu temel yaklaşım yeterli otogreft alınamayan vakaların olması, greft alanında enfeksiyon gelişmesi ve yara izi kalması gibi problemlere sebep olabilse de günümüzde rekonstrüktif müdahaleler, lokal doku kayıpları ve iyileşme göstermeyen yaraların tedavisi gibi durumlarda hala uygulanmaktadır (Njoo 2000).

Zaman içinde nakil tekniklerinin ve yardımcı cihazların geliştirilmesi ile hasar görmüş organların sağlam olanları ile değiştirilmesi de mümkün olabilmıştır. İlk organ nakilleri hayvanlarda denenmiş, ardından farklı türler arasında yapılan doku veya organ aktarımı (ksenogreft transplantasyonlar) kapsamında, 1910 yılında maymundan insana böbrek nakli denenmiştir. Organ nakli alanındaki tekniklerin olgunlaşmasıyla insandan insana uzun süreli iyileşme sağlanan ilk allogreft böbrek transferi (aynı türün farklı bireyleri arasında yapılan doku veya organ transferi) 1954 yılında gerçekleştirilebilmiştir (Barker ve Markmann 2013). Bu kazanımlara rağmen donör yetersizliği, ülkeler arasında koordinasyon sağlanmasının güçlüğü, ulaştırma problemleri, hastaların beklemesinin mümkün olamadığı durumlar ve organ reddini önlemek için immunsupresif ilaçların uzun süreli alımının mali ve tıbbi olası olumsuz etkileri transplantasyonlar için engel teşkil etmeye devam etmektedir (Kumar ve Mattoo 2015). Söz konusu engellerin aşılması için bir yandan organ bağışı ve transferine dair organizasyonlar geliştirilmekte iken, diğer yandan doku ve organların yapay olarak üretilmesi için çalışılmaktadır.

Doku mühendisliği doğal biyolojik materyaller, sentetik biyoyumlu materyaller ve bunların kombinasyonlarını kullanarak dokuları yenilemeyi ve benzerlerini üretmeyi amaçlayan bir bilim alanıdır. Bu alan kapsamında, allogreft ya da ksenogreft bir dokunun hücreleştirilerek yapısal iskelesinin kullanılması ve doku iskelesinin yapay olarak inşa edilmesi olarak iki ana konsept geliştirilmiştir. Doku iskelesinin *in vitro* ortamda üretilmesi konsepti kapsamında dondurarak kurutma, kalıplama, 3D baskı, ışıkla kürleme ve elektroegirme gibi teknikler kullanılmaktadır (Puyana vd. 2020). Söz konusu üretim teknikleri ile mikro yapı oluşturulmaya çalışılırken karşılaşılan temel problemlerden birisi üretim materyallerinin çözelti ve/veya jel formunda olması sebebi ile taklit edilmeye çalışılan doku ve organların morfolojik ve mekanik özelliklerinin sağlanmasındaki zorluktur (Kim vd. 2016; Duan 2017; Sakr vd. 2021). İhtiyaç duyulan mekanik dayanımın sağlanması için çeşitli kimyasalların kullanımına başvurulmaktadır ancak kimyasal kullanımının toksik veya bağışıklık reddi doğuran etkileri olabildiği gibi ekonomik zorlukları da olabilmektedir. Gerek yapay doku imali gerek bir hastalık modeli oluşturulması gerekse rejeneratif doku mühendisliği çalışmalarının karşılaştığı bir diğer zorluk hücrelerin doğal fenotiplerini sergilemelerini sağlamak ve dönüşümlerini fonksiyonel bir doku oluşturacak şekilde yönetmektir (Huang 2021; Osidak vd. 2021; R Ibañez vd. 2021). Bununla birlikte doku ürünlerinin nihai kullanımdan önce steril edilmesi için uygulanan prosedürlerin çeşitli laboratuvar altyapısı ve işletme maliyetleri getirmesi de yaygınlığın sağlanmasının önündeki problemlerden birisidir.

Literatürde kullanılan mikro yapı benzetim metotları ile çeşitli hedeflere ulaşılabilmektedir. Örneğin elektro eğirme metodu ile nano ölçekte fibril imali başarılabilmek ve 3D baskı yöntemi ile çeşitli mikro mimari yapılar tasarlandığı şekilde imal edilebilmiştir. Hücrelerin hassas şekilde konumlandırılabilmesi konusunda dielektroforez metodu başarıyla uygulanabilmiş, hücrelerin kısmen de olsa konumlarında tutulabilmesi için UV ışıkla jelleşen biyomateryaller kullanılmıştır. Doğal fenotip benzetiminin sağlanması için uygun sinyal moleküllerinin tespiti ve kullanımına başlanmıştır (Kalantar Motamedi vd. 2016; Khalili vd. 2021). Fakat bu metotlar tek başlarına temel benzetim problemlerinin ancak bazılarını çözebilmektedir. Elektro eğirme metodu mekanik dayanım ve farklı mimari yapıların benzetiminde yetersiz kalırken, 3D baskı metotları da hücresel boyutta fibril yapılar inşa edilmesinde yetersiz kalmaktadır. Her iki metot da diğer metotlarda olduğu gibi hücrelerin canlı tutulması için kullanılan hidrojenlerin eklenmesiyle mekanik dayanım kaybı ve mikro yapının bozulması problemleri yaşanmaktadır (Jammalamadaka ve Tappa 2018). Bu ve benzeri sebeplerle, örneğin UV ışıkla kütleme ve 3D baskı metodu gibi kuvvetli yönleri birleştirilebilecek metotların birlikte kullanımını öneren çalışmalar yürütülmektedir (Bishop vd. 2017; Zheng vd. 2021).

Doku benzeri yapılar oluşturulurken hücreler ve hücreler arası matriksdeki (ECM) unsurlar ile bağ kurduğu bilinen materyaller tercih edilmektedir. Bunlar; proteinler, glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar ile yapısal bağları yıkım ile regüle eden matris metaloproteinazlar gibi malzemelerdir. Bununla birlikte hücreleri çoğalmak üzere uyaran ve dönüşümlerini tetikleyen büyüme faktörleri de doku mühendisliği için önemli materyallerdir (Rnjak-Kovacina vd. 2018).

Hücreler canlılıkları süresince bulundukları ortamı fonksiyonel şekilde inşa etmek üzere göç edip çoğalarak hücre hatları oluşturmakta ve gerektiğinde diğer hücre tiplerine dönüşmektedirler (Chang ve Wang 2011). Hücre duvarında bulunan özelleşmiş moleküller bu süreçte gerek hücreler arasında gerekse ECM molekülleri ile hücreler arasında bağ kurarak fiziki bir ağ oluşmasında önemli rol almaktadırlar. Bu hücre adezyon molekülleri doku ve hücre tipine göre çeşitlilik gösterse de kaderin, integrin, fibronektin, laminin ve dekorin gibi yaygın bulunanları da vardır (Frantz vd. 2010; Zhang vd. 2020).

Hücreler arası matriksdeki yapısal moleküllerden bazıları da kolajen proteinleridir. Kolajen proteinleri çeşitli hücreler, diğer bazı kolajen tipleri ve çeşitli moleküller (integrin, fibronektin vb.) için uygun bağlanma bölgelerine (protein domain) sahiptir. Kolajen proteinlerinin günümüzde bilinen 28 tipi vardır. Özellikle fibril formdaki tiplerinin mekanik dayanımları yüksektir (Karsdal 2019). Bu özellikleri ve çeşitlilikleri kolajenleri hem omurgalı hem de omurgasız canlılarda yaygın bulunan bir protein ailesi kılmıştır. Kolajenlerin çeşitli dokulardaki farklı oranlardaki varlıkları o dokudaki faaliyetlerin uygun şekilde yerine getirilebilmesinde önemli role sahiptir. Bu özellikleri sebebi ile kolajenler doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan materyallerdendir (Radhakrishnan vd. 2020; Gurumurthy ve Janorkar 2021; Rico-Llanos vd. 2021).

Canlılardaki doku çeşitliliği, bağışıklık sistemi cevapları ve türün bireyleri arasındaki anatomik farklılıklar doku mühendisliği ürünlerinin diğer endüstriyel ürünler gibi aynı formda çok sayıda üretilmesine ve bu sayede kazanılan maliyet düşüşü

imkânından faydalanılmasına imkân tanımamaktadır. Yatırım maliyeti yüksek tedavilerin farklı ekonomik güçlere sahip bireylerden oluşan geniş kitlelere eşit şekilde ulaştırılabilmesi ise önemli bir ihtiyaçtır. Doku ve organ nakilleri de hem bu tip yüksek maliyetli tedaviler arasındadır hem de öncelikle doku/organ donörünün bulunmasına ihtiyaç vardır. Bu sebeplerle, yapay doku ürünlerinin yaygın şekilde üretilmesi ve bunun mümkün olan en az yatırım ile yapılabilmesi stratejik öneme sahiptir.

Bu tez çalışmasında yumuşak dokular için kolajen temelli doku iskelelerinin yaygın üretimini desteklemek üzere sterilizasyon yatırımının azaltılmasına imkân tanıyan bir üretim tekniği geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada üretimden sonra sterilizasyona ihtiyaç duyulmaması için doku iskelesinin oluşturulacağı ortam kolajen çözeltisi ile dolu, kapalı ve steril bir hacim olarak tasarlanmıştır. Kolajen partiküllerinin temas edilmeksizin tasarlanan konuma getirilebilmesi için elektrik alan etkisi kullanılması planlanmıştır.

Elektrik alan şiddetinin her noktada aynı olmadığı bir ortam, elektronların belli bir bölgede bulunma olasılığını arttırarak, nötr kabul edilen bir partikülün elektron ve protonlarının dağılımında bir dengesizlik yaratabilir. Böylece partikülün bir tarafı elektronca zengin, diğer tarafı aynı derecede protonca zengin durumda gözlenebilir. Bu durum dipol oluşumu olarak adlandırılır (Jones 2003). Dipoller iki veya daha fazla kutba sahip olabilirler. Bu kutuplara etkiyen elektrostatik kuvvetler partikülü bir iyonda olduğu gibi elektrik alanda hareket ettirir. Homojen olmayan elektrik alan etkisiyle gözlenen bu hareketliliğe dielektroforez (DEP) denir (Pohl 1958). Dielektroforetik kuvvetler, partikül (biyoteknoloji literatüründeki çalışmalarda özellikle hücreler) ile onu çevreleyen ortamın elektriksel geçirgenlik ve iletkenlik değerleri arasındaki farka göre partiküle farklı yönlerde etki eder (Çetin ve Li 2011). Dielektroforezin bu özelliğinden faydalanarak farklı hücre tiplerini ayırabilmek için seçici düzenekler tasarlanabilmiş, çeşitli analitik metotlar geliştirilebilmiştir (Zhang vd. 2019). Seçicilik için partiküllerin özel kimyasal işaretleyiciler ile işaretlenmesine gerek duyulmaz (Shim vd. 2013). Dielektroforetik etkinin yaratılabilmesi için elektrotların çözeltiye teması gerekmez ve böylece kapalı steril bir hacim içinde çalışmak mümkün olur. Bu nitelikleri ile DEP doku mühendisliği uygulamalarının hassas konumlandırma, doğal protein yapısının korunması ve kontaminasyondan uzak kalınması gibi ihtiyaçlarına çözüm sunma potansiyeli taşır (Pethig 2017). Bununla birlikte dielektroforezin doku benzetim metodu olarak kullanımı az karşılaşılan çalışmalardandır.

Bu tez çalışmasında özgün bir yaklaşımla, dielektroforezin literatürde sıklıkla karşılaşılan analitik amaçlı kullanımlarından farklı olarak, üretim amacıyla yapısal molekülleri organize etmek için kullanımı önerilmiştir. Araştırmanın temel motivasyonu dielektroforezin partikülleri temas etmeksizin hareket ettirme yeteneğinin kapalı steril bir hacimde imalata imkân tanınması ve böylece yaygınlığın sağlanabilmesi potansiyelidir. Çalışmanın hipotezi ise elektrik alan uygulayacak elektrotların dielektrik dayanım limiti aşılmadan yüksek elektrik alan şiddeti sağlanarak sıvı çözeltiler içindeki ~100 µm boyutundaki biyomateryal partiküllerinin hareketlerinin kontrol edilmesinin mümkün olabileceğidir. Bu amaçla DEP etkisinin yüksek potansiyel fark kullanılarak oluşturulmasını sağlayan bir düzenek geliştirilmiş ve doku iskelesi üretiminin bir başlangıcı olarak lokal konsantrasyon artışı sağlayacak şekilde kolajen partiküllerinin hareket ettirilmesi planlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Doku mühendisliği doku fonksiyonunu geri kazandıran, sürdüren ve geliştiren biyolojik yapılar geliştirilmesine yönelik mühendislik, malzeme bilimi ve biyoloji ilkelerini uygular (Macchiarini 2004). Bu kapsamda yapay doku ve organlar üretmek için geliştirilen metotlar var olan bir doku veya organın hücresizleştirilmesi (deselülarizasyon) yoluyla doku iskelesinin elde edilmesi ve biyomateryaller ve/veya biyoyumlu malzemeler ile yeni bir doku iskelesinin imal edilmesi olarak iki ana konseptte toplanabilir (Crapo vd. 2011; Vacanti ve Vacanti 2014).

Deselülarizasyon için yarı mamul olarak kullanılan organik materyal, organize olmuş doku veya organ seviyesindedir. Bu kaynağa ulaşmak için, ksenogreft veya allogreft donörüne ihtiyaç vardır (Saksena vd. 2016). Ksenogreft ve allogreft dokular, yapılarındaki hücrel antijenler konakçı dokuda enflamatuvar tepki veya immün sistem kaynaklı ret indüklediği için transplantasyon amacıyla doğrudan kullanılamazlar. Bununla birlikte, doku iskelesini oluşturan ECM bileşenlerinin transferlerinde türler arasındaki farklılık genellikle iyi tolere edilir (Gilbert vd. 2006). Söz konusu ECM materyallerini yapısal bütünlüğü koruyarak bir doku iskelesi halinde elde etmek amacıyla hücrel materyallerin ECM'nin kolajen, elastin, fibronektin gibi yapısal öğelerinden ayrıştırılmasını sağlayan çeşitli hücresizleştirme yöntemleri geliştirilmiştir (Gilbert vd. 2006). Bu yöntemler temelde hücre ve çekirdek zarlarının fiziksel veya kimyasal etkiler ile parçalanması ve açığa çıkan materyalin kimyasallar aracılığı ile ECM'den uzaklaştırılmasına dayanır. Böylece deselülarizasyon metodu dokunun doğal mimari yapısını ve mekanik açıdan dayanıklı biyomateryalleri kullanarak hem mekanik dayanım hem de biyoyumluluk problemlerini azaltabilmiştir (Gilbert vd. 2006; Crapo vd. 2011). Fakat, hücresizleştirme işlemi için kullanılan prosesler dokuyu canlı hücrelerden arındırabilse de DNA, RNA vb. genetik materyaller gibi immün yanıtı tetikleyici unsurların kalıntıları bağışıklık sistemi tepkisine sebep olabilmektedir (Hasan 2017).

Deselülarizasyon metodu fonksiyonel morfolojik bir yapıyı taklit etme zorluğunu doku iskelesini yüksek oranda koruyarak aşabilse de vakaya özel, tam uyuma sahip yapıların tasarlanamaması metodun temel limitini teşkil eder. Bu sebeple donör dokuların yapısal bütünlüğünün korunmadığı ve elde edilecek ürünün doku iskelesi imal materyali olarak kullanılmasının amaçlandığı hücresizleştirme yöntemleri de geliştirilmiştir (Gilbert vd. 2006; Crapo vd. 2011).

Doku iskelesinin imal edilmesi amacıyla yürütülen faaliyetler temelde sırasıyla, organik ya da inorganik biyoyumlu malzemelerin çeşitli metotlarla belirli geometrik ve fiziksel formlara getirilmesi, steril edilmesi ve hücre uygulanması söz konusu ise, otogreft, allogreft ya da ksenogreft hücreler ile donatılması aşamalarından oluşur (Mironov vd. 2003; Tabata 2009; Khademhosseini ve Langer 2016). Ardından biyoreaktör ve/veya *in vivo* inkübasyon uygulamaları da kullanılan teknikler arasındadır (Martin vd. 2004). Bu ve benzeri proseslerden geçerek oluşturulan ürünler doku mühendisliği ürünü olarak kabul edilmektedir (Williams 2017). Öte yandan, bir donörden alınan doku/organın doğrudan kullanılması doku mühendisliği değil doku transferi kapsamında ele alınmaktadır (Shieh ve Vacanti 2005; Zurina vd. 2020) (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımlarının genel işleyişi

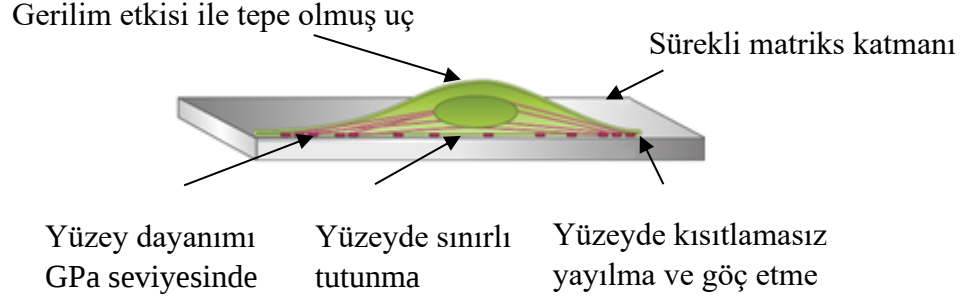
KONSEPT	Doku/Organın hücrelerden arındırılması	Doku/Organ iskelesinin imal edilmesi						
MATERYAL	Ksenogreft/ Allogreft/ Ototgreft doku veya organ	Biyomateryaller ve biyouyumlu materyaller (Kolajen, elastin, hiyalüronik asit, ipek, kitosan, büyüme faktörleri, hücreler ve PEG, PLA, PU vb.)						
METOT	Dondurma, basınç uygulama, kimyasallar, enzimler ve antibiyotikler ile hücresizleştirme	Dondurarak kurutma	3D baskı/ mikro enjeksiyon	Işıklı kütleme	Elektroeğirme	Gözenekli döküm	Elektroforez	Dielektroforez
ÜRÜNÜN YAPISI	Dokunun doğal form ve geometrisinde/ kısmen denatüre ya da ECM kompozisyonu çözeltisi formunda*	Süngerimsi yapı/ toz form	Jel/ katılaşmış jel	Katılaşmış jel	Fibril yapı	Boyut kontrollü gözenekli yapı	Fibril yapı	Elektrot tasarımına uygun dağılımda hücre yerleşimi
DİĞER AŞAMALAR	Sterilizasyon							
	Hücre ekimi							
	Biyoreaktör ya da <i>in vivo</i> inkübasyon aşaması							
	Karakterizasyon ve fonksiyon testleri							
	Doku/organ transferi							
* Hücresizleştirilmiş ECM kompozisyonu formundaki ürün doku iskelesi üretim metotları için hammadde olarak kullanılmaktadır.								

2.2. Hücreler Arası Matriks ve Doku Mühendisliği İlişkisi

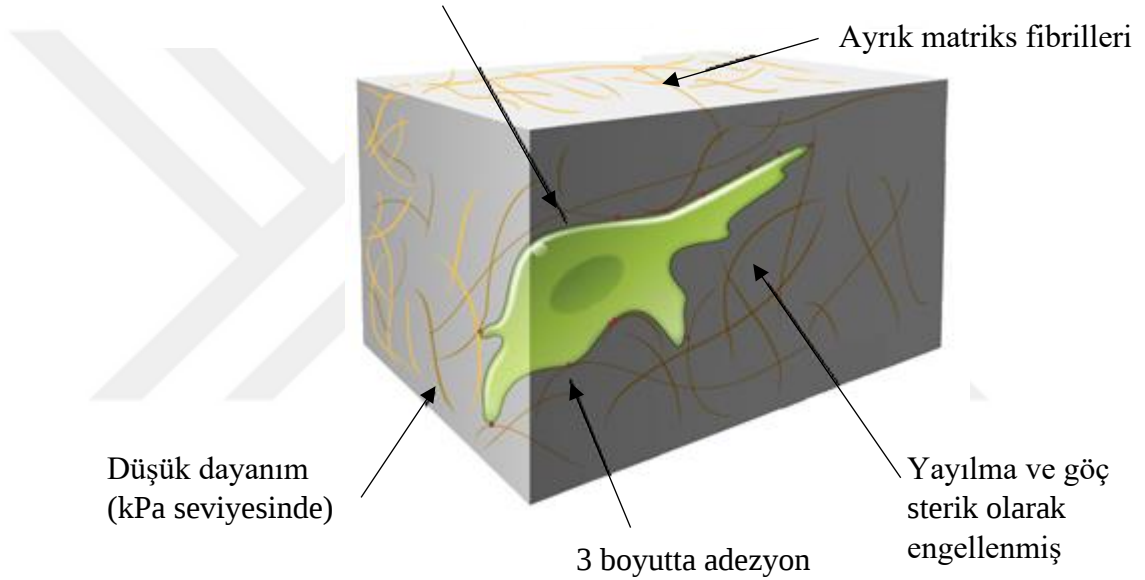
Doku iskelelerinin mikro mimarisi, biyofiziksel etkileşimler aracılığı ile *in vivo* hücre biyoaktivitesinde etkilidir (Duval vd. 2017). Bu sebeple biyobenzetim çalışmaları, hedef dokuya özgü histomorfolojik ECM mikro mimarisi dikkate alınarak imal edilmektedir (Şekil 2.1.). Örneğin morfolojik yapıyı belirleyen histolojik öğelerden biri olan kolajen fiberleri tendon dokusunda paralel, kortikal kemik dokusunda dairesel ve korneada hegzagonal dizilim sergileyen yapıdadır. Hücreler de bu yapıya uygun formda varlık gösterirler. Kondrositler kıkırdak dokunun derin bölgelerinde küresel formda iken yüzeyde ve kenar bölgelerde eklem yüzeyine teğet paketlenmiş yoğun kolajen tip-2 ağı sebebi ile yassı ve elipsoit formdadırlar (Duval vd. 2017; Maher vd. 2021). Biyobenzetim çalışmalarında imal edilen mikro yapı boyutları hedef dokuya özgü hücre boyutları ile ilişkilidir. Kemik dokudaki osteoblastlar için 150 ila 710 µm arasında geniş bir aralığa sahip gözenekli yapı uygun olabilirken kıkırdak dokudaki kondrositler için 250-500 µm aralığı uygun olarak bildirilmiştir (Crane vd. 1995; Lien vd. 2009). Epitel hücre katmanı bulunduran deri, mide ve bağırsak dokuları ile endotel hücre katmanı bulunduran kalp, damar ve lenf damarlarının biyobenzetiminde sıkı örüntüye sahip, tek katmanlı (2 boyutlu) yüzeylerin elde edilmesi için ise osteoblast ve kondrositlerin aksine sıkı ve daha homojen doku iskelelerine ihtiyaç vardır. Hücrelere sağlanan ortamın geometrik yapısının yanında ortamı oluşturan moleküllerin de hücre davranışı ve fenotipi üzerinde etkisi bulunmaktadır. Örneğin bağ dokunun bazal membran yapısında sık gözlenen kolajen tip-IV'ün $\alpha 3$ zincirinden, bir proteaz (proteinlerin yıkımından sorumlu enzim ailesi) olan MMP-9 (matriks metalloproteinaz 9) aracılığı ile ayrılan bir fragment olan tumstatin'in antianjiogenik (yeni damar oluşumunu baskılayıcı) etki gösterdiği ve yüzeye dik yöndeki endotel gelişimini baskılayıp yatay yönde yayılımı destekleyerek 2D membran oluşumuna yönlendirdiği bildirilmiştir (Sudhakar vd. 2003; Nielsen vd. 2018; Karsdal 2019). Benzer etki karaciğer dokusunda sık gözlenen kolajen tip-XVIII'in $\alpha 1$ fragmenti olan endostatin ile de gözlenmiştir (Ranjit vd. 2012) Endotel hücrelerin doku iskelesindeki yapısal yerleşimlerinin ECM materyalleri ve onlar arasındaki etkileşimler ile oluşan ürünler aracılığı ile belirlenmesinde olduğu gibi çeşitli dokularda da benzer süreçler gözlemlendiği bildirilmiştir (Karsdal 2019).

In vivo koşullarda, ECM yapısını oluşturan moleküller hücrelerin genetik güdümeleri ve çevreden aldıkları sinyaller doğrultusunda sürekli yapılır ve yıkılır. Böylece ECM ortamındaki proteinler, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, büyüme faktörleri, proteazlar vb. moleküllerin farklı tip ve oranları dokulara özgü bir yapı oluşturur. Oluşan dış çevre, fiziksel ve kimyasal özellikleri ile hücrelerin gelişim ve dönüşüm mekanizmalarınca algılanarak süreç devam eder (Bosman ve Stamenkovic 2003; Hassan vd. 2019). Adezyonun sağlanamaması çoğunlukla programlı hücre ölümü (apoptosis) ile sonuçlandığı için doku mühendisliği uygulamalarında öncelikle adezyon koşullarının sağlanması gerekir (Santini vd. 2000; Su vd. 2005). Adezyonla bağlanılacak yüzey, başka bir hücre duvarı ya da hücre adezyon moleküllerinin bağlanabileceği ligantları bulunduran bir molekül olabilir. Çeşitli dokuların ve dokular arası bağların oluşumunda rol alan en yaygın protein ailelerinden birisi kolajenlerdir.

Kolajen kaplı cam (2D) /Çözünürlük gradyanı yok



Kolajen jel (3D) /Çözünürlük gradyanı var



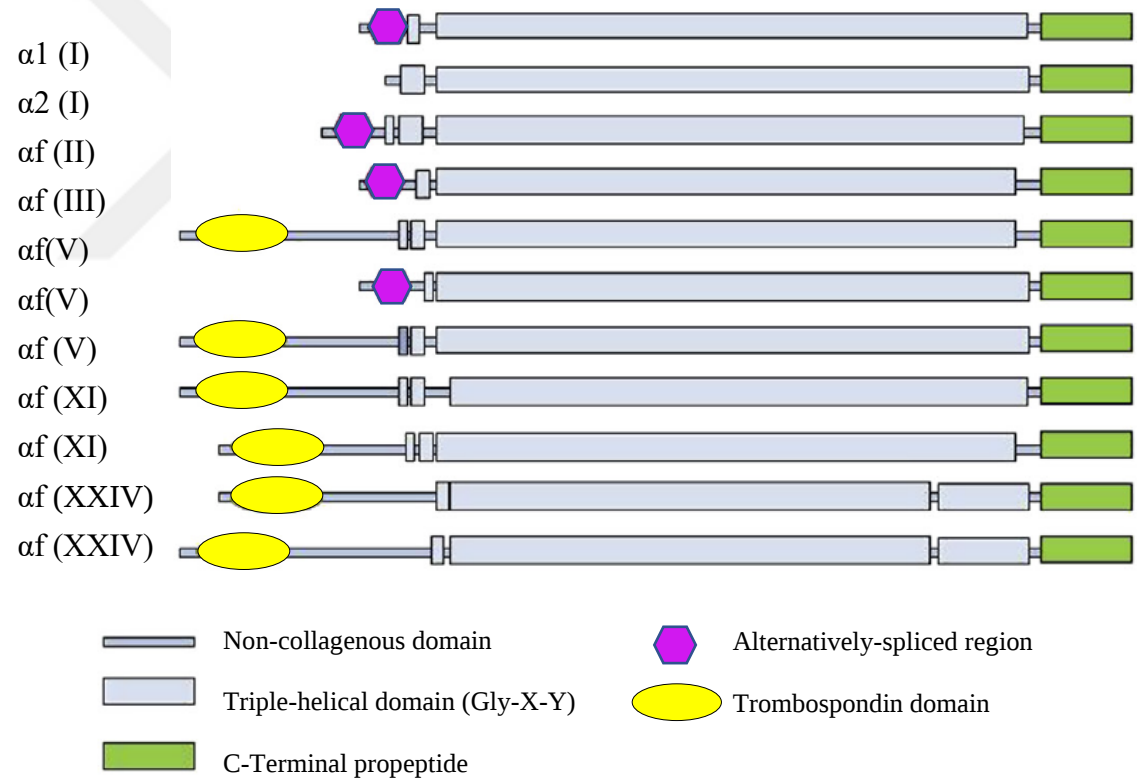
Şekil 2.1. 2 ve 3 boyutlu mikro ortamlardaki hücrelerin, etkiyen mekanik kuvvetler ve kimyasal farklılıklar nedeniyle çevreleri ile farklı şekilde etkileşimleri (Duval vd. 2017)

2.3. Kolajen Proteinleri ve Yapıları

Kolajenler üç polipeptit zincirinin birleşmesiyle oluşan heliks yapılı domainlerden meydana gelen proteinlerdir ve yapılarında en az bir domain bulunur (Şekil 2.2, Şekil 2.3.) (Ricard-Blum 2011; Karsdal 2019). Domainleri oluşturan aminoasit dizilimleri moleküler bağ bölgelerini özelleştirerek gelişecek üst yapıları (supramoleküler yapı) çeşitlendirirler (Şekil 2.4.). Bilinen kolajen tiplerinin bu üst yapıya göre sınıflandırılması ile kolajenler; fibril yapılı, fibril benzeri kesintili yapılı, ağ yapılı, boncuklu yapılı ve çapa yapılı kolajenler gibi adlarla isimlendirilmişlerdir (Karsdal 2019). Kolajen proteinlerinin oluşturduğu supramoleküler yapılar dokuların mekanik dayanım, elastiklik, mekanik ve optik geçirgenliği gibi çeşitli kendilerine has fiziksel özelliklerinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Bu özellikler dokuların fonksiyonel niteliklerini sergilemelerinin temelini oluşturur (Linsenmayer 1991). Örneğin korneada

bulunan kolajen tip-VIII çapraz bağlar kurduğunda altıgen kafes formunda yapılar oluşturur. Kolajen tip-VIII'in UV-A ışık etkisi ve riboflavin (B-2 vitamini) varlığı ile çapraz bağ oluşumu sergileyebildiği bilinmektedir (Sylvestre 2017; Karsdal 2019). Bu özellik, keratakonus olarak bilinen ve çapraz bağ azlığı sonucunda korneada konikleşme ile karakterize bir hastalığın tedavisinde korneanın optik özelliklerinin görme için tekrar uygun hale getirilmesinde kullanılmaktadır (Spoerl vd. 1998). Bir diğer durumda fibril formda olmayan kolajen tip XIII'ün periost (kemik zarı) ve kıkırdakta aşırı miktarda üretilmesi osteoblastların farklılaşma kapasitesini destekleyerek aşırı kemik büyümesine sebep olmaktadır. Kolajen XIII'ün normalden az olması ise nöromusküler bağlantılarda (sinir-kas bağlantısı) pre-sinaptik ve post-sinaptik özelleşmenin olgunlaşmasını olumsuz etkiler (Latvanlehto vd. 2010). Membran kolajenleri alt grubuna ait olan kolajen tip-XXV ise beyin nöronlarında sık eksprese edildiği gözlenen bir kolajen tipidir. Kolajen tip-XXV'i oluşturan alfa-1 polipeptit zincirinin bölünmesi halinde Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülen çözünür bir kolajen benzeri amiloidojenik bileşen (CLAC) salabildiği bildirilmiştir (Hashimoto vd. 2002; Osada vd. 2005; Tong vd. 2010; Karsdal 2019).

Fibril-Forming Collagens



Şekil 2.2. Fibril formu kolajenlerin fonksiyonel alanlarının tasvirini de içeren şematik birincil yapısı (Karsdal 2019)

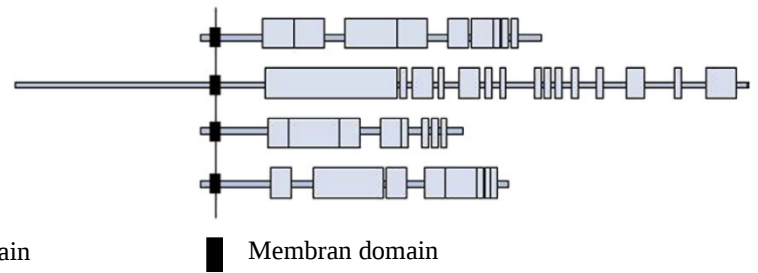
Membrane Collagens $\alpha 1$ (III) $\alpha 1$ (XVIII) $\alpha 1$ (XXIII) $\alpha 1$ (XXV)

— Non-collagenous domain

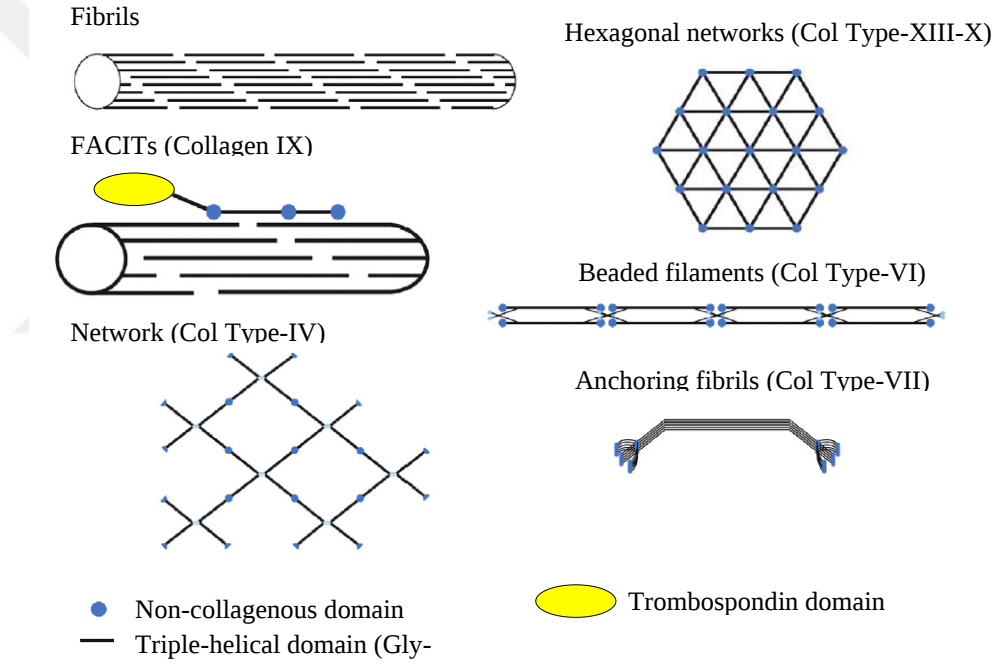
■ Triple-helical domain (Gly-X-Y)

Intra-Cellular

Extra-Cellular



Şekil 2.3. Membran kolajenlerinin fonksiyonel alanlarının tasvirini de içeren şematik birincil yapısı (Karsdal 2019)



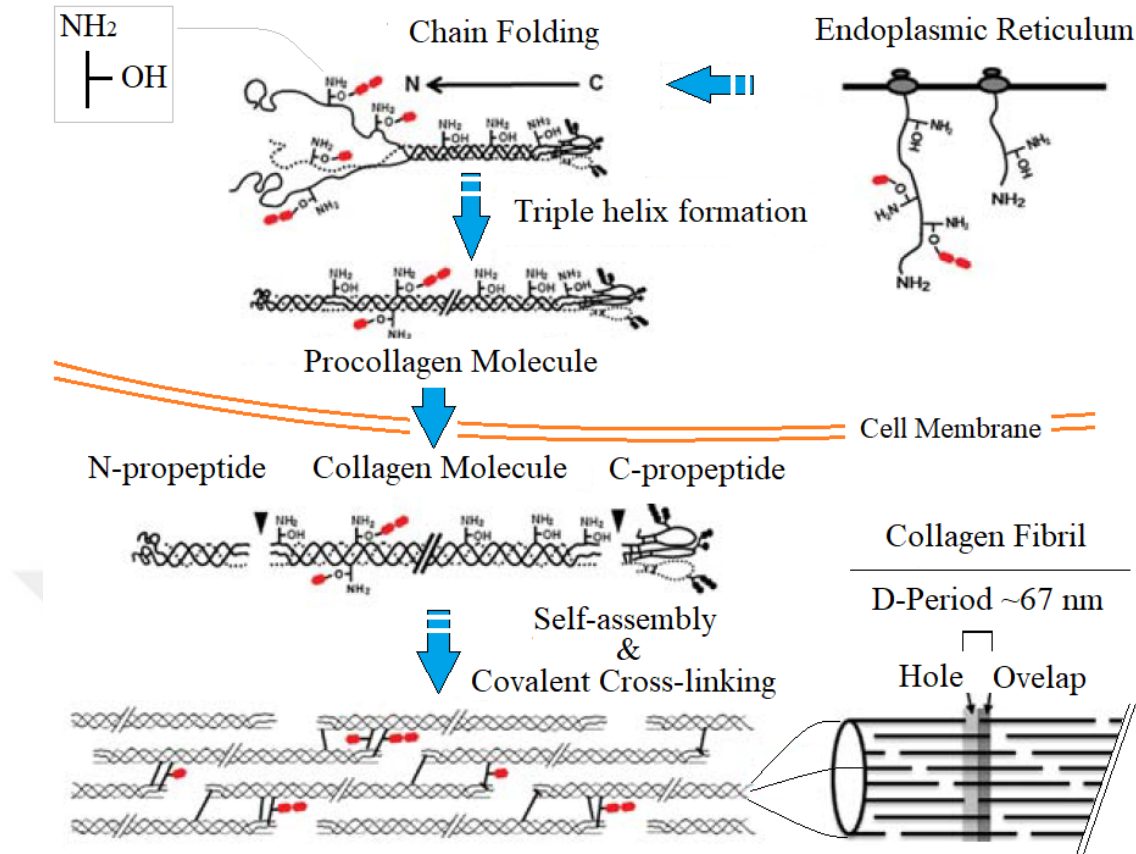
Şekil 2.4. Kolajenlerin oluşturduğu üst yapıların şematik gösterimi (Karsdal 2019)

Omurgalı ve omurgasız canlılarda yaygın bulunan kolajenler insan vücudunda bulunan proteinlerin ~%30'unu ve vücut ağırlığının ~%6'sını oluşturmaktadır (Jackson vd. 1995; Nimni ve Harkness 2018; Salvatore vd. 2021). Kolajenler çeşitli dokularda farklı oranlarda bulunmakla birlikte (kuru deri dokusunun ~%70-80'i tip-1 ve tip-3, eklemdaki kıkırdak dokunun ~60'ı tip-2 vb.) vücuttaki kolajen miktarının yaklaşık %70'i tip-1'den oluşmaktadır (Gelse vd. 2003; Karsdal 2019; Salvatore vd. 2021). Tip-1 kolajen, fibronektin ve laminin gibi ligantlara özgü domainleri aracılığı ile ligantlara bağlanır. Söz konusu ligantların da transmembran protein olan integrin aracılığı ile hücre duvarına bağlanmasıyla adezyon gerçekleşir.

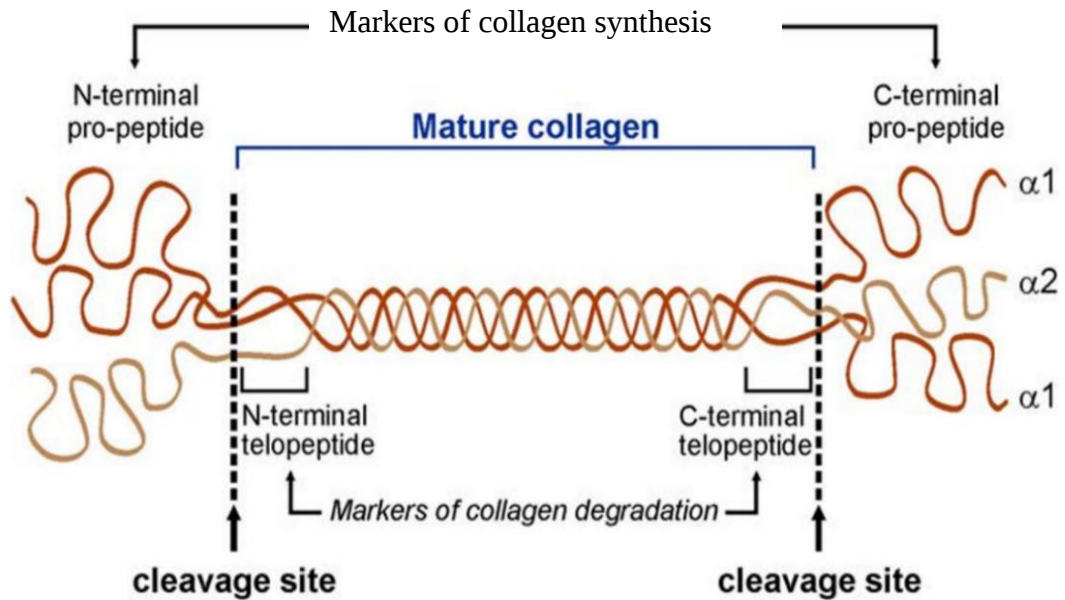
2.4. Kolajen Tip-1 Proteini Sentezi ve Yapısı

Kolajen tip-1 proteini, fibroblast, epitel, osteoblast, periodontal ligament hücreleri ve kondrositler gibi çeşitli dokulara özgü hücrelerce sentezlenebilmektedir (Bumann vd. 1997; Maione-Silva vd. 2019; Stipniece vd. 2021). Sentez süreci hücre içinde granüler endoplazmik retikulumu (ER) çevreleyen ribozomlarda başlar ve ECM'de tamamlanır (Agarwal 2016). Öncelikle her biri 1050 aminoasitten oluşan (Chan vd. 2020), ~95 kDa moleküler ağırlıkta, preprokolajen olarak da anılan sol heliks formda Coll α 1 ve Coll α 2 polipeptit zincirleri sentezlenir. İki Coll α 1 ve bir Coll α 2 zinciri bir uçta yaklaşarak ~100 Å uzunluktaki C-(Karboksil) propeptit terminalini oluşturur. Böylece Coll α 1 ve Coll α 2 polipeptit zincirleri birbirine sarılmaya başlayıp ~1.5 nm çap ve ~300 nm (3000 Å) uzunlukta, ~300 kDa moleküler ağırlığa sahip, moleküler kolajeni (tropokolajen) oluşturur (Karsdal 2019). Tropokolajen yapısının sonlandığı noktada kolajen yapısına ait olmayan N- (Amino) propeptit terminalinin (~150 Å) oluşması ile prokolajen tamamlanmış olur. C- ve N- propeptit terminalleri arasındaki tropokolajen, uçlarındaki heliks olmayan C- ve N- telopeptit bölgeleri ve aralarındaki üçlü heliks örgüden oluşur. Heliks bölge peptit bağları, hidrojen bağları, zincirler arası çapraz bağlar ve disülfid bağları ile mekanik ve termal etkilere karşı stabil hale gelir. Ardından prokolajen, golgi yığınları aracılığı ile ER'den eksositoz veziküllerine taşınıp ECM'ye transfer edilir. Transfer sırasında ve transferden sonra prokolajenin uçlarındaki C- ve N- propeptitler C- ve N- proteinazlar aracılığı ile kopar ve geriye moleküler kolajen (tropokolajen) proteini kalır. Propeptitlerin prokolajenden ayrılması tropokolajeni ve özellikle uçlarındaki C- ve N- telomerleri fibril yapı oluşturmak için kovalent çapraz bağ yapmaya uygun hale getirir. Bu aşamada özellikle C- propeptitin ayrılması önemlidir, aksi taktirde fibril oluşmaz. N-propeptit ayrılmaz ise sorunlu fibril oluşumu gözlenir. Sentezin bu aşamasından sonra, kolajen lizil oksidaz etkisi ile fibril ve ardından fiber formuna gelerek yapısal olgunluğa ulaşır (Agarwal 2016). Fibril ve fiber yapıların boyutları canlıların türü ve bulundukları dokulara göre çeşitlilik göstermektedir. Fibril yapılar nanometre mertebesinde çapa ve mikrometre mertebesinde uzunlukta gözlenirken fiber yapılar mikrometre mertebesinde çap ve mm mertebesinde uzunluklarda gözlenmektedir (Agarwal 2016).

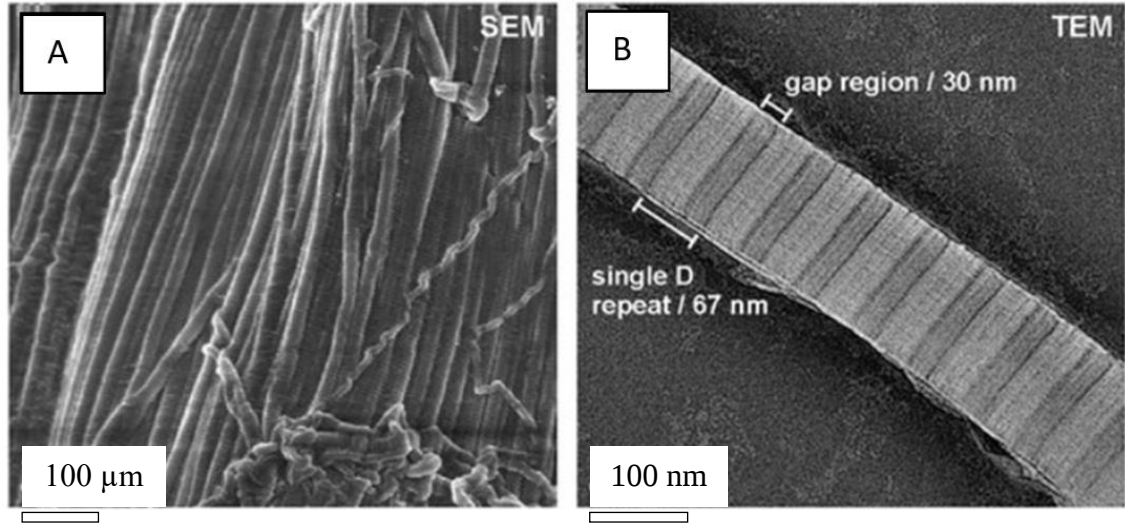
Tip-1 de dahil olmak üzere kolajenler tekrar eden (Gly-X-Y)_n amino asit dizilimi ile karakterizedir. Literatürde Gly kısaltması glisin'i X ve Y simgeleri ise çoğunlukla prolin (Pro) ve hidroksiprolin (Hyp) amino asitlerini temsil etmektedir. Gly-Pro-Hyp amino asit sekansı %12, Gly-Pro-Y ve Gly-X-Hyp amino asit sekansları %44 ve Gly-X-Y amino asit sekansı da %44 sıklıkla karşılaşılan sekanslar olarak bildirilmiştir (Ramshaw vd. 1998; Maher vd. 2021). Bu sekanslarda sıkça yer alan hidroksiprolinin sıcaklığa karşı hassas olan kolajen yapısının memelilerdeki vücut sıcaklığında da stabil kalmasında önemli rolü bulunmaktadır (Maher vd. 2021). Fibril yapıları kolajenlerin heliks formu, diğer proteinlerde karşılaşılmadığı kadar çok sayıda prolin ve hidroksiprolinin bir tekrar yapısı içinde bulunmasına ve geliştirdikleri çapraz bağlara bağlıdır (Agarwal 2016; Karsdal 2019). Kolajenler fibril oluşumuna katıldıklarında aralarında gelişen çapraz bağlar etkisi ile eksenleri paralel ve belli ölçüde ötelenmiş şekilde yan yana dizilim sergilerler. Böylece ~37 nm (0.6D) boyunda üst üste gelme bölgeleri ve zincirin uç noktalarındaki N- ve C- terminal bölgelerinin karşılaştığı bölgelerde de ~30 nm (0.4D) boşluk gelişerek toplamda 67 nm (D) boyunda, tekrar eden, desenler meydana gelir. Bu desen "D Banding" ya da "D Period" olarak isimlendirilir ve fibril formdaki kolajenlerin ayırt edici özelliklerinden birisidir (Bozec vd. 2007) (Şekil 2.5, Şekil 2.6, Şekil 2.7.).



Şekil 2.5. Kolajen tip-1 proteininin sentez ve fibril form oluşturma süreci (Scott vd. 2012)



Şekil 2.6. Kolajen yapısal bölgelerinin isimlendirilmesi (Fan vd. 2012)



Şekil 2.7. a) Kolajen tip-1 fibrillerinin SEM görüntüsü, **b)** Kolajen tip-1'in D-Banding yapısını gösteren TEM görüntüsü (Greiner vd. 2019)

Canlılardaki mekanik dayanımı en yüksek organik moleküllerden birisi olan kolajen tip-1 proteininin farklı organizasyon seviyelerindeki formlarının elastisite modülleri çeşitli yöntemler ile tespit edilmiştir (Miyata vd. 1992). Lorenzo ve Caffarena (2005) kolajen benzeri $(\text{Gly-X-Y})_n$ dizilimi sergileyen bir peptit dizilimi üzerinde gerçekleştirdikleri “Yönlendirilmiş Moleküler Dinamik” (Steered molecular dynamics, SMD)¹ simülasyonu ile tropokolajenin elastisite modülünü 4.8 ± 1 GPa olarak hesaplamışlardır (Lorenzo ve Caffarena 2005). İn’t Veld ve Stevens (2008) de benzer şekilde kolajen tip-3’e ait bir peptit dizilimi üzerindeki simülasyonlarında tropokolajenin elastisite modülünü 6.1 GPa olarak hesaplamışlardır (in’t Veld ve Stevens 2008). Rijs vd. sığır aşil tendonundan elde ettikleri 100-500 nm çap aralığındaki kolajen tip-1 fibrillerinin elastisite modüllerini AFM kullanarak 5 ± 2 GPa olarak ölçmüşlerdir (Van Der Rijs vd. 2006). Wenger vd. (2007) benzer metotla rat kuyruğundan elde ettikleri 50-200 nm çap aralığındaki kolajen tip-1 fibrillerinin elastisite modüllerini 5-11 GPa aralığında ölçmüşlerdir. Fiber yapının moleküler yapıdan daha yüksek dayanıma sahip olabilmesi fiberi oluşturan moleküler kolajenler arasında her birinin kırılma değeri ~ 400 pN değerinde olan olgunlaşmış çapraz bağların gelişmesine bağlıdır (Gutsmann vd. 2004). Çapraz bağ oluşum süreci *in vivo* koşullarda lizil oksidaz varlığında gerçekleşir. Kolajen fibril ve fiberlerine etkileyen kuvvetin tekrar sayısı, beslenme, yaş, cinsiyet, maruz kalınan ışık miktarı ve genetik faktörler gibi çeşitli etkiler de bağ oluşum sürecinde etkilidir (Carver vd. 1991). *In vitro* biyobenzetim çalışmalarında ise çapraz bağ oluşumu glutaraldehit, kolin bitartarat, glioksal, genipin gibi kimyasallar ve dehidrotermal işlem ve UV ışık uygulamaları gibi fiziksel metotlar ile sağlanmaktadır (Adamiak ve Sionkowska 2020; Dasgupta vd. 2021).

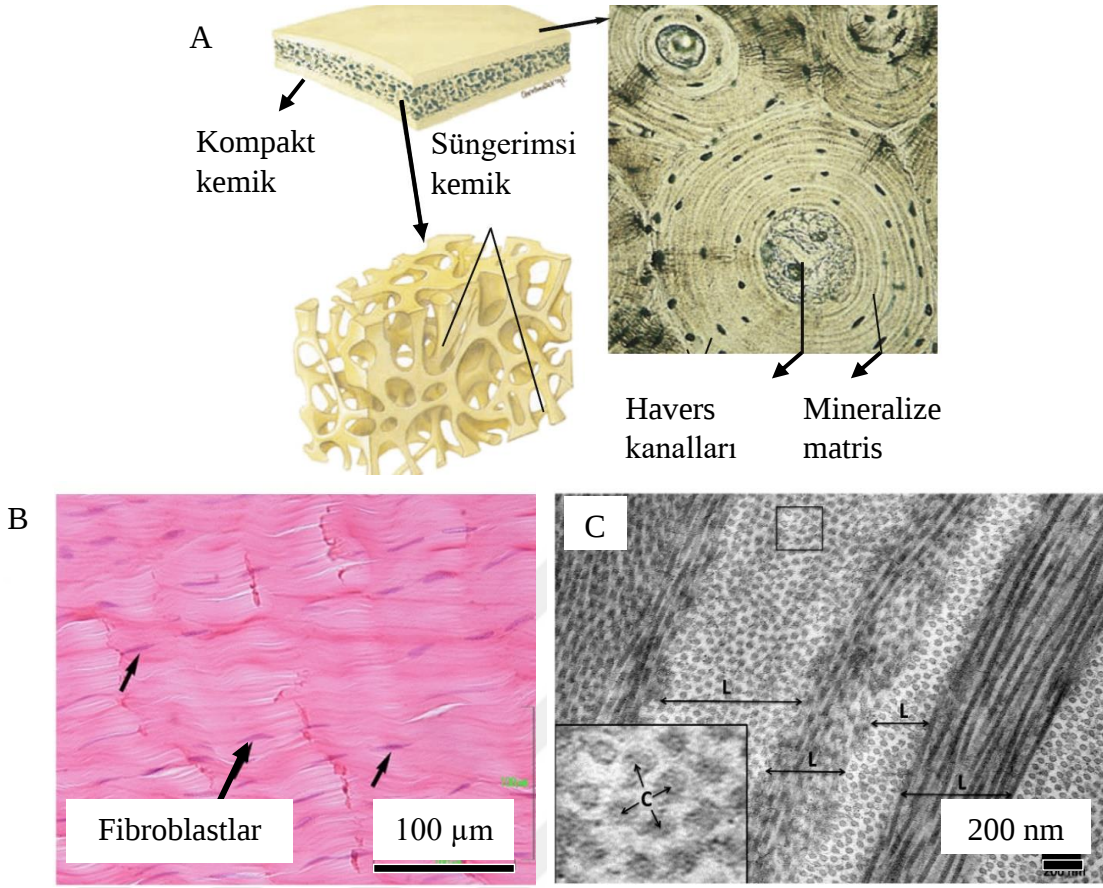
¹ SMD : Proteinlerin atomik düzeyde moleküler dinamik (MD) simülasyonları hem proteinlerin davranışını hem de hastalık süreçleri için hücre sinyalleşmesinde yer alan protein-ligand etkileşimlerini karakterize etmek için kullanılan bir araçtır. Yönlendirilmiş moleküler dinamiğin (SMD) simülasyonu, MD simülasyonlarının özel bir türüdür. Bu teknikte dış kuvvetlere nasıl tepki verdiğini incelemek için bir moleküle veya proteine yönlü bir vektör uygulanır (Do vd. 2018).

Dokuların mekanik dayanımları ve optik özellikleri gibi çeşitli fiziksel özellikleri kolajen yapılarındaki çapraz bağlarla birlikte fibril yönlenmesi ve ağ konsantrasyonuna da bağlıdır. Fibril organizasyonları farklı dokulara etkiyen çeşitli kuvvet tiplerine cevap veren çeşitlilikte gelişmiştir. Bir doğrultuda etkiyen şiddetli çekme kuvvetleri altındaki tendonlarda paralel yönlenmiş, sıkı paket formunda kolajen fibrilleri gözlenirken, farklı yönlerden gelebilecek kuvvetlere esnek şekilde cevap veren deri dokusunda farklı doğrultularda yönlenmiş, tendonlara göre seyrek yapıda fibriller gözlenmektedir. Şeffaflığını kolajenlerin yönlenme özelliklerinden ve optimal hidrasyondan alan korneada ise fibriller hegzagonal doğrultularda uzanan formdadır (Cheng ve Pinsky 2013).

Dokulara özgü fibril organizasyonlarının oluşum mekanizmaları araştırılmakta olan bir alandır. Kemik dokuda gözlenen kolajen organizasyonu için öngörülen mekanizmalardan birisi kemik dokuda değişken yükleme koşulları altındaki kolajen proteininin, piezoelektrik özelliği etkisiyle elektrik alan oluşturması ve pozitif ve negatif potansiyel bölgelerine göç eden sırasıyla osteoklastlarca yıkım, osteoblastlarca da yapım sürecinin işletilmesi yoluyla kolajen katmanlarının organize edildiği yönündedir (Fukada ve Yasuda 1957; Cerrolaza vd. 2017). Çekme-basma kuvvetleri, hidrostatik basınç, elektriksel uyarı, ışık ve manyetik alan gibi dış fiziksel uyaranlara verilen hücre cevapları ve ECM organizasyonunun değiştirilmesi ilişkisinin bir benzeri akciğer epitel hücrelerinin hava akımının yarattığı basınç değişikliklerine ve elektrostatik koşullandırmalara verdiği tepki ile de gözlenmiştir (Karra vd. 2019; Hackett ve Osei 2021). Bu gibi etkileşim süreçleri biyobenzetim çalışmalarına örnek teşkil etmektedir. Böylece çeşitli doku iskelesi üretim teknikleri ve biyoreaktör tasarımları gerçekleştirilmektedir.

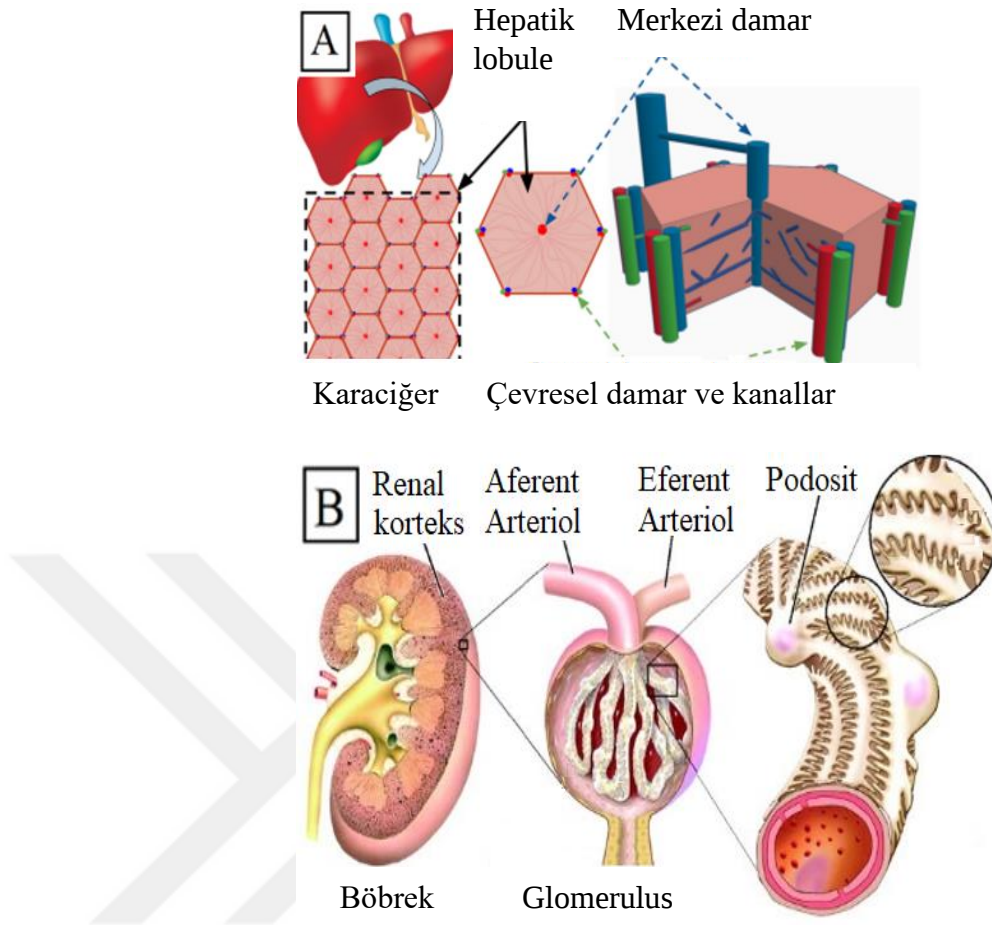
2.5. Doku İskelesi İmal Metotları

Dokuların fizyolojik ve mekanik özellikler açısından benzerlerini oluşturmak amacıyla geliştirilen metotlar hücrelerin adezyon, proliferasyon, göç ve dönüşüm süreçlerini yürütebilmeleri için öncelikle fiziki bir ortam sağlamaya yöneliktir (Koh ve Atala 2004). Benzetimi yapılmaya çalışılan mikro mimari yapılar, kortikal kemikteki gibi sıkı veya trabeküler kemikteki gibi süngerimsi ya da tendon, kas, deri, bağ doku ve kornea dokularındaki gibi çeşitli örüntü desenlerine sahip fibril formda olabilmektedir (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. a) Süngerimsi ve sıkı kemik doku (Gunson vd. 2013); **b)** Tendon dokusu (Franchi vd. 2007); **c)** Kornea stoma dokusunda kolajen fibrillerinin birbirine dik lameller halinde dizilimi (Abhari vd. 2018)

Ayrıca *in vivo* kullanımın yanı sıra ilaç araştırmalarında da kullanılmak üzere karaciğer, böbrek ve pankreas gibi organlarda bulunan özelleşmiş kompleks histomorfolojik yapılar da benzetimi yapılmaya çalışılan önemli öğelerdir (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. a) Karaciğer hepatosit organizasyonu (Lorente vd. 2020); **b)** Böbrek glomerulus yapısı (Tryggvason ve Wartiovaara 2005)

2.5.1. Dondurarak kurutma metodu

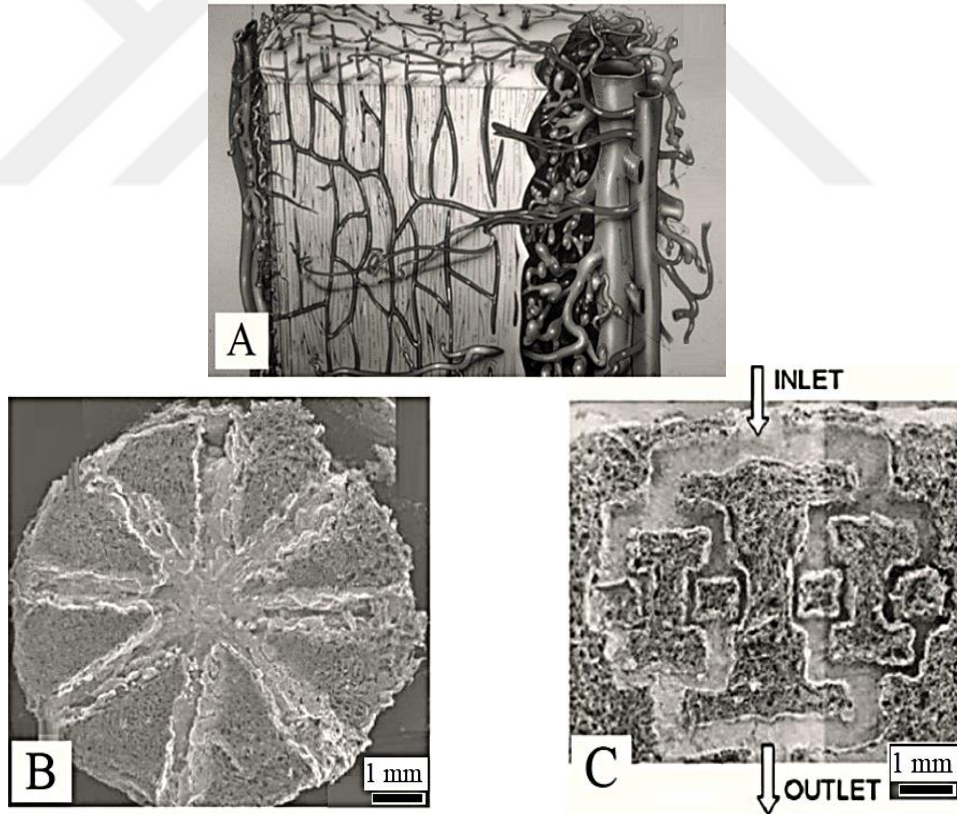
Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) metodu sıvıların organik materyallerden süblimleşme (katı maddelerin ısıtılırken sıvı hale geçmeden gaz hale geçmeleri) yöntemiyle uzaklaştırılmasını temel alır. Aşı ve ilaç gibi biyoteknoloji ürünleri ile gıdaların termal denatürasyona (doğal kimyasal yapının bozulması) uğramadan, soğutma ihtiyacı duyulmaksızın saklanması ve transferine imkân sağladığı için biyoteknoloji ve gıda endüstrilerince kullanılmakta olan bir metottur (Butreddy vd. 2021). Doku mühendisliği kapsamındaki ilk uygulama deri dokusu benzetimi amacıyla kullanımdır (Yannas vd. 1980; Yannas ve Burke 1980). Metodun dayandığı temel ilke gazların sıvılar içindeki çözünürlüğünün basınç azaldıkça azalmasıdır. Bu ilkeye göre sıvı çözelti içindeki çözünmüş gazlar vakum altında gaz fazına geçer ve çözeltide gaz boşlukları yaratır. Bu sırada vakumla birlikte uygulanan sıfırın altındaki sıcaklık etkisi ile çözelti, içindeki gaz boşluklarıyla birlikte donarak süngerimsi bir yapı kazanır. Sıcaklığın kademeli olarak oda sıcaklığına yükseltilmesi sırasında vakum etkisi ile yapıdaki sıvı faz ~%95 oranında süblimleştirilerek uzaklaştırılır. Donmuş halde kalan sıvının tam olarak

uzaklaştırılması için genellikle ısıyla son bir kurutma adımı uygulanır. Böylece kuru bir sünger formu elde edilir.

Doku mühendisliği uygulamalarında çözelti bileşenlerinin biyouyumlu olması, gözenek yapısının adezyon, proliferasyon, göç ve dönüşüm gibi hücresel faaliyetler için uygun özelliklerde olması ve yapının vücutta çözünme (biyodegradasyon) süresinin ayarlanabilmesi öncelikli hedeflerdir. Bu sebeple bu niteliklerin tasarlanabileceği metotlarla çalışılması tercih edilmektedir. Doğal dokusu hacimce ~%75-90 poroziteye sahip trabeküler kemik dokusunun benzetimi için dondurarak kurutma metodu kullanılması literatürde sık karşılaşılan çalışmalardandır (Basha vd. 2015; Fereshteh 2018; Kordjamshidi vd. 2019; Maher vd. 2021). Yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip trabeküler yapıdaki boşluklar hücreler ve metabolitler için hacim sağlarken büyük yüzey alanı da hücre tutunumu ve kalsiyum iyon transferi gibi metabolik faaliyetler için ara yüz olur (Andia vd. 2020). Bu sebeple gözenek boyutlarının uygun ölçüde olması ve gözenekler arası geçişlerin mümkün olması fizyolojik uyum için önemlidir. Bu amaçla dondurarak kurutma prosesinin vakum, sıcaklık, geçiş süreleri, çözelti içeriği ve ısı transferini etkileyen geometrik özellikler gibi temel parametreleri değiştirilerek farklı gözenek yapıları geliştirilmektedir (O'Brien vd. 2004; Maher vd. 2021). Elde edilen ürünlerde 100-500 µm gözenek boyutları ve %99'a ulaşan porozite oranlarına ulaşabilmektedir (Basha vd. 2015). İnsan trabeküler kemik dokularının literatürde rapor edilen 1-20 GPa aralığındaki elastisite modülü ve 7-10 MPa seviyesindeki bası dayanımına da büyük oranda yaklaşılabilmektedir (Rho vd. 1997; Fan vd. 2002; Zysset 2003; Wang vd. 2006; Basha vd. 2015; Wubneh vd. 2018; Yu vd. 2021). Abd-Khorsand vd. (2007) materyal olarak potasyum persülfat, asetik asit, akrilik asit, nano hidroksiapatit, titanyum dioksit ve kitosan kompozitini kullandıkları çalışmalarında 92-207 µm aralığında gözenek boyutu ve %55-78 aralığında porozite ile 3.1-6.7 MPa aralığında basma dayanımı ve 0.8-1.7 GPa aralığında elastisite modülü sağlayan ürünler elde etmişlerdir. Govindan vd. (2020) kolajenin ısıyla kısmi denatüre formu olan jelatini kullandıkları çalışmalarında 100-500 µm gözenek boyutuyla <%70 porozite oranına ulaşmış ve 4.86 MPa bası gerilmesi dayanımı elde etmişlerdir. Tebyanian vd. (2019) dondurarak kurutma metodu ile kolajen tip-1, β trikalsiyum fosfat (COL/β-TCP) ve çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit (0.5%) kullanarak hazırladıkları doku iskelesini tavşan kafatasının tepe bölgesinde açtıkları 8mm çaplı tam kafatası kalınlığındaki defektlere transfer etmişler ve iyileşme sürecinde gözlemişlerdir. Ekip, gözlemin 4. haftasında olgunlaşmamış kemik oluşumu, 8. haftasında ise yeni kemik ile defekt sınırının ayırt edilmesi zor olacak kadar entegre olduğunu bildirmiştir.

Doku iskeleleri, yara iyileşmesinin vücut tarafından sağlanamadığı büyüklüklerdeki defektlerin iyileştirilmesi dışında ilaç/teşhis/televi yöntemleri geliştirilmesi ve biyouyumluluk testleri gibi alanlarda kullanılması amacıyla doku modeli oluşturulmasında da kullanılmaktadır. Doku modelinin petri kabı ve flask gibi (2D) ortamlar yerine doku iskeleleri üzerinde oluşturulması, doku iskelesinin (3D) *in vitro* ortamda hücrelerle donatılmasını gerektirir. Bu çalışmalarda hücreler genellikle aynı zamanda kültür ortamları da olan hidrojel ile transfer edilirler. Dondurarak kurutma metodu ile üretilen yapıların steril edildikten sonra hücrelerle donatılması sırasında mikro

yapının, hücrelerin ve doku modelinin büyüklüğüne bağlı olarak hidrojel yapıya homojen penetrasyonu sınırlı seviyede kontrol edilebilmektedir. Bununla birlikte hücrelerin gerekli besin ve oksijene ulaşımı ile metabolik atıkların uzaklaştırılması için vaskülarizasyonun doğal ortama benzer sıklıkta sağlanabilmesi gerekmektedir. Ayrıca kortikal kemiğin 5 ml/dk/100gr ve süngerimsi kemiğin 20 ml/dk/100gr olarak ölçülen kanlanma ihtiyacı kemiğin farklı bölgelerinin değişik seviyelerde kan akımına ihtiyacı olduğu göstermektedir (McCarthy 2006). Kortikal kemikteki osteon yapılarının ortalama 200 μm çapta olması ise osteositlerin bir kılcal damardan ~100 μm den daha uzakta bulunmadığını göstermektedir. Gerek penetrasyon başarımı gerek vaskülarizasyon benzetiminin sağlanması gerekse dokulara özel formların oluşturulması gibi ihtiyaçlarla doku iskelesinin mimari yapısında mikro yapı dışında makro mimari unsurların da tasarlanmasına gerek duyulmuştur. Wahl vd. (2007) bu ihtiyacın karşılanmasına yönelik çalışmalarında vasküler yapı (makro yapı) benzetimi sağlamak için iç kalıp olarak kullanmak üzere katı serbest form fabrikasyon (solid freeform fabrication-SFF) metodu ile 3D bir yapı oluşturmuş ve çözelti içine yerleştirmişlerdir. Dondurarak kurutma işlemi uygulandıktan sonra iç kalıp uygun çözücü ile çözülüp uzaklaştırılarak en dar geçidi 135 μm olarak ölçülen Şekil 2.10. B ve C’de gösterilen yapılar elde edilmiştir (Wahl vd. 2007).



Şekil 2.10. a) Doğal kemik makro yapısı ve vaskülaritesi (McCarthy 2006); **b-c)** Dondurarak kurutma ve SFF metodlarının birlikte kullanımı ile elde edilen süngerimsi yapılar (Wahl vd. 2007)

Dondurarak kurutma metodu hücresiz doku iskeleleri ve hücreli doku materyalleri elde edilmesini sağlayarak doku mühendisliğinin sıklıkla kullanılan metotlarından olmuştur. Fakat yüksek oranda yönlendirilmiş sıkı fibrillerden oluşan tendon ve ligament gibi dokuların sünger yapılar ile benzetiminin yapılmasının güçlüğü ve üç boyutlu yapısı her katmanda farklı kalıp gerektirecek doku ve organların benzetimi için bu metodun uygulanmasının zorluğu gibi teknik limitler bulunmaktadır. Ayrıca -80°C sıcaklık ve mutlak vakum sağlayan dondurarak kurutma cihazlarının yüksek yatırım ve işletme maliyetleri de ekonomik limitler getirmektedir.

2.5.2. 3D baskı metotları

Benzetimi yapılmak istenen yapıyı oluşturacak malzemelerin mekanik transfer yöntemleri ile işleme alanında konum ve materyal tipi seçilerek biriktirildiği ya da işleme alanındaki materyallerin ışık enerjisi ile fiziksel ve kimyasal bağlar oluşturularak rijit forma getirildiği çalışmalar eklemeli imalat yöntemi olarak da bilinen üç boyutlu imalat yöntemlerini oluşturur. Biyomateryallerin genellikle viskoz akışkanlar olması transferin hassas dozlar ile yapılmasını zorlaştırmaktadır. Bu sebeple akışın sürekli olmasına dayalı uygulamalarda basınç etkisi ile mikroenjeksiyon uygulaması yeterli olabilirken $\sim 10\ \mu\text{m}$ den hassas ölçülerde transferinin hedeflendiği uygulamalarda piezoelektrik mikro valfler ve lazer etkisiyle mikro damlacıklar bırakan teknikler kullanılmaktadır (Lee vd. 2019; Zhang vd. 2021).

Üç boyutlu basım tekniklerinin sıklıkla karşılaştığı problemlerden birisi yumuşak hammaddelerin basım sırasında rijit durmayıp kayması ve boyut hassasiyetinin azalması ve hatta nihai formun hiç yakalanamamasıdır. Bu sorun genellikle ana yapının rijitliğinin sağlanması için UV ışıkla çapraz bağ oluşturulması, polimer kompozitler kullanılması, ya da ana yapının pH kontrollü hidrojel ile oluşturulması gibi yapıyı güçlendirici metotlar ve geçici destekler kullanılmasıyla çözülür. Geçici destekler için uzaklaştırma kolaylığı sağladıkları için genellikle hidrojellerden faydalanılmaktadır. Üretim açısından en çok serbestlik tanıyan uygulama tipi olan UV ışıkla çapraz bağlama için kullanılan foto polimerler ve çözücüler biyouyumluluk açısından şüpheli konumdadırlar. Lee vd. (2019) UV ışık yerine jelleşme kontrolünü pH değişimi ile sağladıkları bir çalışmada kolajenin jelleşme derecesini $\sim 20\ \mu\text{m}$ boyut hassasiyetiyle kontrol ederek neonatal boyutta insan kalbi yarı modelini basabilmişlerdir. Yapıdaki boşluklarda destek olması amacıyla jelatin kullanılan çalışmada damar yapısının benzetimi için CAD modele bir 3D Voronoi ağ modeli eklenmiş ve $\sim 100\ \mu\text{m}$ hassasiyetle basılabilmektedir (Lee vd. 2019). Jelleşme derecesinin anlık olarak ayarlanabilmesi yapının tam dolu ya da süngerimsi boşluklara sahip olacak şekilde imal edilmesine imkân sağlamış fakat çalışmada hücre ekimi uygulanmadığı için adezyon ve proliferasyon gibi biyouyumluluk göstergeleri rapor edilmemiştir. Öte yandan hücrelerin de 3D basım tekniği ile basılabildiği farklı çalışmalar rapor edilmiştir. Wilson Jr ve Boland (2003) hücre basımı için yüksek maliyetli cihazlar gerekmediğini göstermek için yürüttükleri çalışmalarında ofis kullanımı için geliştirilen bir yazıcıyı modifiye ederek sıgır aortundan elde edilen endotel ve düz kas hücrelerini bazal membran jeli olan Matrigel ve kolajen jel üzerine tasarlanan desende tek kat olarak (2D) basabilmişlerdir. Basımdan sonra hücrelerin %25'inin öldüğü gözlenmiş ve bunun olası sebeplerinden birisinin damla hacminin küçüklüğü sebebi ile çözeltideki suyun buharlaşması sonucu hücrelerin dehidrasyona uğraması olabileceği paylaşılmıştır (Wilson Jr ve Boland 2003).

3D baskı metotları yapı malzemeleri ve hücrelerin basımı ile kemik, kırık, iskelet kası, deri gibi dokuların mikro mimari benzetimini $\sim 100 \mu\text{m}$ 'ye ulaşan hassasiyetle sağlayarak literatürde yaygın çalışma alanı bulmuştur. Fakat mikro yapı benzetimi ile hücrelerin adezyon ve proliferasyonuna ortam sağlanmış olmasının doğal fenotiplerini sergilemelerini garanti etmediği yönünde gözlemler kaydedilmiştir (Zhang vd. 2021). Genel kabul, hücre dönüşüm süreçlerinin doğal yapıdaki gibi işlememesinin temelinde hücrelerin dokuya has sinyal yollarını tetikleyecek kimyasal ortamın sağlanamamış olduğu ve hücrelerin doğal ortamlarındaki fiziksel sinyallerden izole kalmış oldukları yönündedir. Bu sebeple sinyal moleküllerinin sistematik seçilimi ve fiziksel koşulların benzetimi de doku mühendisliğinin önemli hedeflerinden olmuştur (Kalantar Motamedi vd. 2016; Khalili vd. 2021; Mannhardt vd. 2021). Zhang vd. *in vitro* ortamda doğal fenotiplerini sergilemediği bilinen tendon kök hücrelerini (TSPCs) sinyal moleküllerinin bir alt grubu olan küçük molekülleri ve 3D baskı metodunu kullanarak, tendon kök hücrelerinin yönlenmiş doğal fenotiplerini sergileyecek şekilde dönüşümlerine imkân sağlamışlardır (Zhang vd. 2021).

3D basım teknikleri diğer metotların sağlayamadığı kontrollü inşa kabiliyeti ile çok adımlı prosesler yerine tek seferde üretim yapılmasına olanak sağlar. Fakat, mikro yapının hücresel boyutta benzetimi ve yönlenmiş sıkı mikrofibril yapıların benzetimi henüz sağlanamamıştır. Ayrıca tam organ ölçeğinde (3D) basılmış bir yapının sonradan milyonlarca hücre ile donatılması geometrik açıdan problemlidir.

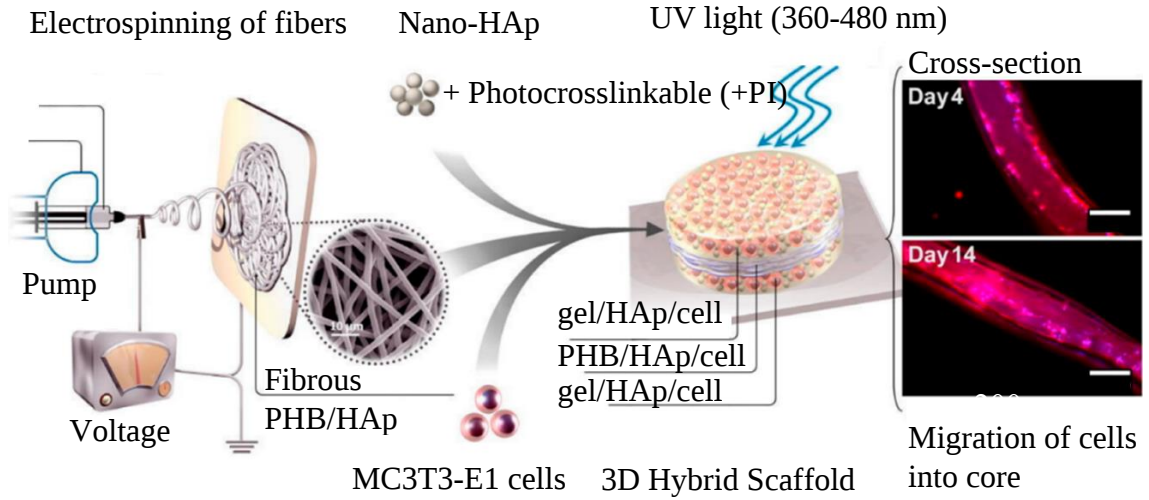
2.5.3. Elektro eğirme metodu

Doku iskelesi üretimi için biyomateryallerin termal ve mekanik ve kimyasal yöntemler dışında elektrostatik kuvvetler ile de işlenmesi mümkündür. Elektrostatik kuvvetlerin kullanıldığı metotlardan biri olan elektroegirme metodunda polimer yapılı sıvı, yüksek voltaj uygulanan ($\sim 15\text{-}30 \text{ kV}$) iletken bir kanaldan itilirken elektriksel olarak yüklenir ve elektrostatik kuvvetler yüzey geriliminin verdiği şekli deforme eder. Elektrik alan şiddeti belirli bir seviyeyi aşır Taylor konisi ² olarak anılan forma ulaşıldığı anda bir sıvı jeti meydana gelir. Sıvı jetinin ilerlemesi sırasında sıvı fazın buharlaşması ile onlarca mikron ile onlarca nanometre çapında olabilen fibriller oluşur (Angammana ve Jayaram 2016). Elde edilecek fibril özellikleri uygulanan potansiyel fark, akış hızı, toplama alanı uzaklığı, polimer ve çözücü tipi gibi parametrelere bağlıdır. Fibril örüntüsünün yapısı ise fibrilin toplandığı yüzeyin özelliklerine ve hareketine bağlı olarak, düzensiz, paralel yönlenmiş veya çok katmanlı yapı sergileyecek şekilde sıvı bir ortamda birikmiş şekillerde olabilmektedir (Kishan ve Cosgriff-Hernandez 2017).

Elde edilen ürünlerin mekanik dayanımı kullanılan materyaller ve fibril organizasyonuna bağlıdır. Kolajen proteini doğal dokulardaki mekanik dayanımı ve biyouyumluluğu sebebi ile sıklıkla kullanılan materyallerdendir. Fakat Zeugolis vd. suda çözünmeyen kolajen proteininin elektroegirme metodu ile işlenmesi halinde kısmi denatürasyona uğrayarak suda çözünen jelatin gibi davrandığını göstermiştir (Zeugolis vd. 2008). Bu sebeple kolajenin elektro eğirme metodu ile işlenmesiyle oluşturulan yapıların implantasyon sırasında etkiyen kuvvetler ve *in vivo* vücut sıvıları karşısındaki dayanımı çoğu uygulama için yetersiz bulunmaktadır (Drexler ve Powell 2011; Blackstone vd. 2021). Mekanik dayanım ve biyodegradasyon direnci sağlayabilmek için çözeltide hidroksiapatit (HAp) gibi doğal mineraller, poliüretan (PU), polilaktik asit

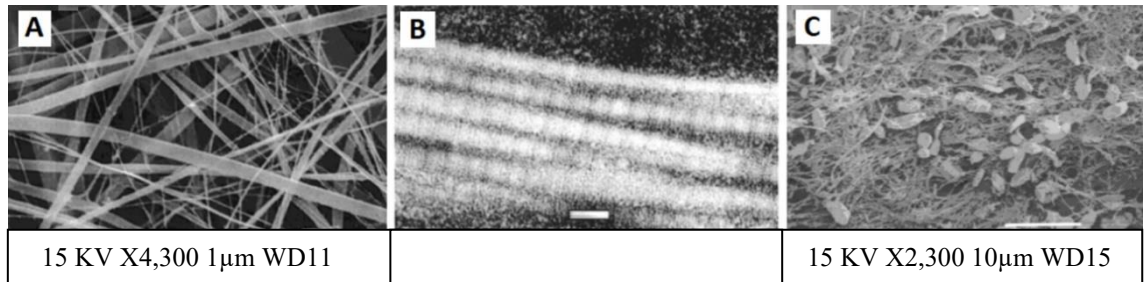
(PLA), polivinil alkol (PVA), polikaprolakton (PCL) ve poliglikolik asit (PGA) gibi polimerler de uygun çözücüler kullanılarak uygulanabilmektedir. Fakat, elektroegirme metodu ile yapılan çalışmaların ~%70'inde kullanılan 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol (HFP), 2,2-trifloroetanol (TFE), kloroform, etanol, N-N Dimetil formamid gibi çözücü kimyasalların ve çeşitli çapraz bağlayıcı kimyasalların (gluteraldehit, genipin, transglutaminaz, karbodimide, N-Hidroksisüksinimid vb.) düşük dozlarda kullanımı ile toksisite sergilemeyen çalışmalar yapılabilse de bu kimyasalların uzun süreli etkileri doku mühendisliği için tartışmalı durumdadır (Blackstone vd. 2021; Hernández-Rangel ve Martin-Martinez 2021). Bürck vd. (2013) dairesel dikroizm ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisinin bir kombinasyonunu kullandıkları çalışmalarında HFP ve TFE'nin sıgır dermisinden türetilen tip I kolajenin üçlü sarmallarını neredeyse tamamen açtığını göstermişlerdir. Bu sebeple doku mühendisliği uygulamaları için çözücü gerektirmeyen elektroegirme uygulamaları da geliştirilmeye çalışılmaktadır (Zhang vd. 2017). Öte yandan, kimyasal çapraz bağlama metotlarına alternatif olarak dehidrotermal işleme (DHT), argon lazeri uygulaması ve ultraviyole ışık kullanımı gibi fiziksel yöntemler de geliştirilmiştir. Dehidrotermal işleme 90°C'den yüksek sıcaklıkta suyun 24 saat kurutma ile uzaklaştırılmasına bağlı olarak amid ve ester bağları oluşmasını sağlarken UV ışık amino asitlerin aromatik yan zincirleri arasında çapraz bağ gelişimini sağlayacak serbest radikallerin oluşumunu sağlar (Adamiak ve Sionkowska 2020; Blackstone vd. 2021). Sadat-Shojai vd. (2016) elektroegirme ile elde edilmiş fibril yapıları UV ışık etkisiyle çapraz bağ oluşturabilen biyouyumlu polimerler ile kompoze etmiş ve fare preosteoblast (osteoblast oluşturmak üzere farklılaşan mezenkimal hücre) hücrelerinin fiber yapıya nüfuz edip tutunduğu gösterilmiştir (Şekil 2.11.). Yapının çekme dayanımı ise 329±18 kPa olarak ölçülmüştür. DHT metodu çapraz bağlama etkisinin yanında sterilizasyon da sağlarken UV ışık kullanımının termal dayanımı artırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte fiziksel metotların kimyasal metotlar kadar mekanik dayanım sağlamadığı rapor edilmiştir (Blackstone vd. 2021).

² Taylor konisi : İletken bir sıvı elektrik alan etkisine maruz kaldığında, şekli yüzey geriliminden çok elektrik alan etkisi ile değişir ve küresel bir uç formu olan dışbükey bir koni oluşur. Elektrik alan şiddeti eşik seviyeyi aştığında koni açısı 98,6° eşğine ulaşarak küresel ucun açılmasına ve eksenel doğrultuda ani bir sıvı akışına sebep olur (Taylor 1964).



Şekil 2.11. Elektroğirme metodu ile UV ışıkla çapraz bağ oluşturma metotlarının birlikte uygulandığı bir çalışmanın şematik anlatımı (Sadat-Shojai vd. 2016)

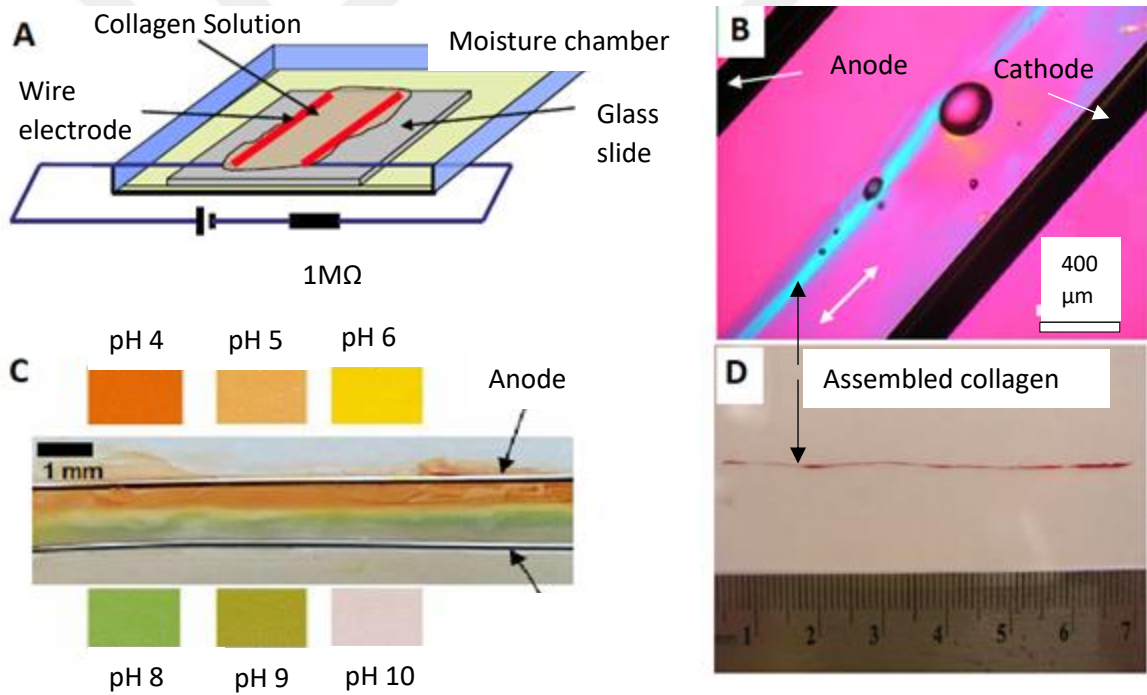
Matthews vd. (2002) insan plasentasından ve sığır derisinden elde ettikleri kolajenleri HFIP solventi içinde çözüp elde ettikleri çözeltilere çeşitli varyasyonlar ile elektroğirme uygulamışlardır. Maksimum fiber oluşumu elde ettikleri parametre setiyle elektroğirme uygulanmış sığır derisi kolajen tip-1 ile 67 nm D-banding yapısını koruyan 40-100nm çaplı fibriller elde edilmiş ve düz kas hücrelerinin ekimden sonraki 7.günde tutunmuş olduğu gözlenmiştir. İnsan plasentasından elde edilmiş kolajen tip-1’de ise sığır kolajenine göre daha iri ve değişken çaplarda 100-730 nm fibriller elde etmişlerdir (Şekil 2.12.) (Matthews vd. 2002).



Şekil 2.12. a) İnsan plasentasından elde edilmiş kolajen tip-1’in SEM görüntüsü; **b)** Sığır derisinden elde edilmiş kolajen tip-I’in elektroğirme işleminden sonra TEM görüntüsü (ölçek çizgisi uzunluğu 100nm), 67 nm olan doğal kolajen fibril deseni gözleniyor; **c)** Kolajen tip-I’in üzerinde düz kas hücrelerinin tutunmuş olduğu gözleniyor (Matthews vd. 2002)

2.5.4. Elektroforez metodu

Belirli yüklere sahip partiküllerin, belirli bir elektrik alan etkisiyle, özellikleri standardize edilmiş bir ortamda her seferinde aynı ilerlemeyi sergileyebilecek olması elektroforezin biyolojide karakterizasyon ve ayırma amacıyla kullanılmasını sağlamıştır. Bu amaçla gen, protein, lipid vb. moleküllerin analitik tayinlerini yapmak üzere çeşitli elektroforez düzenekleri geliştirilmiştir. Uquillas ve Akkuş (2012) elektroforezin izoelektrik odaklama özelliğini analitik amaçlar ve elektroforetik kaplama yöntemi olarak kullanılması dışında imalat metodu olarak da kullanılabileceğini göstermişlerdir. Çalışmalarında, kolajen tip-1 proteini içeren çözelti içerisindeki sabit metal teller arasında 20 VDC potansiyel fark oluşturularak pH gradyanı etkisi yaratılmış ve kolajen sıkı fibril (1D) formunda elde edilebilmiştir (Şekil 2.13.) (Cheng vd. 2008; Uquillas ve Akkus 2012). Li vd. (2013) elektroforez metodunu sert bir poliakrilamid (PAM) hidrojel içinde HAp mineralizasyonunu sağlayacak şekilde modifiye ederek osteoblast adezyonuna izin veren, 0.1-1 MPa çekme dayanımı ve 35 MPa basma dayanımı sergileyen kompozit yapılar elde etmişlerdir.



Şekil 2.13. a) pH gradyanı oluşturmak üzere hazırlanan düzeneğin temsili gösterimi; **b)** Uygulama sırasında kolajenin izoelektrik noktası sıfır olan noktada ($\sim$ pH 5.5) toplanması; **c)** Kolajen çözeltisi içindeki elektrotlara uygulanan potansiyel fark aracılığı ile oluşturulan pH gradyanı; **d)** Elde edilen kolajen fibril yapısı (Cheng vd. 2008)

Elektroforez, elektrotların çözeltiyle temas etmesini gerektiren ve ancak yüklü partiküllere uygulanabilen ve bir metottur. Partiküle etkiyen kuvvetin şiddeti ve yönü elektriksel yüküyle ilişkilidir. Bu temel tasarım parametreleri ve paralel tel elektrotlu uygulama ile tek boyutlu fibril oluşturulsa da paralel plaka elektrotları ile iki ve üç

boyutlu doku modeli geliştirilmesi potansiyeli de taşır. Fakat elektrotların çözeltiye teması sulu çözeltilerde hidrolize sebep olmakta ve elektrotlardan çözeltiye iyon transferi potansiyeli de taşımaktadır (Cheng vd. 2008).

2.6. Dielektroforez Metodu

2.6.1. Dielektroforezin temel ilkesi

Homojen olmayan elektrik alana maruz kalan bir partikülün elektronları elektrik alan şiddetinin yüksek olduğu yöne hareket ederler ve böylece partikülün bir tarafı negatif diğer tarafı da aynı ölçüde pozitif yüklü hale gelir. Buna *dipol oluşumu* denir. Dipollere etkileyen elektrik alan elektrostatik kuvvetler (F_{DEP}) oluşturur ve böylece partiküller onlara etkileyen net elektrostatik kuvvet yönünde hareket edebilirler (Şekil 2.14.). Bu etki *dielektroforez* olarak bilinir. Bir çözelti içindeki hücre veya maddesel partiküllerin dielektroforez etkisiyle tasarlandığı şekilde hareket ettirilebilmesi için net elektrostatik kuvvetin yücürme kuvveti, yerçekimi, direnç kuvvetleri ve termal etkiler ile oluşan akımlara karşı etkili seviyede büyük olabilmesi gerekmektedir. Elektrik alan gradyanına göre küçük partiküller için F_{DEP} aşağıdaki şekilde hesaplanabilir (Pohl 1958; Li vd. 2014).

$$F_{DEP} = \vec{p} \cdot \vec{\nabla} E \quad (2.1)$$

Burada;

$\vec{p}$, dipol momenti,

$\vec{\nabla} E$, elektrik alan şiddetini ve yönünü ifade eden gradyanı,

Dielektroforez kuvvetinin hesaplanması için, partikülün konumu, o noktadaki elektrik alan şiddeti ve partikülde oluşan dipol momenti $\vec{p}$ bilinmelidir. $\vec{p}$, küresel bir partikül için;

$$\vec{p} = Qd = Q2r \quad (2.2)$$

$$Q = \pi r^2 \epsilon_m K(\omega)_{Re} \vec{E} \quad (2.3)$$

eşitliklerinin birleşimi ile;

$$\vec{p} = 4\pi r^3 \epsilon_m K(\omega)_{Re} \vec{E} \quad (2.4)$$

olarak elde edilir.

Burada;

Q, partikülün kutuplarında indüklenen zıt ve eşit yük miktarı (Columb)

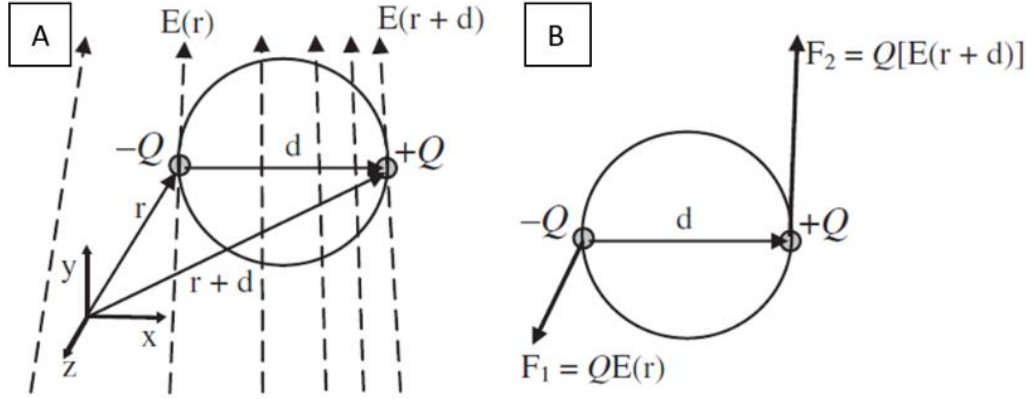
D, partikülün çapı (m)

r , partikülün yarıçapı (m)

ϵ_m , çözeltinin mutlak geçirgenliğini,

$K(\omega)_{Re}$, Clausius–Mossotti faktörünü ve Re , reel kısmının alındığını,

$\vec{E}$, elektrik alan vektörünü ifade eder.



Şekil 2.14. a) Elektrik alan gradyanındaki (kesikli çizgiler) bir partikül boyunca dağılan $+Q$ ve $-Q$ yükleri ve onlara etki eden $E(r)$ ve $E(r+d)$ şiddetine sahip elektrik alan vektörleri; **b)** Q yüklerinin elektrik alan vektörleri ile etkileşiminden doğan F_1 ve F_2 kuvvetlerinin partiküle etkimesinin illüstrasyonu görülmektedir (Pethig 2017)

Elektrik alan vektörü $\vec{E}$ 'nin şiddeti ve yönü, konum vektörü ($\hat{r}$) ve potansiyel fark (V) parametreleri kullanılarak aşağıdaki şekilde edip hesaplanabilir.

$$\vec{E} = -\frac{dV}{dr}\hat{r} \quad (2.5)$$

$$\vec{E} = -\vec{\nabla}V \quad (2.6)$$

$$\vec{E} = -\left(\frac{\partial}{\partial x}\hat{i} + \frac{\partial}{\partial y}\hat{j} + \frac{\partial}{\partial z}\hat{k}\right)V \quad (2.7)$$

Clausius–Mossotti faktörü $K(\omega)$, partikül ve içinde bulunduğu ortamın kompleks geçirgenliklerinin birbirine göre durumuna ve uygulanan elektrik alanın frekansına bağlıdır (Li vd. 2014). $K(\omega)$ faktörünün değeri -0.5 ile $+1$ arasında sınırlandırılmıştır. Negatif durum, partikülün ortamdan daha az polarize edilebildiği $\epsilon_p < \epsilon_m$ ve/veya $\sigma_p < \sigma_m$ durumunda ve pozitif durum da partikülün ortamdan daha fazla polarize edilebildiği $\epsilon_p > \epsilon_m$ ve/veya $\sigma_p > \sigma_m$ durumunda ortaya çıkar. (Li vd. 2014).

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2.8)$$

Burada,

$\epsilon^* = \epsilon - i\sigma/\omega$, $i = \sqrt{-1}$ olmak üzere kompleks geçirgenliği,

ϵ , geçirgenliği,

σ , elektriksel iletkenliği,

ω , elektrik alan frekansını ifade etmektedir.

“p” ve “m” indisleri ise sırasıyla partikül ve ortamı ifade etmektedir.

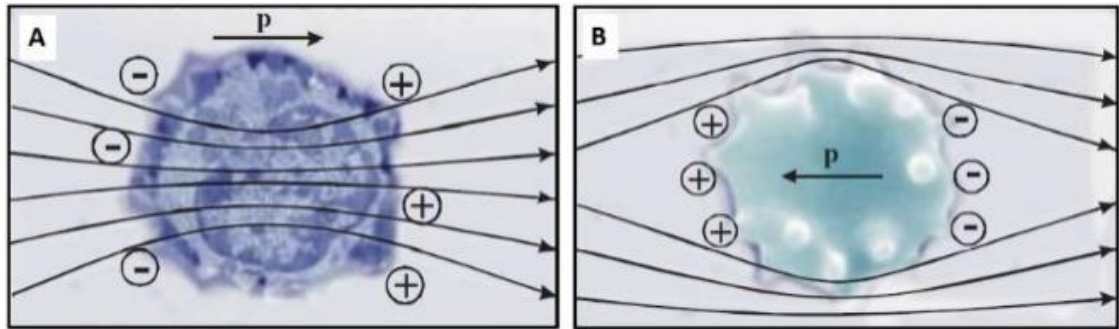
Geçirgenliğin kompleks formunun kullanılmasının sebebi, partikül ve ortamın elektrik alan altında iletken ve yalıtkan özellikleri bir arada sergileyecek olmasıdır.

Böylece 2.3, 2.7 ve 2.8 denklemleri 2.1 denkleminde birleştirilerek dielektroforetik kuvvet, F_{DEP} :

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_m K(\omega)_{Re} \nabla E^2 \quad (2.9)$$

formunda elde edilip hesaplanabilir (Li vd. 2014).

Geçirgenlik (ϵ), dielektrik bir malzemenin elektriksel polarizasyon kabiliyetini belirler. Geçirgenlik arttıkça elektrik alanda polarize olma miktarı artar. Partikülün geçirgenliği (ϵ_p), ortamın geçirgenliğinden (ϵ_m) büyük olursa partikül elektrik alan gradyanının yoğun olduğu yönde hareket eder ve bu durum pozitif DEP (pDEP) olarak anılır. Ortamın geçirgenliği partikülden büyük olursa partikül elektrik alan gradyanının seyrek olduğu yönde hareket eder ve bu durum negatif DEP (nDEP) olarak anılır (Şekil 2.15.) (Pethig 2017).

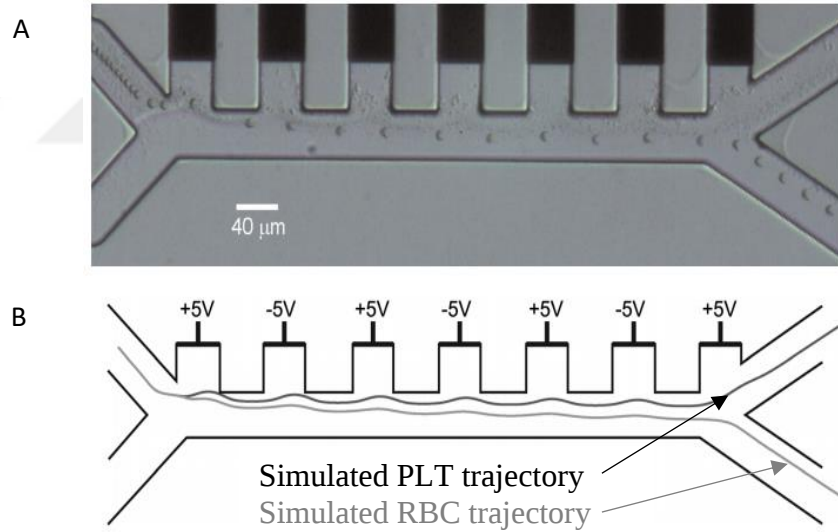


Şekil 2.15. Ortam ve partikül arasındaki elektriksel geçirgenlik farkına bağlı DEP kuvveti yönünün gösterimi **a)** Pozitif DEP ($\epsilon_m < \epsilon_p$); **b)** Negatif DEP ($\epsilon_p < \epsilon_m$) (Pethig 2017)

2.6.2. Dielektroforez düzenekleri ve kullanım alanları

Dielektroforez homojen olmayan elektrik alan etkisi ile oluşur fakat partikülün hareket yönünü polarizasyon belirler. Partikülün hareket yönünü, elektrik alan yönü yerine polarizasyonunun belirlemesi dielektroforez metoduna elektroforezde olmayan tarzda seçici bir nitelik kazandırmıştır. Dielektroforezin bu özelliği, çeşitli tip ve nitelikteki hücrelerin ayrıştırılması, tek bir hücrenin izole edilmesi, belirli bölgelerde konsantrasyon artışı sağlanması ve karakterizasyon gibi amaçlarla kullanılabilmesine imkân vermektedir. (Zhou vd. 2016; Liang vd. 2020). Dielektroforez düzeneği tasarımının temel parametreleri; çözelti ve partikülün elektriksel geçirgenlikleri, elektrotların geometrik şekilleri, potansiyel farkın şiddeti, frekansı ve faz değişimleridir. Frekans geçirgenliği, faz ise hareketin lineer ve rotasyonel karakterini etkiler. Faz değişimleri partikül boyutu ve elektrot boyutu ile uyumlu seçilerek pompa kullanılmaksızın hareketi sürdürmek ya da lokal yön farklılıkları yaratmak mümkün olur.

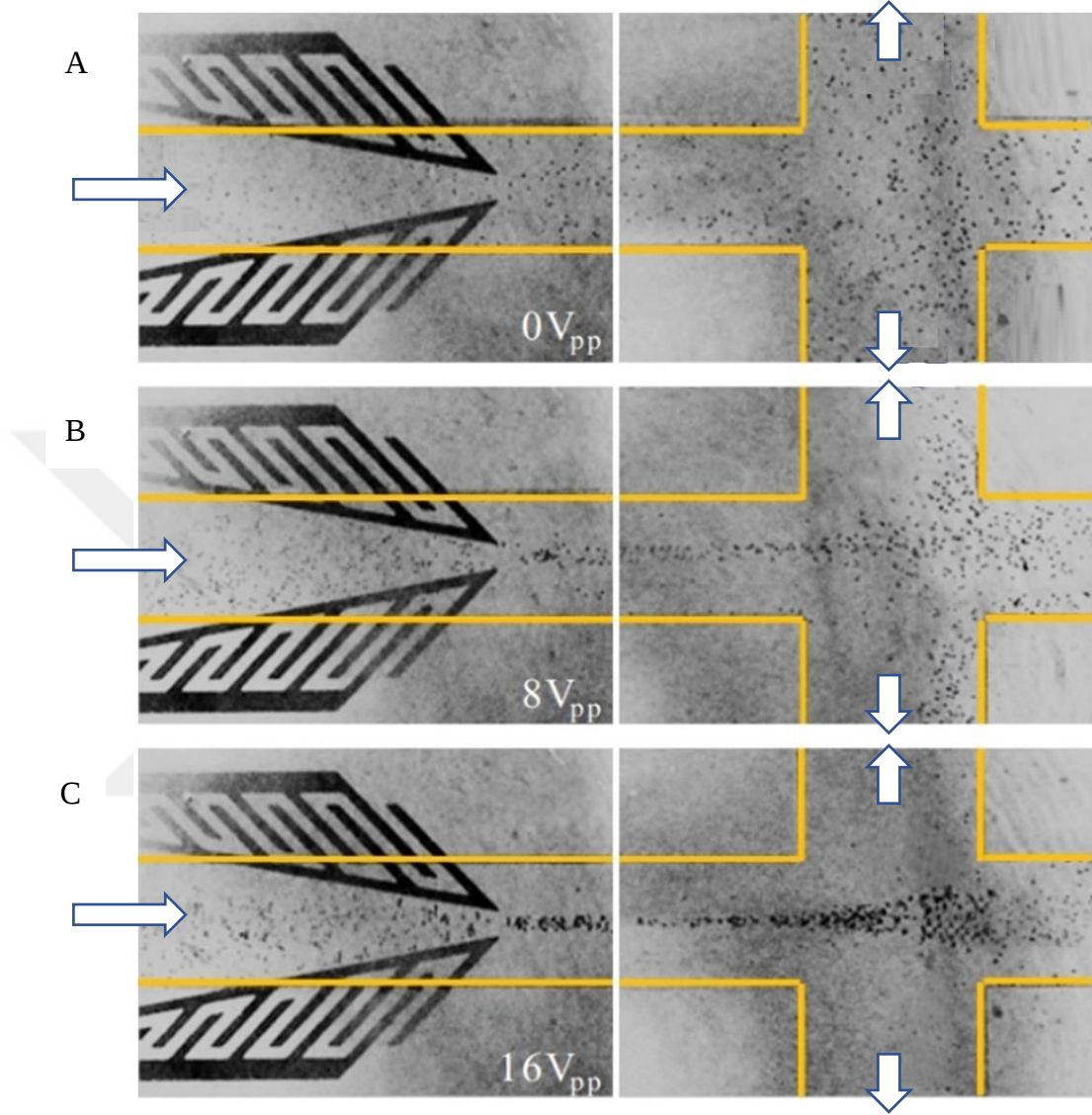
Piacentini vd. (2011) trombositlerin ($\sim 2-3 \mu\text{m}$) eritrosit ($\sim 7-8 \mu\text{m}$) ve diğer kan hücrelerinden ayrılması için hazırladıkları DEP düzeneği ile %98.8 oranında ayırma sağlayabilmişlerdir. Düzenek, sırayla +5 V@100 kHz ve -5 V@100 kHz uygulanan bir dizi kare formulu uzantı içermekte ve parabolik akış hattını elde edebilmek için üstteki ve alttaki giriş kanallarından sırasıyla 134 $\mu\text{m/s}$ ve 853 $\mu\text{m/s}$ hızla akış sağlamak üzere mikro pompa ile desteklenmiştir (Şekil 2.16.) (Piacentini vd. 2011).



Şekil 2.16. DEP etkisi ile hücre ayrıştırması sağlayan düzenek **a)** Trombosit ve eritrositlerin akış profilini göstermek üzere videodaki görüntülerin üst üste eklenmesiyle oluşturulan görüntü; **b)** DEP etkisi yaratmak için potansiyel fark uygulanan elektrotların dizilimi (Piacentini vd. 2011)

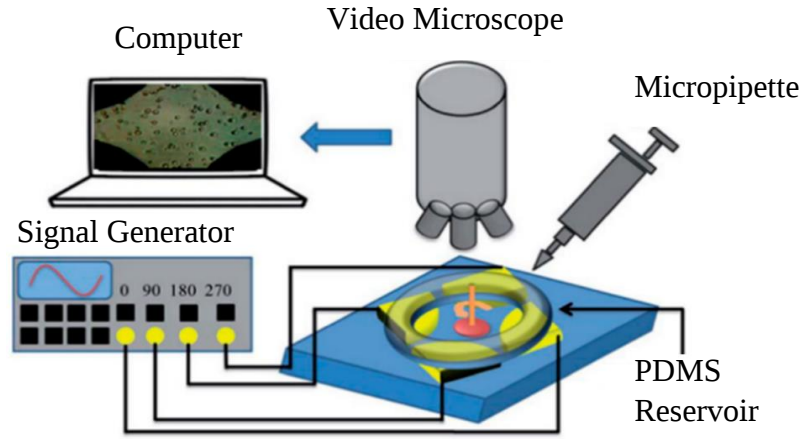
Choi vd. (2012), bir çözeltide düşük derişimde bulunan biyopartiküllerin bir biyosensörün algılama eşiğine ulaşacak seviyede konsantre edilebilmesini sağlamak için kanal etkisi yaratan “V” şeklinde iletken bir elektrot tasarlamışlardır. Elektrot, sıvıyı taşıyan yüzeyin altında sıvıya temas etmeyecek şekilde konumlanmıştır. Çözelti 100 $\mu\text{L/h}$ 'den az bir hız ile kanala pompalanmış ve bu sırada elektrotlara uygulanan potansiyel

farklar değiştirilerek partikül hareketine etkileri gözlenmiştir. Optimum parametre seti ile %92.8 konsantrasyon artışı elde edildiği bildirilmiştir (Şekil 2.17.) (Choi vd. 2012).



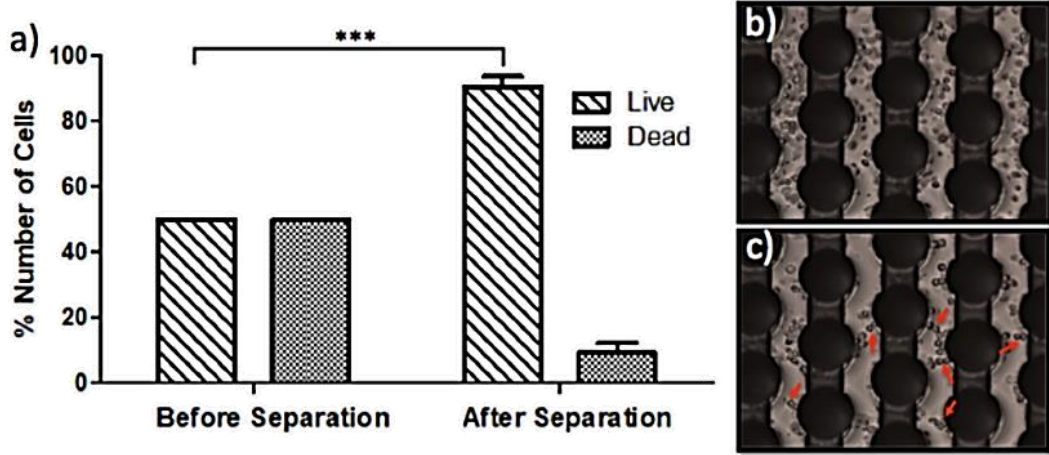
Şekil 2.17. Dielektroforez ile kanal etkisi yaratarak konsantrasyon artışı sağlayan elektrot tasarımı ve sırasıyla **a)** 0 V; **b)** 8 Vpp@3 MHz; **c)** 16 Vpp@3 MHz potansiyel fark uygulanırken partikül dağılımları (Choi vd. 2012)

Çoklu ilaç direncinin K562 lösemi hücrelerinin dielektrik özellikleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi için hazırlanan DEP düzeneğinde sinyal jeneratörü, elektrotlar, enjeksiyon aracı ve kameralı mikroskop şematik olarak görülmektedir (Şekil 2.18.) (Bahrieh vd. 2014).



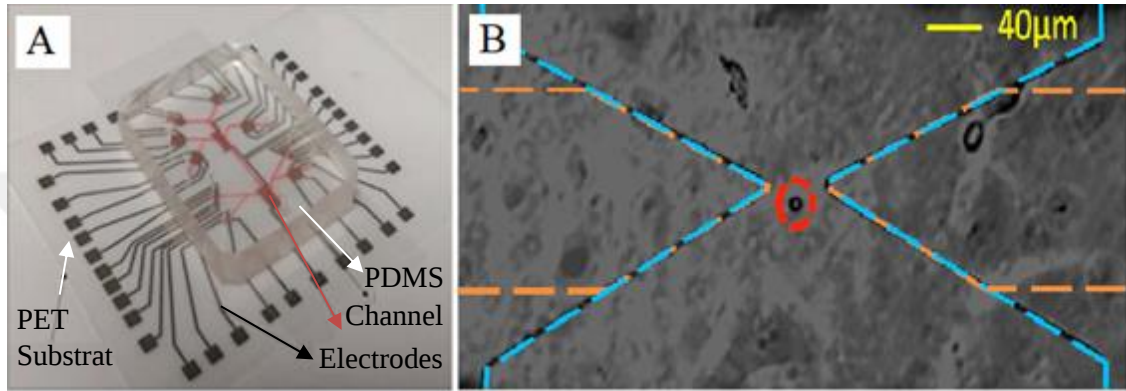
Şekil 2.18. DEP çalışmalarında sıklıkla kullanılan çalışma düzeneği (Bahrieh vd. 2014)

İlaçların etkinliğinin *in vitro* araştırılmasında ya da biyoyumluluğu araştırılan materyallerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde canlı ve ölü hücre sayımlarından faydalanılmaktadır. Böyle bir uygulama için dielektroforez kullanıldığında, sağlam bir plazma membranına sahip canlı hücreler, pasif iyon akışına direnecek ve elektriksel olarak yalıtıcı bir parçacık olarak görünecektir. Bozulmuş bir plazma zarına sahip ölü hücreler ise bozulmanın şiddetine göre iletken bir parçacık olarak davranabilir. Bozulma ileri seviyede olduğunda elektrik alan hücrenin içine girecek ve bu alan etkisiyle indüklenen yükler alanla aynı yönde hizalanmış bir dipol moment oluşturacaktır. Yıldızhan vd. (2017) bu ilkenin gözlenmesine yönelik çalışmalarında, canlı ve ölü U937 monosit hücrelerini 20 Vpp, 300 kHz, 1 μ L/dk akış hızı koşullarında %90 oranında ayırabilmişlerdir (Şekil 2.19.).



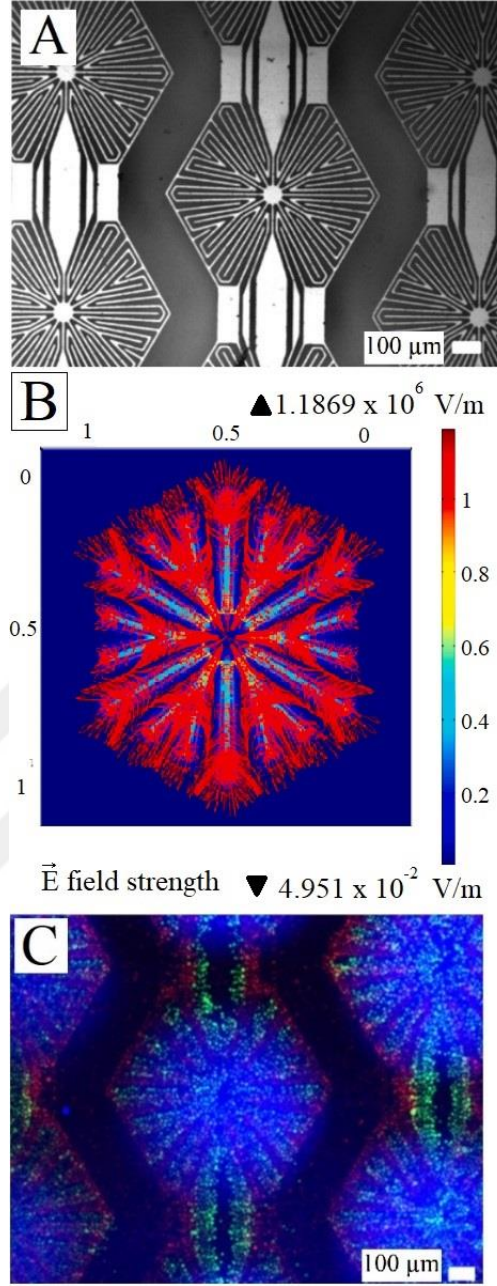
Şekil 2.19. a) Ayrılmadan önce oran 1:1 iken ayrılmadan sonra ölü hücreler %90 oranında uzaklaştırılmıştır; **b)** Ayrılmadan önce ölü ve canlı hücrelerin karbon yapılı dizi üzerindeki dağılımları; **c)** Ayrılmadan sonra canlı hücrelerin dağılımları (Yıldızhan vd. 2017)

Dielektroforez metodunun düşük maliyetli düzenekler oluşturma potansiyeli hızlı tanı kitleri geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Esfandypour vd. (2017), düşük maliyetli bir düzenek ile hücre izolasyonu yapılabileceğini göstermek üzere tasarladıkları iletken yolların yazıcı ile basıldığı PET plaka, izolatör olarak ~100 mikron kalınlıkta lamel camı ve PDMS'den imal edilmiş mikro kanaldan oluşan düzeneğe BY4741 maya hücresi, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ve streptavidin kaplı 5 ve 10 μm çapında polietilen küreler bulunduran bir çözeltiyi 0.07-0.1 $\mu\text{L}/\text{dk}$ hızla enjekte etmişlerdir. 900 kHz frekansla uygulanan 12 VAC potansiyel farkın oluşturduğu DEP etkisi ile maya hücresi diğer hücrelerden izole edilip tutulabilmiştir (Şekil 2.20.) (Esfandypour vd. 2017).



Şekil 2.20. a) Düşük maliyetli tanı kiti üretimi için önerilen sistemin prototipi; **b)** Önerilen sistem ile tek bir maya hücresinin diğer hücrelerden ayrılıp tutulabildiğini gösteren fotoğraf (Esfandypour vd. 2017)

Chen vd. (2021), mikro yapı deseni ve hücrelerin bu yapıdaki konumlarının fonksiyonel etkisini belirgin şekilde göstermek için hepatositleri pDEP etkisi kullanarak doğal karaciğer dokularındaki gibi hegzagonal adacıklar şeklinde yerleştirmişlerdir. Literatürdeki biyobenzetim çalışmalarının çoğunda sadece konumlandırmaya odaklanıldığını ve çalışmaların çok azında hücrelerin konumlarını ne kadar süre korudukları hakkında veri sunulduğuna dikkat çeken ekip, çalışmalarında DEP etkisi kaldırıldıktan sonra üç gün içinde yerleşimin bozulduğunu gözlediklerini ve hücreleri UV ışıkla çapraz bağlanan jelatin metakrilat (GelMA) hidrojel içinde tutarak hücrelerin konumlarının korunabildiğini bildirmiştir. (Şekil 2.21.) (Chen vd. 2021).



Şekil 2.21. a) DEP etkisi elde etmek için üretilen elektrot; **b)** COMSOL yazılımı ile yapılmış elektrik alan dağılımı analizi; **c)** Elektrotlar etrafında yoğunlaşmış hücrelerin görüntüsü (Chen vd. 2021)

Literatürde biyomateriyaller ile doğal mikro mimari benzetimi, hücrelerin konumlandırılması, dokuya uygun sinyal moleküllerinin kullanımı ve doğal fenotip gösteriminin sağlanması gibi temel hedeflerin çeşitli seviyelerde gerçekleştirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Dielektroforez metodu gerek materyallerin gerekse hücrelerin seçilip hareket ettirilmesi ve konumda tutulması gibi hedeflerin hassasiyetle gerçekleştirilmesine olanak sağlayan potansiyeli ile dikkat çekmektedir. Bununla birlikte literatürde dielektroforezin mikro yapı inşası amacıyla biyomateriyalleri organize eden bir metot olarak kullanımına rastlanamamıştır.

3. MATERİYAL METOT

Bu tez çalışmasında dielektroforezin mikro mimari benzetim metodu olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Dokulardaki yaygın bulunurluğu ve hücreler için uygun bir adezyon molekülü olması sebebi ile yapı materyali olarak kolajen proteini kullanılmıştır. Çalışmada partiküllerin tek tek ve gruplar halinde hareket ettirilmesi planlanmıştır. Uygun benzetim hassasiyeti ve işleme hızı dengesini sağlayabilecek ortalama partikül boyutunun tayini için öncelikle çeşitli dokuların hacimsel büyüklüğü, kullanılabilecek olası partikül boyutlarına oranlanmış ve kaç adet partikül gerekeceği hesaplanmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Doku iskelesini oluşturacak partikül boyut ve sayısının tespiti tablosu

Organ/ organ bölümü	Ref.	Hacim ~ (ml)	Porotize /Fibril boşlukları %80 iken doku iskelesi hacmi (ml)	Doku iskelesini			
				20 mikron	100 mikron	300 mikron	1000 mikron
				kenarlı kübik partiküllerle temsil eden modeldeki yaklaşık partikül sayıları (Adet)			
Burun	-	6	1.2	0.15×10^9	1.20×10^6	0.05×10^6	1.20×10^3
Dış kulak	-	6	1.2	0.15×10^9	1.20×10^6	0.05×10^6	1.20×10^3
Aort	(Kurugol vd. 2015)	15.7	3.14	0.39×10^9	3.14×10^6	0.12×10^6	3.14×10^3
Pankreas	(Szczepaniak vd. 2013)	75	15	1.88×10^9	15×10^6	0.56×10^6	15×10^3
Böbrek	(Roseman vd. 2017)	140	28	3.50×10^9	28×10^6	1.04×10^6	28×10^3
Karaciğer	(Andersen vd. 2000)	1600	320	40×10^9	320×10^6	11.9×10^6	320×10^3
Burun ve dış kulak hacimleri CAD model ile hesaplanmıştır. Aort boyutları kalp çıkışında $\varnothing_{\text{dış}}$: 25, $\varnothing_{\text{iç}}$: 15, h: 50 mm için hesaplanmıştır.							

Çizelgede 20 mikron değeri literatürde DEP etkisi ile hareket ettirilebildiği bilinen hücrelerin ($\sim 7-15 \mu\text{m}$) yaklaşık değeri olduğu için yeterli hassasiyeti sağlayabilecek minimum değer olarak seçilmişken 1 mm değeri hassasiyetin yetersiz olacağı bilinen üst

bir değer olarak seçilmiştir. Ara değerler olan 100 ve 300 μm değerleri ise 20 μm ölçüsüne kıyasla işlenebilir seviyede az sayıda partikül gerektiren, hassas benzetim için yeterince küçük ve DEP etkisi ile hareket ettirilmesi olası partikül büyüklükleri olarak ön görülmüşlerdir.

Elektrotlar arasındaki mesafe, hazırlanan devreyle uygulanabilecek maksimum potansiyel fark olan 9 kV ile basılı devre kartı (Printed Circuit Board, PCB) materyali FR-4'ün 20 kV/mm değerindeki dielektrik dayanımını aşmayacak seviyede 650, 1000 ve 1350 μm ölçülerinde tasarlanmıştır. Elektrot dizilimleri ise partiküllere lineer, rotasyonel ve değişken doğrultulu hareketler yaptırabilecek şekilde tasarlanmıştır. Elektrot tasarımı sürecinde geometrik şeklin bilgisayarda tasarlanması ve elektrik alan analizi yapmak amacıyla Comsol ve basılı devre kartı (PCB) imali için Altium programlarından faydalanılmıştır.

Kolajenin çözünmesi ve partiküllerinin hareket edebileceği sıvı bir ortam oluşturması için asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Çözelti, cam lamellerden oluşturulan kapalı bir hacim içine alınıp yüksek potansiyel fark uygulanan PCB yüzeyine yerleştirildikten sonra 4X büyütme gücündeki dijital mikroskop ile gözlem yapılmıştır.

3.1. Çözelti Haznesi Hazırlanması

Kolajen partiküllerinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler, çapraz bağ yapısını az miktarda denatüre eden ve literatürde kolajen temelli doku iskelesi üretimini hedefleyen çalışmalarda sıklıkla kullanılan asetik asit kullanılarak hazırlandı (Bak vd. 2018; Neff ve Bradshaw 2021). Bu tez çalışmasında planlanan hareketlerin gözlenebileceği maksimum boyutlarda partiküller hazırlayabilmek için öncelikle derişik çözeltiler hazırlanmış ve elektrik alan altındaki davranışları gözlenerek çözelti derişimi ve kolajen miktarı seyreltik çözeltiler verecek yönde tekrar düzenlenmiştir.

İlk çözelti (Çözelti-1) 0.05M, ikinci çözelti (Çözelti-2) 0.2M derişimde hazırlanmıştır. Çözeltilere kütlece %0.5 olacak miktarda liyofilize atelokolajen tip-1 (Bugamed'den temin edilmiştir) ilave edilmiştir. Gözleme hazırlamak için çözeltilerden 5 ml alınıp 5 ml eozin ilave edilerek kolajen partikülleri kırmızıya boyanmıştır. Elde edilen çözeltiler 5000 RPM'de (3.689 x g) 15 dakika boyunca santrifüj edilerek kolajenin çökmesi sağlanmıştır. Çökeltinin üstünde kalan sıvı kısım (süpernatant) atılmış ve dipte kalan çökeltinin üstüne 10 ml distile su ilave edilerek kolajen partikülleri gözlenmeye hazır hale getirilmiştir. Bu iki çözeltiyle elde edilen partiküllerin davranışlarına göre Çözelti-3, 0.5M derişimde kütlece %0.1 kolajen içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin parametreleri ve hesaplana şekli Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kolajen çözeltisi hesap çizelgesi

Açıklama	Asetik asit moleküler ağırlığı	Asetik asit yoğunluğu	Başlangıç çözelti derişimi	Başlangıç molalite hesaplaması	Hedef hacim	Hedef çözelti molalitesi	Hedef çözelti için tartılması gereken su miktarı	Hedef çözelti için suya ilave edilmesi gereken asit miktarı	Asit çözeltisi kütlesi	Hedeflenen kolajen miktarı (kütlece)	Eklenen kolajen miktarı
Kısaltma	MA	d	x	$M1 = X \cdot d \cdot 10 / MA$	V2	M2	$[V2 - (V2 \cdot M2 / M1)]$	$(V2 \cdot M2 / M1)$	ma	mk	$(ma \cdot mk) \cdot 10$
Birim	(g/mol)	(g/ml)	(%)	(M)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	(g)	(%)	(mg)
Çözelti-1	60.5	1.05	99.7	17.3	50	0.05	49.86	0.15	50.01	0.05	25.004
Çözelti-2	60.5	1.05	99.7	17.3	50	0.2	49.43	0.58	50.03	0.05	25.014
Çözelti-3	60.5	1.05	99.7	17.3	50	0.5	48.56	1.45	50.07	0.01	5.007

Su, asetik asit ve kolajen tip-I'ın 20°C'de bağıl geçirgenliklerinin sırasıyla $\epsilon_{su}=80$, $\epsilon_{aa}=6.2$ ve $\epsilon_{kolajen}=2.6$ olarak ölçüldüğü literatürdeki çalışmalardan bulunmuştur (Malmberg ve Maryott 1956; Lima vd. 2006). Bohigas ve Tejada (2009), asetik asit çözeltilerinin geçirgenliğini hesapladıkları çalışmada çeşitli derişimlerde asetik asit içeren 20°C sıcaklıktaki suyun 1-10 GHz aralığındaki bağıl elektriksel geçirgenlik değerlerini sundukları grafikte hacimce %1 ve daha az asetik asit içeren çözeltilerin bağıl geçirgenliğinin ~78 olacağını ifade etmişlerdir (Bohigas ve Tejada 2009). Bu durumda dielektroforez teorisine göre kolajen partiküllerinin negatif DEP özelliği sergileyerek elektrik alan gradyanının az yoğun olduğu yönde hareket etmeleri ve elektrotlar enerjilendirildikçe uzağa itilmeleri beklenmiştir.

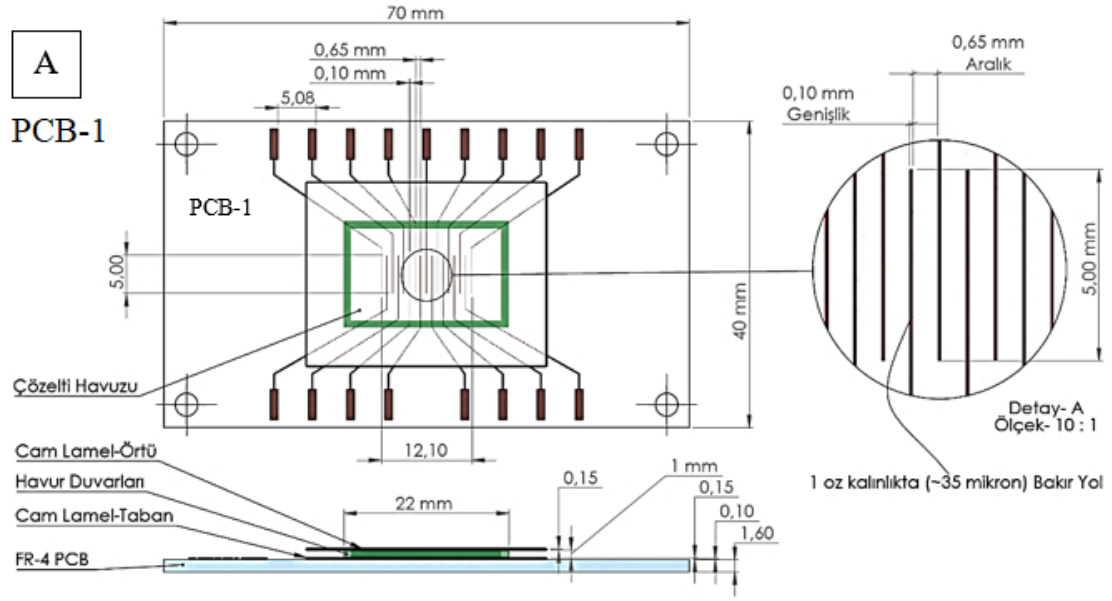
3.2. Elektrik Alan Gradyanı ve Polarizasyon Analizi

Elektrot tasarımına yön göstermesi amacıyla elektrik alan gradyanı ve polarizasyon sonuçlarını sunan analizler yapılmıştır. Analizler için sonlu elemanlar metodunu kullanan COMSOL yazılımının elektostatik modülünden faydalanılmıştır. Negatif DEP ve pozitif DEP etkilerini bir arada gözlemek için çözelti içerisinde bağıl elektriksel geçirgenliği çözülden büyük ve küçük partiküller modellenmiş, bu modelin homojen ve homojen olmayan elektrik alan altındaki polarizasyonlarının gösterildiği iki ayrı analiz yapılmıştır.

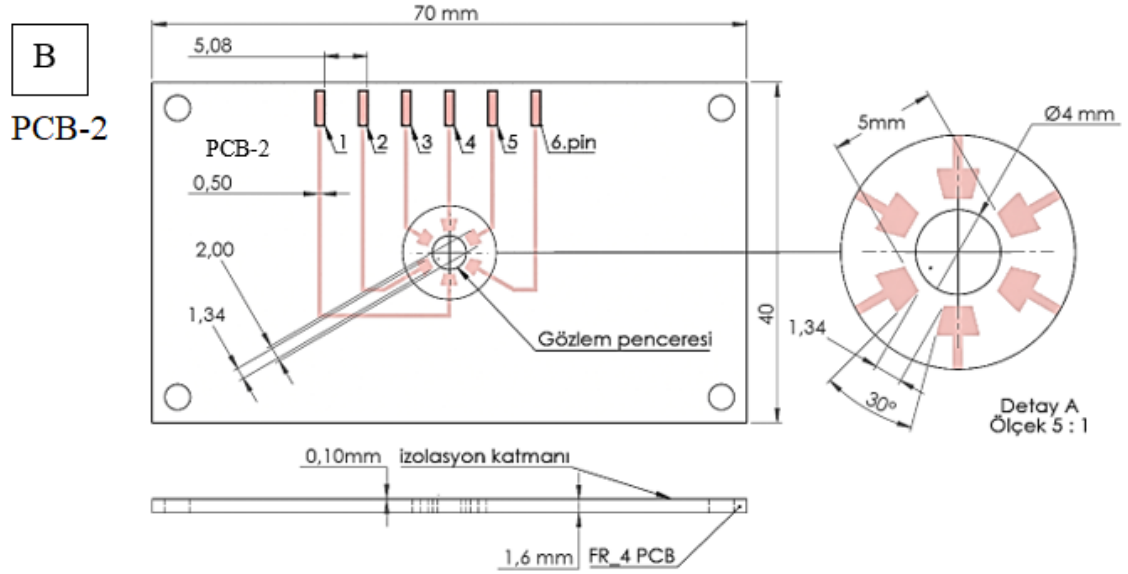
3.3. Elektronik Devre ve PCB Tasarımı

Partiküllerin homojen olmayan elektrik alan altındaki davranışını gözlemek üzere potansiyel fark, frekans, faz ve etkiye süresini değiştirerek farklı elektrik alan gradyanı desenleri türetilen bir düzenek hazırlanmıştır (söz konusu parametrelerden oluşan değer setleri tez metni içinde senaryo olarak anılmıştır). Potansiyel farkı yükseltmek için transformatör, frekans sağlamak için sinyal jeneratörü, elektrot sırası ve süresini belirleyerek TW-DEP etkisi yaratılması için ise Arduino ve sinyal çoklayıcılar kullanılmıştır.

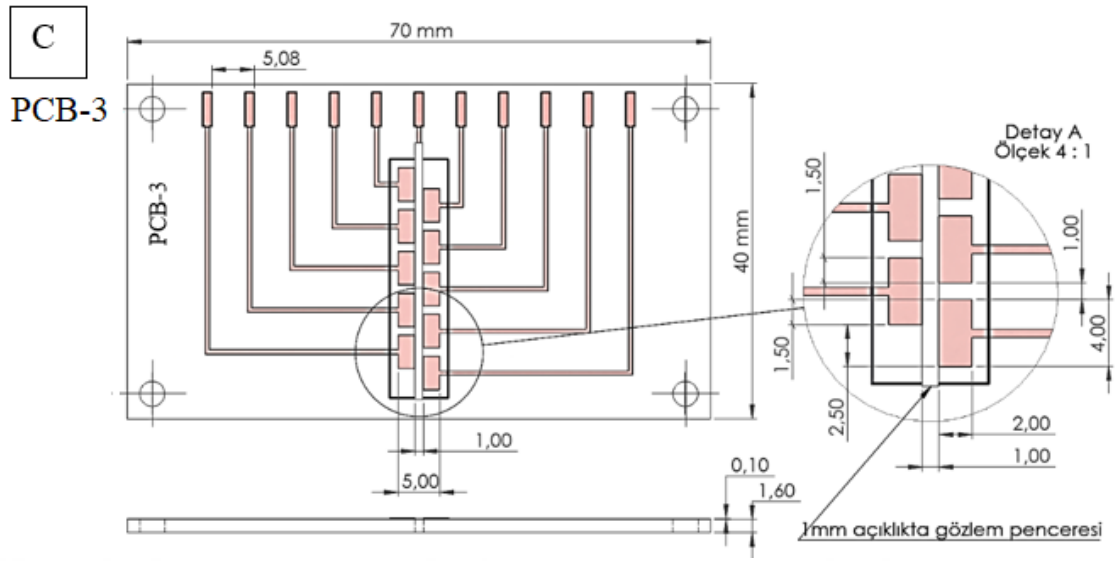
Bu tez çalışmasında tarif edilen inşa metodu üç boyutlu uzayda parçaların bir araya getirildiği tipte, bir tür eklemeli imalat uygulamasıdır. Başlangıç olarak iki boyutlu bir uygulama yapılmıştır. Bir partikülün lineer ve rotasyonel olmak üzere iki temel hareketi ve karmaşık manevraları ne derece başarıyla gerçekleştirildiğini gözlemek için üç çeşit elektrot tasarlanıp imal edilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3).



Şekil 3.1. Lineer hareket gözlemek üzere imal edilen PCB-1

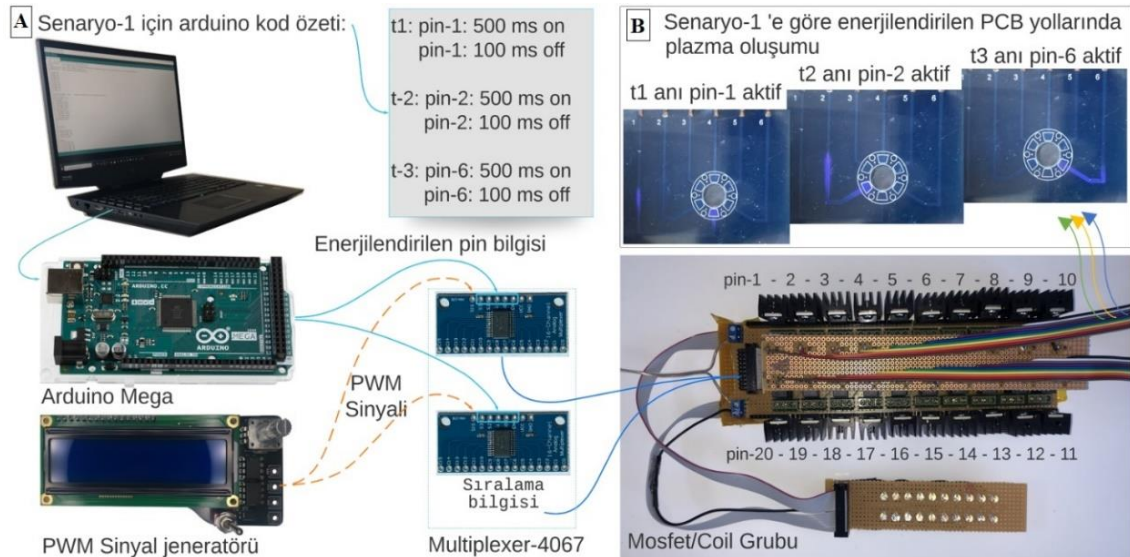


Şekil 3.2. Rotasyonel hareket gözlemek üzere imal edilen PCB-2



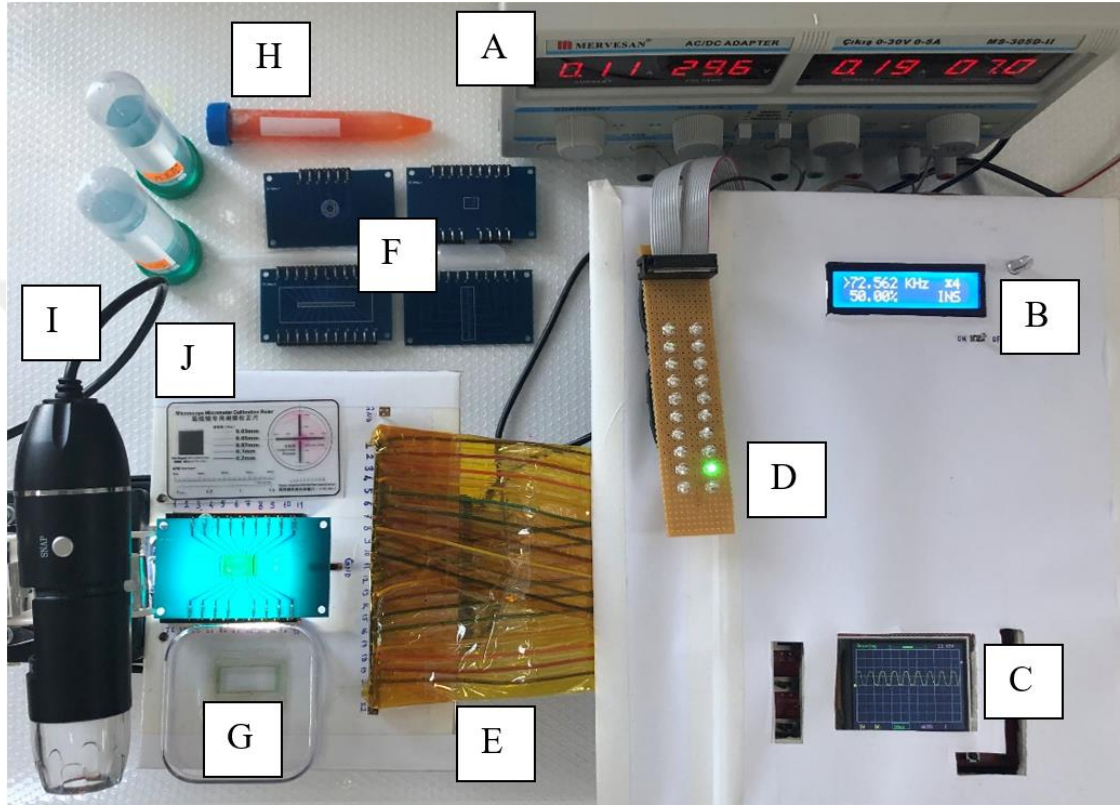
Şekil 3.3. Değişen doğrultularda hareket eden partikülleri gözlemek için imal edilen PCB-3

Her bir elektrota bir transformatör bağlanmış ve transformatörler birer MOSFET ile sürülmüştür. Transformatörlerin çıkış verebilmesi için sırası geldikçe MOSFET'lerin Geçit (Gate) ucuna, (aksi belirtilmedikçe) 100 kHz frekansla, kare dalga formunda PWM (Pulse-Width Modulation) sinyali %50 çalışma oranı (duty cycle) ile uygulanmıştır (Şekil 3.3.). Transformatörlerin primer sargılarına 0-30 V potansiyel fark aralığında ayarlanabilen DC güç kaynağı ile besleme sağlanmıştır. Üretilen potansiyel fark, 1.6 mm kalınlıkta, ~0.035 mm kalınlıkta bakır katmanına sahip FR-4 materyalden imal edilmiş PCB'lerin üzerindeki elektrotlara iletilmiştir (Şekil 3.4.).



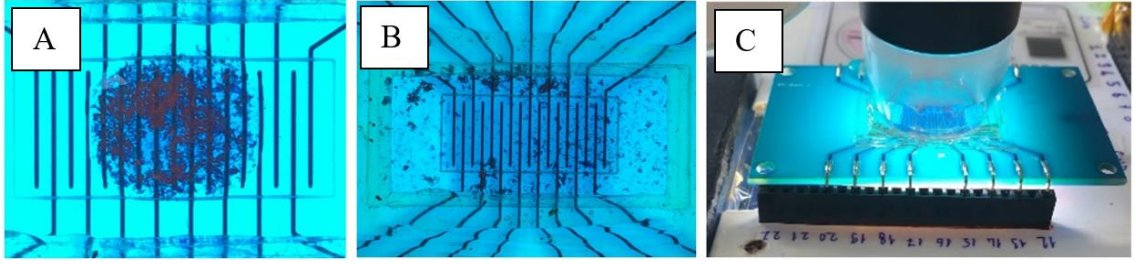
Şekil 3.4. a) Dielektroforetik kuvvet oluşumunu tetiklemek ve yönetmek üzere senaryo parametrelerinin kontrol edildiği sistem; **b)** PCB'lere iletilen yüksek voltaj etkisi ile yüzeydeki su haznesi ve PCB arasında plazma oluşumu

Çeşitli PCB'lerin kolayca sisteme bağlanıp sökülebilmesi için modüler bir PCB adaptörü tasarlanmıştır. Elde edilen yüksek voltajın iletimi için kullanılan kablolar polyimid bant ile kaplanarak yalıtılmıştır. Çalışma sırasında kod hataları ve arızalanma gibi sorunları görsel bir indikatör ile kontrol edebilmek için enerjilendirilen transformatörlerin ve dolayısı ile elektrotların aktif olup olmadığını gösteren bir LED dizisi yapılmıştır. Sinyal jeneratörünün kontrolü için sisteme bir osiloskop dahil edilmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Gözlemlerin yapıldığı düzenek, **a)** 0-30VDC güç kaynağı; **b)** 3Hz-1MHz kare dalga PWM sinyal jeneratörü; **c)** Osiloskop; **d)** Görsel kontrol için kullanılan LED dizisi; **e)** Polyimid (PI) izolasyonlu yüksek voltaj kabloları; **f)** Çeşitli PCB'ler; **g)** Çözelti gözlem haznesi; **h)** Eozin ile boyanmış kolajen çözeltisi; **i)** 4X dijital mikroskop; **j)** Mikroskop için kalibrasyon cetveli

Üretilen yüksek voltajın farklı PCB'lere iletildiği üç farklı gözlem yapılmıştır. Gözlemler için, 0.18 ml hacme sahip gözlem haznesine 0.015 ml çözelti-3 damlatılıp üzerine ~0.15 ml distile su ilave edilerek hazne doldurulmuş ve üzeri dış hava akımı vb. etkilerden korunmak üzere lamel ile örtülmüştür (Şekil 3.6.).



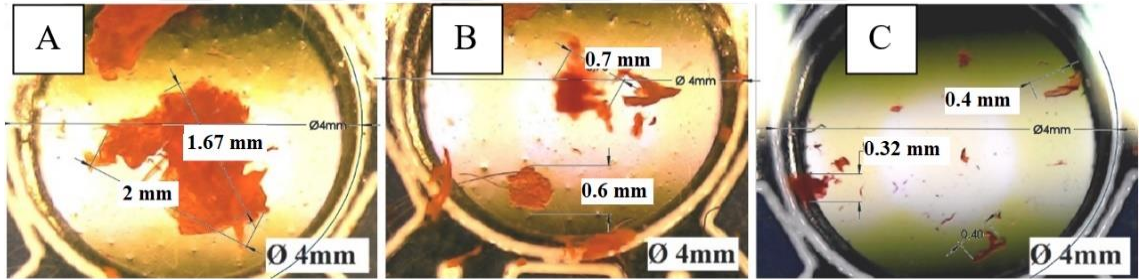
Şekil 3.6. a) Gözlem haznesine damlatılmış kolajen partikülleri; **b)** Gözlem haznesine distile su (dH_2O) eklenmesiyle kolajen partiküllerinin yayılımı; **c)** Partiküllerin gözlenmesi için kullanılan 4X dijital mikroskop ve PCB adaptörü

4. BULGULAR

4.1. Partikül Boyutunun Çözelti Derişimi ile Ayarlanması

Çözelti-1 (Çizelge 3.2.) ile elde edilen partiküller, maksimum büyüklüğü verse de büyük çoğunluğunun uygulanan elektrik alan etkisi ile yer değıştirmediğı gözlendi. Bununla birlikte bazı küçük partiküllerin hareketi ve büyük partiküllerin bazılarında kenar uzantılarının uygulanan elektrik alan etkisine uyumlu tarzda salınımı DEP etkisinin oluştuğunu göstermiştir. Çözelti-2 ile oluşturulan partiküller görece daha küçük olmakla birlikte partiküllerin çözelti-1'deki gibi homojen olmayan şekil ve boyutlarda olduğı gözlenmiştir (şekil 4.1.). Çözelti-3 ise 1. ve 2. çözeltiler ile elde edilen partiküllerin uygulanan elektrik alan etkisi ile konum değıştirmedikleri bilgisi dikkate alınarak çözücü asit miktarı arttırılıp çözünen kolajen miktarı azaltılarak partikül büyüklüğü azaltılacak şekilde hazırlanmıştır. Böylece partikül boyutları düşürülebilmıştır.

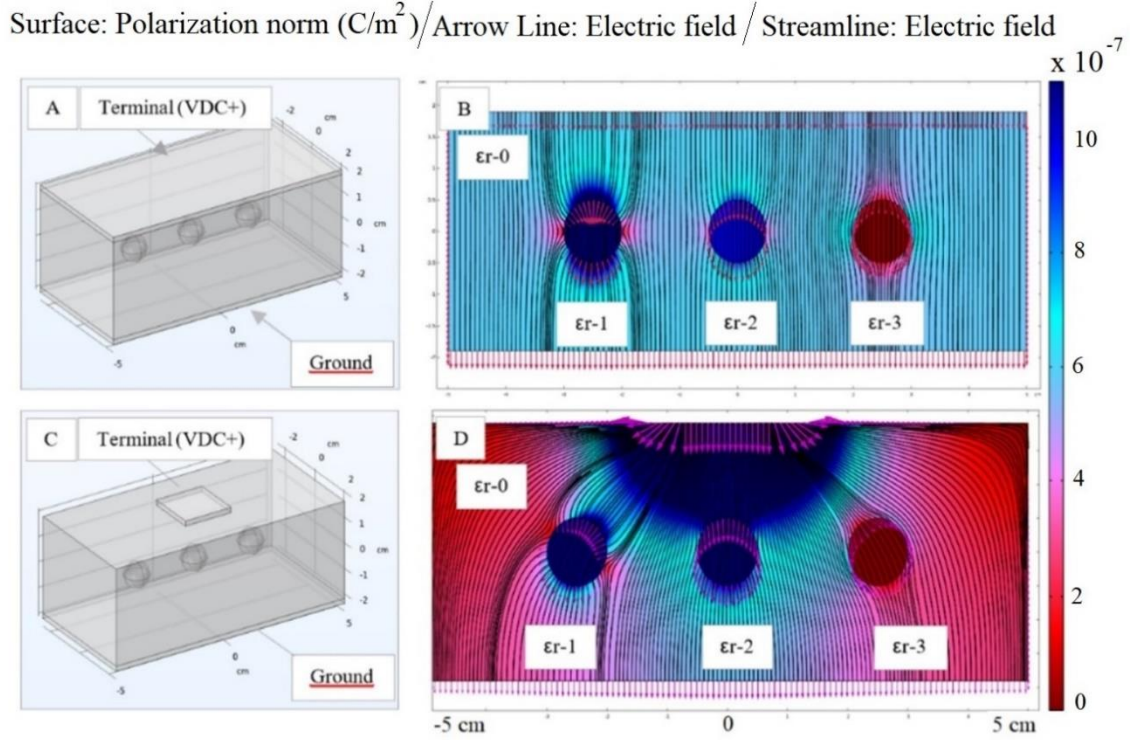
Kolajen partikülleri 4X büyütme gücüne sahip dijital bir mikroskop ile görüntülenmiş ve ölçümleri bilgisayar ortamında yapılmıştır. Çözelti 1, 2 ve 3 ile elde edilen partiküllerin maksimum boyutları sırasıyla, ~2 mm, ~0.6 mm ve ~0.3 mm olarak bulunmuştur (şekil 4.1). Çalışmada çözelti-3 ile elde edilen partiküllerin hareketleri gözlenmiştir. Ek olarak ~1 mm boyundaki ipliksi bir partikülün de hareketi gözlenerek çalışmaya dahil edilmiştir.



şekil 4.1. a) Çözelti-1 ile elde edilen partiküller; b) Çözelti-2 ile elde edilen partiküller; c) Çözelti-3 ile elde edilen partiküller

4.2. Elektrik Alan Gradyanı ve Polarizasyon Analizi Bulguları

Homojen ve homojen olmayan elektrik alan sağılayan iki ayrı koşul altında yapılan analizde her iki koşulda da bağıl elektriksel geçirgenlik farkı arttıkça partikülde indüklenen polarizasyon şiddetinin arttığı hesaplanmıştır. Buna bağılı olarak dielektrik kuvvet şiddetinin de artacağı bilinmektedir. Ayrıca homojen olmayan elektrik alan altındaki partiküllerde alan yoğunluğunun fazla olduğı noktalarda polarizasyonun daha fazla olacağı görülmüştür (şekil 4.2.). şekil 4.2-A'da iki özdeş plaka arasındaki homojen elektrik alan etkisinde modellenmiş partiküllerin, şekil 4.2-C'de ise homojen olmayan elektrik alan etkisindeki partiküllerin polarizasyonu renk gradyanı olarak gösterilmiştir. Ortamdaki elektrik alan gradyanı ise alan çizgilerinin sıklığı ile belirtilmiştir. Modellenen partiküllerin rölatif geçirgenlikleri arasında $\epsilon_{r1} > \epsilon_{r2} > \epsilon_{r0(ortam)} > \epsilon_{r3}$ ilişkisi bulunmaktadır. Modelde, ϵ_{r3} kolajeni, ϵ_{r0} ise ortamı temsil etmektedir.

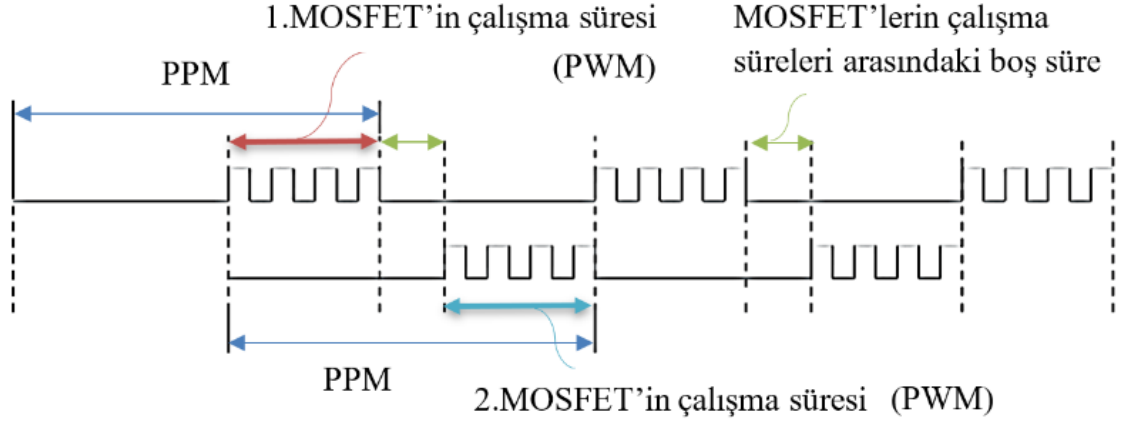


Şekil 4.2. a) Homojen elektrik alan oluşturan paralel plakalı model; b) Farklı elektriksel geçirgenlikteki partiküllerin çevresinde homojen elektrik alan etkisiyle oluşan elektrik alan gradyanı ve polarizasyon; c) Homojen olmayan elektrik alan oluşturan model; d) Farklı elektriksel geçirgenlikteki partiküllerin çevresinde homojen olmayan elektrik alan etkisiyle oluşan elektrik alan gradyanı ve polarizasyon

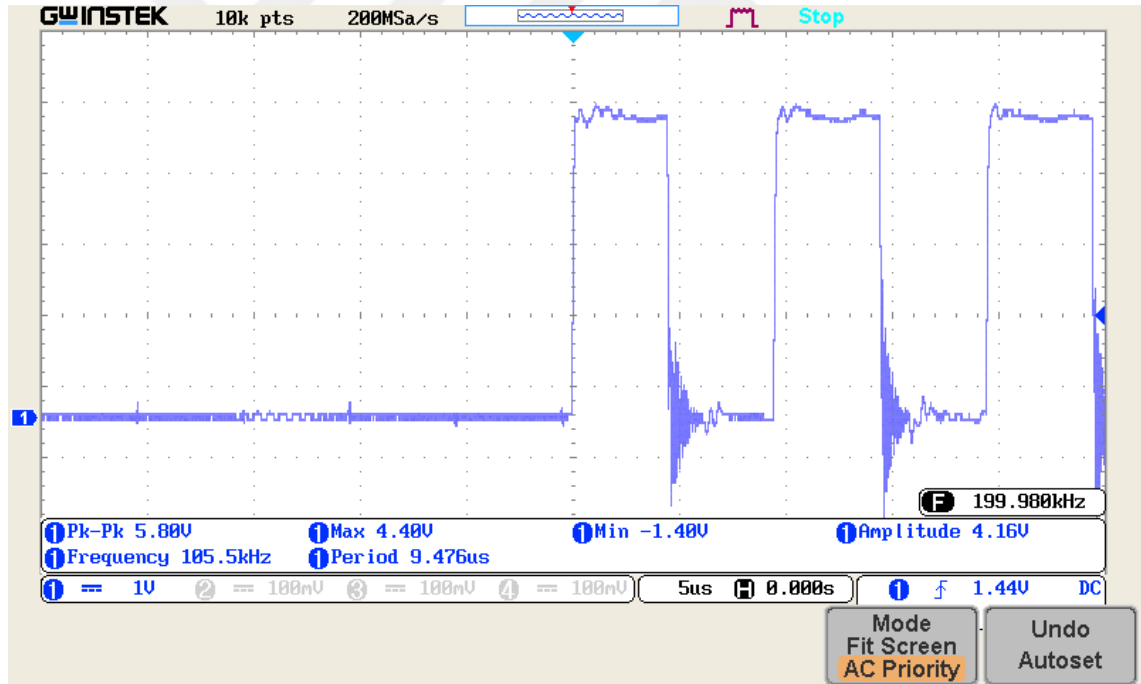
4.3. Yüksek Potansiyel Fark Üretilmesi

Transformatörlerin beklenen yüksek voltaj çıkışını sağlaması, onları enerjilendiren MOSFET'lerin sinyal jeneratörünce üretilen PWM frekansı ile tetiklenebilmesine bağlıdır. Bu sebeple öncelikle imal edilen elektronik devre osiloskop ile kontrol edilerek sinyal üreticinin ve Arduino kodunun planlandığı gibi çalıştığı gözlenmiştir. Elektrik alanın yer değiştirmesi ise Arduino kodu ile sıra seçimi yapılan Multiplexer'lerin MOSFET'lere ilettiği PPM (pulse position modulation) sinyaline bağlıdır. Bu iki koşulun sağlanıp sağlanmadığını kontrol etmek amacıyla MOSFET giriş sinyali osiloskop ile takip edilmiş ve beklendiği gibi PPM ve PWM karakteri taşıyan bir sinyal oluşturulabildiği gözlenmiştir (Şekil 4.3.-4.4.). Bu sinyalin iletildiği MOSFET'e bağlı transformatörün primer sargısına 13 V DC uygulandığında sekonder sargıda 107 kHz frekanslı ~600 V AC gerilim oluşturulabildiği gözlenmiştir (Şekil 4.5.). Böylece ~47 kat artış sağladığı gözlenen transformatörlerin tetiklenmesi ile anlık ~1.4 kV potansiyel fark seviyesine ulaşılabilmiştir. Çizelge 4.3'te partikül ve elektrot arasındaki minimum ve maksimum mesafeler ile güç kaynağının farklı ayar kademelerine göre PCB üzerinde oluşan elektrik alan şiddeti değerlerine yer verilmiştir. Çözümlü PCB'nin üstüne cam lamel üzerinde yerleştirildiği için minimum değer lamelin kalınlığı olan 0.15 mm, sıvı derinliği 1 mm olduğu ve yüzeydeki bir partikül için enerjilendirilen en yakın PCB yoluna maksimum uzaklığın 2 mm olması sebebiyle maksimum değer 2 mm olarak verilmiştir.

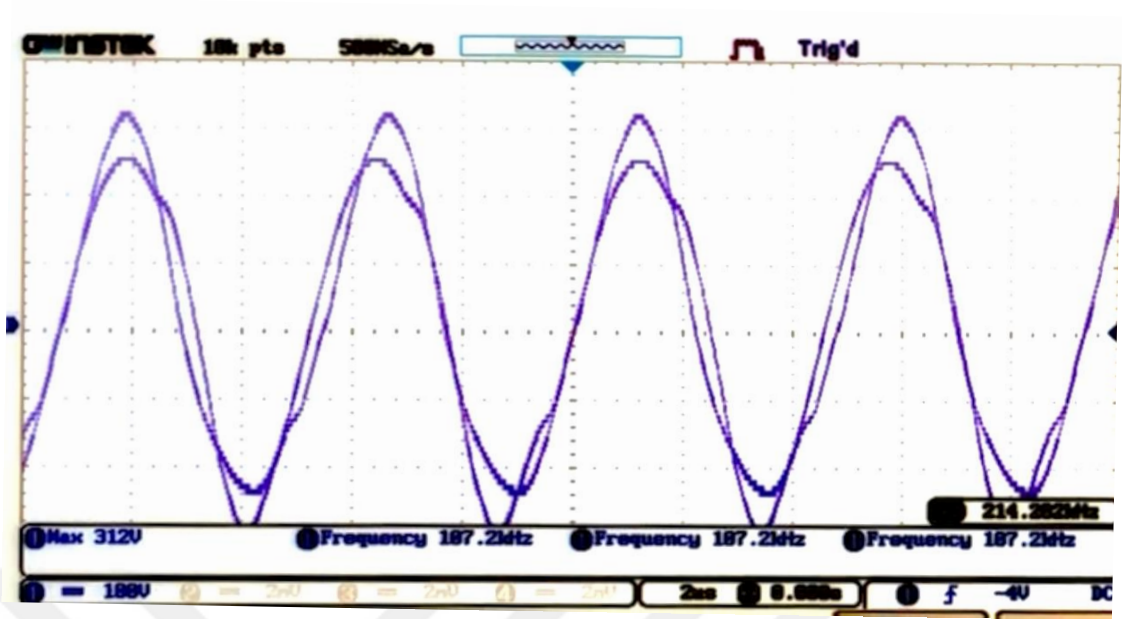
Osiloskobun maksimum ölçüm değeri 600 V olduğu için ölçüm sırasında transformatör primer sargısına maksimum 13 V uygulanmıştır. Fakat gözlemler sırasında primer sargıya 30 V potansiyel uygulanmış ve ~1.4 kV gerilim oluşması sağlanmıştır.



Şekil 4.3. Transformatörlerin sırayla yüksek voltaj üretmesi için MOSFET'lere uygulanan sinyal



Şekil 4.4. Bir nolu MOSFET'in Gate ucuna ulaşan sinyalin osiloskop görüntüsü



Şekil 4.5. Bir nolu transformatörün çıkış ucu ile nötr uç arasında oluşan gerilim (107 kHz, ~600 V)

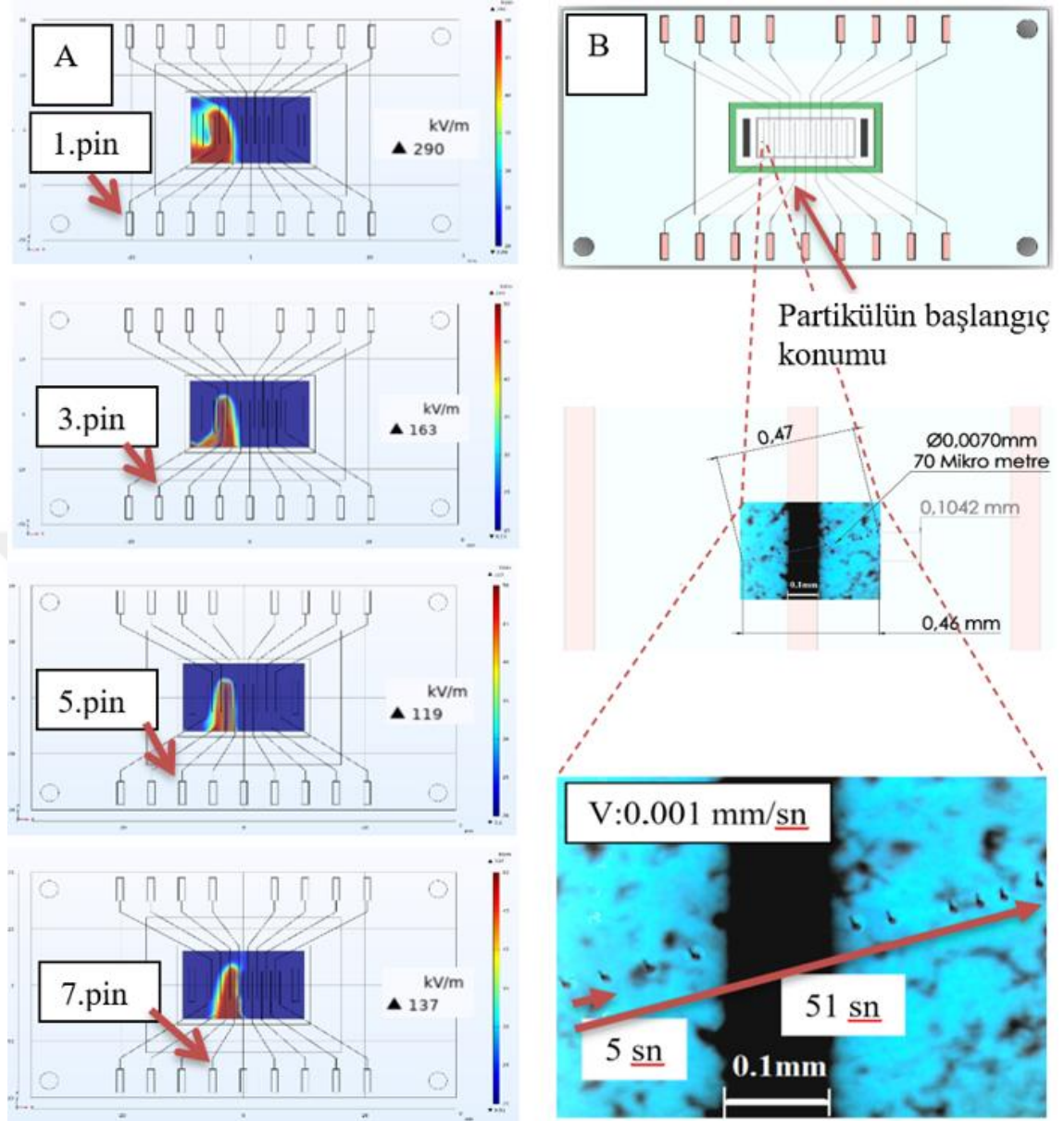
Çizelge 4.1. Elektrotlara uygulanan voltaj değerleri ve partikülün uzaklığına göre oluşması öngörülen elektrik alan şiddeti değerleri

Transformatör primer sargısına uygunanan potansiyel fark	Transformatörün gerilim yükselme çarpanı	Sekonder sargıda oluşan gerilim	PCB üzerinde bulunan partiküllerin en yakın elektrotta olası uzaklıkları	Partiküle etkiyen Elektrik alan şiddeti	PCB materyali FR4' ün dielektrik dayanım değerine göre % değer
(V)	($N_{\text{sekonder}}/N_{\text{primer}}$)*k	(V)	(mm)	(kV/mm)	20MV/m=20(kV/mm) (kV/mm)
8	47	376	0.15	2.51	% 12.53
8	47	376	0.25	1.50	% 7.52
8	47	376	0.5	0.75	% 3.76
8	47	376	1	0.38	% 1.88
8	47	376	2	0.19	% 0.94
9	47	423	0.15	2.82	% 14.10
9	47	423	0.25	1.69	% 8.46
9	47	423	0.5	0.85	% 4.23
9	47	423	1	0.42	% 2.12
9	47	423	2	0.21	% 1.06
13	47	611	0.15	4.07	% 20.37
13	47	611	0.25	2.44	% 12.22
13	47	611	0.5	1.22	% 6.11
13	47	611	1	0.61	% 3.06
13	47	611	2	0.31	% 1.53
30	47	1410	0.15	9.40	% 47.00
30	47	1410	0.25	5.64	% 28.20
30	47	1410	0.5	2.82	% 14.10
30	47	1410	1	1.41	% 7.05
30	47	1410	2	0.71	% 3.53
300	47	9000	2	20,00	% 100

*Veri çubuklarının oluşabilmesi için girilen ulaşılabilir maksimum değerler

4.4. Lineer Partikül Hareketinin Elde Edilmesi

Partiküllerin lineer hareket etmesini sağlamak amacıyla elektrotları paralel dizilen PCB-1'in sırasıyla 1,3,5 ve 7 nolu elektrotlarına 200 ms arayla, 500 ms boyunca 100 kHz frekanslı ~1.4 kV potansiyelin uygulandığı senaryoya göre elektrik alan yer değişimi Şekil 4.5.'deki gibi elde edilmiştir. Elektrik alan şiddetleri, $t_1 = 0.01$ s'de 290 kV/m, $t_2 = 0.71$ 'de 163 kV/m, $t_3 = 1.41$ 'de 119 kV/m ve $t_4 = 2.11$ 'de 137 kV/m olarak elde edilmiştir (Şekil 4.6.).

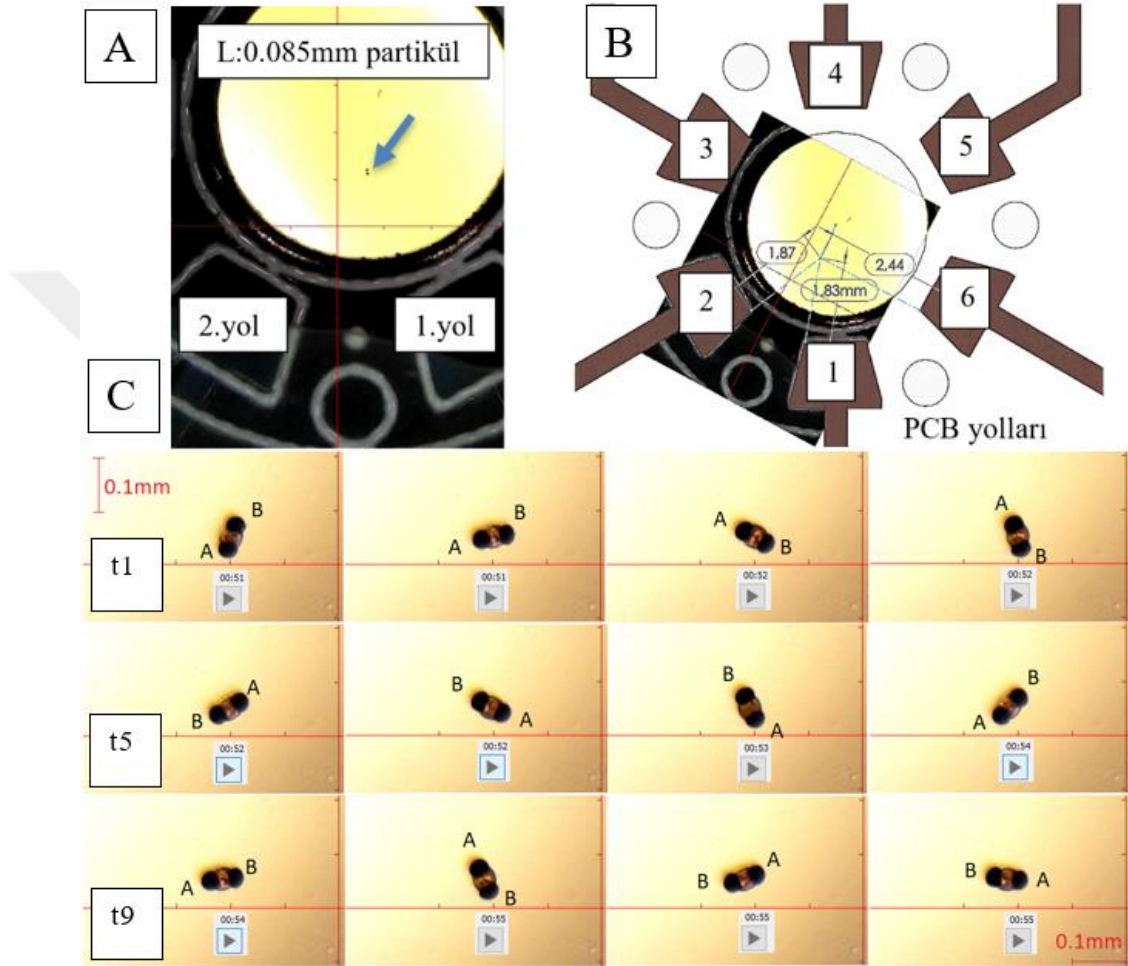


Şekil 4.6. a) TW-DEP etkisinin Comsol yazılımı ile gösterimi; **b)** Kolajen partikülünün PCB üzerindeki başlangıç konumu, partikülün büyüklüğü ve 5. ve 51. saniyeler sonunda partikülün kat ettiği mesafeler

Çözelti haznesinde $<200 \mu\text{m}$ boyutlarındaki partiküller bulunmakta iken uygulanan bu enerjilendirme senaryosu partiküllerde, sağa doğru tekrar eden ani hızlanma, yavaşça ilerleme, durma ve hafifçe geriye gitme karakterinde bir hareketi tetiklemiştir. 70 mikron çapında bir gövdesi ve ince bir uzantı ile damla formunda görülen bir partikülün 51 saniyede 0.47 mm lineer hareketine dayanarak $\sim 10 \mu\text{m/s}$ ortalama hız ölçülmüştür. Partiküllerin, uzaktaki bir elektrot aktifken yavaş yakındaki elektrot aktifken hızlı hareket ettiği ve benzer boyutlardaki partiküllerin yaklaşık olarak aynı hareket karakterini sergilediği gözlenmiştir. Fakat yayılmış ağsı görünümlü partiküller çok daha yavaş hareket etmiştir.

4.5. Rotasyonel Partikül Hareketinin Elde Edilmesi

Rotasyonel hareket elde etmek amacıyla elektrotları dairesel dizilen PCB-2'nin sırasıyla, 1, 2 ve 6 numaralı yollarına 100 ms arayla 800 ms boyunca 100 kHz frekans ile ~1.4 kV potansiyelin uygulandığı senaryoda, elektrik alan yön değişimlerinin ~85 µm boyundaki partiküle 120 devir/dakika hızla rotasyonel hareket yaptırdığı gözlenmiştir (Şekil 4. 7.).

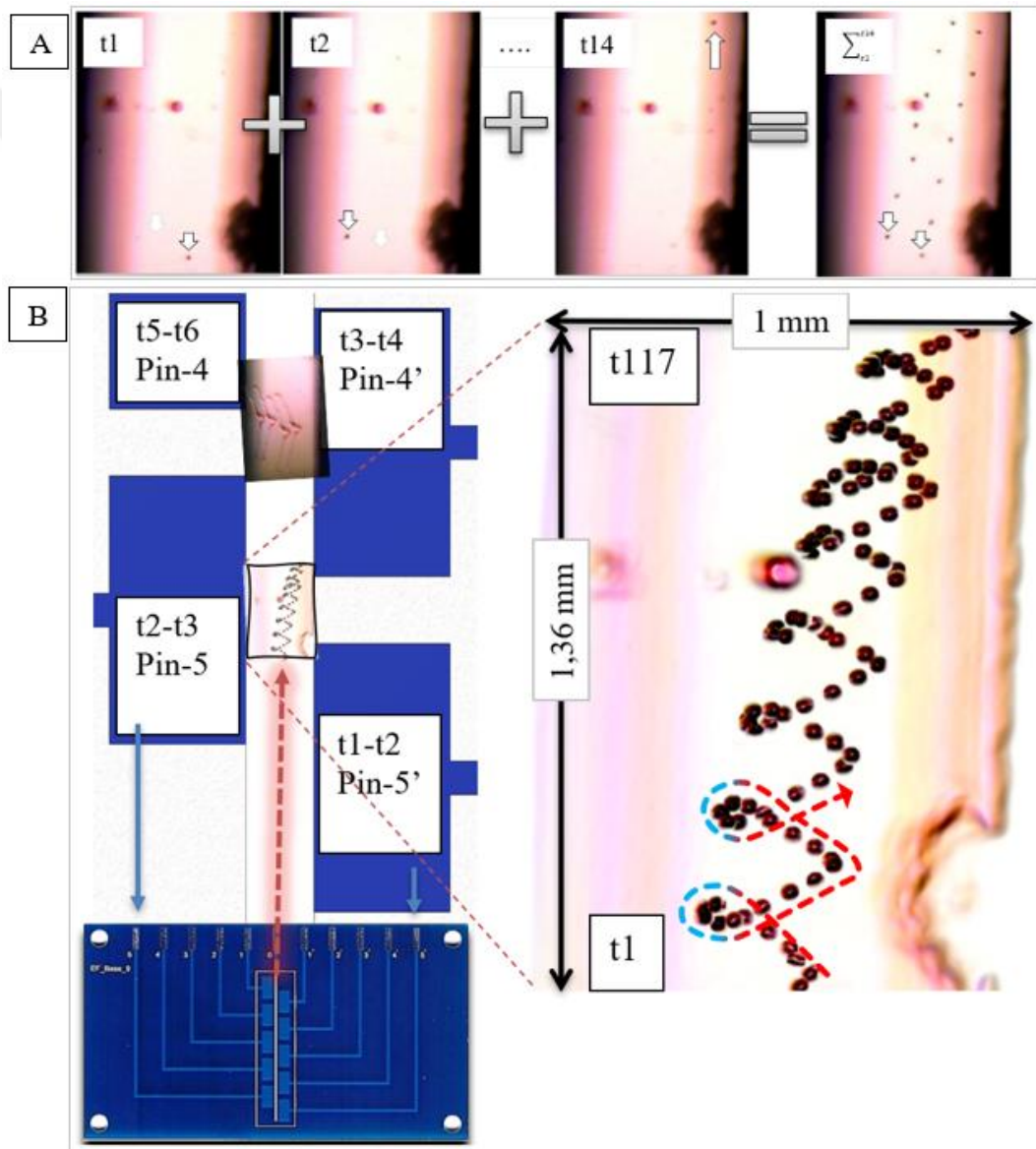


Şekil 4.7. a) PCB-2 üzerinde kolajen partikülünün konumu; b) Partikülün elektrotlara uzaklıkları; c) Partikülün, konum değiştiren elektrik alan etkisi ile kendi ekseninde dönüşü

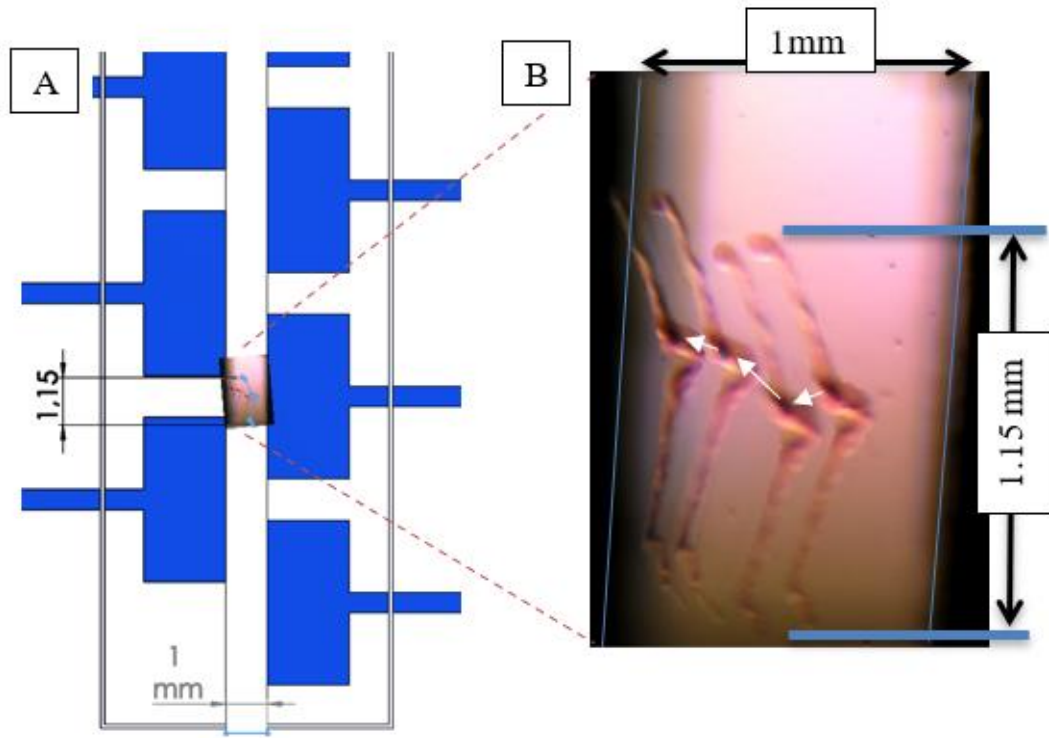
Frekans kademeli düşülürken 90 kHz'e ulaşıldığında partikülün hareket etmediği gözlenmiş fakat 80, 70 ve 60 kHz'e düşürülmesi ile 100 kHz'ye oranla yavaş olsa da tekrar dönüşe başlamış ve 20 kHz'de tamamen durmuştur. 100 kHz frekans uygulanırken transformatöre uygulanan 25 V DC potansiyel, 22 V DC'ye düşürüldüğünde de dönüş hızı fark edilir seviyede azalmıştır.

4.6. Değişken Doğrultulu Partikül Hareketinin Elde Edilmesi

Değişken doğrultulu hareket elde etmek amacıyla elektrotları çapraz dizilimle yerleştirilen PCB-3'ün sırasıyla, 5, 5', 4' ve 4 numaralı yollarına 100 ms arayla 800 ms boyunca 100 kHz frekans ile ~1.4 kV potansiyelin uygulandığı senaryoda, elektrik alan yön değişimlerinin partiküle “W” harfine benzer şekilde bir hareket yaptırdığı gözlenmiştir. Yaklaşık 30 μm çapındaki partikülün 1.36 mm öteye taşınmasının 14 saniye sürdüğü gözlemine dayanarak ortalama hızının 0.097 mm/s (~100 $\mu\text{m/s}$) olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.8.). Ayrıca çalışmada uygulanan potansiyel farkın ~1 mm boyutlarındaki partikülleri de hareket ettirecek seviyede etkili olduğu gözlenmiştir. Yaklaşık 1.15 mm boyundaki bir partikülün ~1 mm mesafeyi 10 saniye içinde kat ettiği gözlemine dayanarak partikülün ortalama hızı 100 $\mu\text{m/s}$ olarak ölçülmüştür (Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. a) Partikül hareketlerinin üst üste eklenmesi ile oluşturulan görsel; **b)** Partikülün 14 saniye boyunca PCB üzerindeki konumları ve ölçüleri



Şekil 4.9. a) Partikülün PCB üzerindeki konumunu tarif eden çizim; **b)** Partikülün 8 saniye içinde bulunduğu dört farklı konumun üst üste getirilmesi ile oluşan görsel

5. TARTIŞMA

Doku modeli geliştirilmesi için DEP etkisi kullanılması yönüyle bu tez çalışmasına benzeyen güncel bir çalışmada Chen vd. (2021) kolajeni 2D zeminde sabit bir adezyon materyali olarak kullanmışlardır. DEP etkisi ise hepatositlerin planlanan şekilde konumlandırılması için kullanılmıştır. Çalışmada kolajen zeminin üstündeki GelMA hidrojelindeki hepatositlerin statik DEP etkisi ile doğal mikro mimariye uygun konumlarda sabit tutulması sağlanmıştır (Chen vd. 2021). Bu tez çalışmasında ise DEP etkisi, adezyon ortamını mikro kolajen partikülleri ile deterministik bir şekilde inşa etmek için kullanılmıştır. Bu hedefin gerekçesi; adezyon ortamı geometrisinin tasarlanmış bir formda olmasının hücrelerin doğal fenotiplerini sergilemeye daha az enerji ve zaman harcamalarına imkân sağlayacağını düşünülmesidir. Bu düşünce doğrultusunda, mikro yapı inşası sürecinde ihtiyaç olacak kolajen hareketi yönetimi konusunda DEP etkisi kontrolünün başarımını araştırmak üzere üç elektrot ve bir elektronik devre tasarlanarak partikül hareketleri incelenmiştir. Kolajen partiküllerinin bu metotla hareket ettirildiği başka bir çalışmaya literatürde rastlanmadığı için, karşılaştırmalar hücrelerin hareket ettirildiği çalışmalar ile yapılmıştır.

5.1. Lineer Partikül Hareketinin Değerlendirilmesi

Literatürde hücreleri ayırtmak için kullanılmış TW-DEP düzeneklerinde olduğu gibi bu çalışmada da bir dizi paralel iletkenle sırayla potansiyel fark uygulanmış ve faz değişimi doğrultusunda partikül hareketi gözlenmiştir. Sağlıklı bir karşılaştırma yapabilmek için partikül hareketini pompayla değil TW-DEP etkisi ile sağlayan çalışmalar araştırılmış ve yayınlarında partikül hızına yer verildiği için Morgan vd. (1997)'nin çalışması örnek olarak seçilmiştir. Ekibin çalışmasında izolasyon katmanı ile kaplı, 10 µm genişlikte 10 µm aralıkla dizilmiş 1000 adet elektrot bulunduran elektrot dizgisine 10 V @ 500 kHz frekanslı bir sinyali 4 faz (0°, 90°, 180°, 270°) olarak iletilmiştir. Partikül olarak tavşan kanından elde edilen eritrosit (~7 µm) ve lökositler (~12-17 µm) kullanılmıştır (Morgan vd. 1997). Bu tez çalışmasında ise lineer hareketin gözlemlendiği PCB-1, 100 µm genişlikli 17 adet bakır elektrotun 650 µm aralıkla dizildiği bir plaka olarak imal edilmiştir. Elektrotlara uygulanan potansiyel, bulgular bölümünde PCB-1 de anlatıldığı şekilde, özetle ~1.4 kV @ 100 kHz sinyal şeklinde olmuştur. Morgan vd. (1997) eritrositler için 32 µm/s, lökositler için 20 µm/s ortalama hız değerleri ölçmüşlerdir. Bu tez çalışmasında ise 70 µm çapa sahip kolajen-tip-I proteini partikülü için 10 µm/s ortalama hız ölçülmüş ve frekans değeri düşürüldükçe partikülün yavaşladığı gözlenmiştir.

Hücrelerin planlanan desende yapılar oluşturması için DEP etkisinin kullanıldığı bir çalışmada Huan vd. preosteoblast ve fibroblastları, altıgen petek formunda tasarladıkları mimari yapıda toplamak için 10 V @ 500 kHz frekanslı sinyali kullanmışlardır. Çalışmada farklı frekans değerlerini değerlendiren ekip en etkili frekans değerini 500 kHz olarak bulmuşlar ve frekansın artırılması ile DEP kuvvetinin azaldığı bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında tasarlanan düzeneğin literatürdeki benzerlerinden temel farkı elektrot boyutları ve buna bağlı olarak uygulanan potansiyel farkın daha büyük olmasıdır. Bu fark, doku iskelesi mikro mimari yapısının hızlı inşa edilebilmesi için boyut hassasiyeti düşük olan bölgelerde $\sim 100\text{-}300\ \mu\text{m}$ büyüklükte partiküllerin de kullanılabilmesine izin veren bir tasarımın hedeflenmesinden kaynaklanmıştır. DEP uygulamalarında partikülün elektrik alan gradyanı içinde (dolayısıyla elektrotların arasında) kalması gerektiği için elektrot aralıkları geniş tutulmuştur. Öte yandan DEP kuvveti, elektrotlar arasındaki mesafenin küpü ile azalırken, elektrotlara uygulanan potansiyelin ancak karesi kadar artmaktadır. Bu sebeple partikülü hareket ettirebilecek DEP kuvveti seviyesine ulaşabilmek için yüksek potansiyel fark uygulamak gerekmiştir. İhtiyaç duyulacak potansiyel fark seviyesini deneysel olarak bulabilmek için geniş voltaj aralığında çalışabilecek bir düzenek tasarlanmıştır. Uygulanacak potansiyel farkın üst limitini elektrotların dielektrik dayanımı belirlemiştir. Elektrotların bu uygulama için yeterince yüksek bir dielektrik dayanım limitine ($20\ \text{kV/mm}$) sahip FR-4'ten imal edilmesi tercih edilmiştir. Dielektroforezin analize yönelik uygulamalarında da tasarıma dair temel parametre partikül boyutları olmuştur. Analize tabi partiküllerin $1\text{-}20\ \mu\text{m}$ çaplarındaki hücreler ve daha da küçük DNA, enzim ve proteinler gibi moleküller olması elektrot tasarımının mikro ve/veya nano ölçek boyutuna küçülmesine imkân vermektedir. Bu sebeple mikro ölçekli bir tasarım yapmak potansiyel farkı yükseltmekten daha avantajlı bir yaklaşım olarak benimsenmiştir. Bu temele dayalı olarak, Morgan vd. (1997)'nin çalışmasından farklı pek çok çalışmada da $5\text{-}10\ \text{V}$ gibi düşük voltajlar ile çalışmıştır. Bu çalışmalarda kırmızı kan hücrelerini trombositlerden ayıran, canlı hücreleri ölü hücrelerden ayıran, kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayıran ve tek bir maya hücresini diğer hücreler arasından seçip izole eden uygulamalar yapılabilmektedir (Gascoyne ve Vykoukal 2004; Shafiee vd. 2010; Esfandarypour vd. 2017).

Literatürdeki çalışmalarda kullanılan partiküller ile bu tez çalışmasında kullanılan partiküllerin boyut farklılıklarına rağmen elektrik alan şiddetinin partiküle uygun seviyede ayarlanabilmesi sağlanarak literatürdeki partiküller ile yakın sayılabilecek ilerleme hızları elde edilmiştir. Partiküllerin TW-DEP uygulaması etkisi ile ani hızlanmalar ve duraksamalar gözlenecek şekilde hareket ettikleri görülmüştür. Fakat literatürdeki çalışmalarda partikül hareketinin lineer olması ve ayrıştırma oranları dışında karakteri hakkında veri paylaşılmadığı için karşılaştırma yapılamamıştır.

5.2. Rotasyonel Partikül Hareketinin Değerlendirilmesi

Literatürde bu tez çalışmasındaki gibi kolajen partikülünün DEP etkisi ile rotasyonel hareket ettirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple, hücrelerin DEP etkisiyle rotasyonel hareket ettirildikleri çalışmalar ile karşılaştırma yapılmıştır.

Gagnon vd. (2011) DEP etkisi altındaki çeşitli hücrelerin farklı rotasyonel hız değerlerine sahip olduğunu gözlemişlerdir. Bu davranışın hücrelerin sağlığı hakkında bilgi sunabileceği düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında ise sadece kolajen tip-1 kullanıldığı için materyal farklılığına bağlı dönüş hızı farkı gözlenmemiştir. Fakat benzer ölçüde ve şekildeki iki partikülün aynı hızla döndüğü gözlenmiştir. Partiküllerden birisi

bulgular bölümünde paylaşılmıştır. Soffe vd. (2015) ise çalışmalarında sığır serum albümini (BSA) ile kaplanmış *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinden oluşan bir süspansiyon kullanmışlardır. Çalışmada elektrotlara 10 V AC @ 10 MHz sinüs dalga sinyal uygulandığında hücrelerin elektrotlar etrafında toplanıp hareketsiz kaldıkları, frekans 5 MHz arttırıldığında paralel dizilimin elektrot yüzeyine dik olacak şekilde değişmeye başladığı ve 36 MHz seviyesine ulaşıldığında hücrelerin kendi eksenleri etraflarında 0.5 ila 1.5 d/s hızla dönmeye başladıkları rapor edilmiştir (Soffe vd. 2015). Benzer davranış bu çalışmada da gözlenmiştir. PCB-2 üzerindeki partikül, frekans 20 kHz iken bir elektrota yaklaşırken frekans arttırıldıkça hızlanarak dönüş yapmaya başlamıştır. Fakat Soffe vd. (2015)'nin çalışmasından farklı olarak 20-80 kHz aralığında rotasyon gözlenmekteyken 90 kHz de ani durma ve 100 kHz'de tekrar ani hızlanma gözlenmiştir. Ani durma davranışının tam sebebi çözümlenemese de PWM ve PPM frekanslarının partiküle etkiyen net DEP kuvvetinin sıfır olacağı şekilde çakışmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

5.3. Değişken Doğrultulu Partikül Hareketinin Değerlendirilmesi

PCB-3 düzeneğinde DEP etkisinin çözelti içindeki partiküllere manevra yaptırma kabiliyeti gözlenmiştir. Bu amaçla elektrotlar değişken doğrultularda DEP kuvveti etkilecek şekilde karşılıklı çapraz konumlarda dizilmiştir. Elektrotların enerjilendirilmesi ile partiküllerin Şekil 4.7'de görüldüğü gibi “W” harfine benzer bir yolda ilerleyecek şekilde hareket sergiledikleri gözlenmiştir. Şekilde, partikülün izlediği yolu gösteren kesikli çizginin solundaki düğüm noktalarında (mavi) ilerleme hızın durma noktasına yaklaştığı ve çizginin geri kalanında (kırmızı) hızlandığı gözlenmiştir. Bu davranış, Arduino ile üretilen 800 ms çalışma ve 100 ms durma süreli PPM sinyali ile uyumludur. Partikülün ilerleme doğrultusu ise elektrotların enerjilendirilme sırası ile uyumlu bulunmuştur. PCB-1'de gözlenen 70 mikron çapındaki partikülün yarısı ölçüdeki çapı ile ~13 kat az hacme sahip olan bu partikülün, diğerinin 10 $\mu\text{m/s}$ olan ilerleme hızından 10 kat daha hızlı olması anlamlı bulunmuştur.

PCB-3 üzerinde gözlenen ve ~1.15 mm boyutu ile diğer parçalara göre oldukça büyük olan “L” şeklindeki partikülün de bulunduğu konuma uygun şekilde aşağı-yukarı sıçramalar yaparak sol tarafa itilirken gözlenmesi üretilen yüksek elektrik alan şiddeti ile büyük partiküllerin hareket ettirilebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte partiküllere manevra yaptırılabilir olması üretim haznesi içinde konumuna ulaşmış sabit tutulan partiküllerin çevresinden geçilmesi için TW-DEP etkisinin kullanılmasının mümkün olabileceğini göstermiştir.

5.4. Laboratuvar Ölçeğinde Üretimden Endüstriyel Ölçekte Üretime Geçişin Gerekli Yatırımlar ve Önerilen Metodun Bu Süreçteki Olası Katkıları

Doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalar yüksek bütçeleri sebebi ile kolayca yaygınlaşamamaktadır (De Pieri vd. 2021). Öte yandan, bu tip çalışmalar için gereken donanım ve sarf malzemelerine (laminer akışlı kabinler, steril filtreler, hücre hatları vb.) ulaşmak giderek kolaylaşmaktadır. Yazılım alanında da bu gelişmeleri destekleyen açık kaynak kodlu ürünler mevcuttur (Bharadwaj ve Verma 2021). Böylece

etik konular ve hijyen koşulları açısından çeşitli yetki belgelerine sahip olmaları şartlarıyla laboratuvar, klinik ve hastane gibi ortamlarda bazı doku ürünlerinin üretilmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Doku mühendisliği ürünleri insan kullanımına sunulmadan önce otoriteler tarafından uzun bir kontrol sürecinden geçmektedir. Bu sürecin uzunluğu ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte regülasyon içeriği çoğunlukla benzerdir. Otorite onayından önce ise genellikle konsept geliştirme, primitif deneyler, tekrar eden *in vitro* laboratuvar çalışmaları ve *in vivo* hayvan deneyleri gibi çalışmalar yürütülmektedir (Martin vd. 2008). İnsan deneyleri için çeşitli izinlerin alınması ise ancak hayvan deneyleri başarıyla tamamlandıktan sonra başlayabilir. Deneylerin planlanması, etik izinlerinin alınması, uygun gönüllülerin bulunması gibi süreçler de başarıyla geçildikten sonra deney grupları genişletilip etkileri izlenebilir. Nihayetinde ürünün seri üretime alınması hukuken mümkün olabilir. Fakat öncesinde standartlara uygunluk belgelerinin alınabilmesi için fiziki yatırımlar da gerektiren bir kalite sistemi kurulması gerekmektedir (Chen vd. 2018).

Tüm bu aşamalar, doku mühendisliği kapsamında geliştirilmiş teknik metotların doğruluğunu kontrol eden, insan hayatının korunmasına yönelik sosyal, hukuki ve ticari metotlar olarak düşünülebilir. Dolayısı ile geliştirilen bir metodun yaygın kullanılarak nihai sonuca ulaşmasının arkasında büyük bir yatırım vardır. Bu tez çalışmasının sosyal motivasyonu da bu yatırım miktarının azaltılabilmesi için basit ilkelerin yüksek hassasiyetle uygulanmasının bir çözüm olabileceğinin düşünülmesi olmuştur.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, elektrik alanın kolajen partiküllerine etki ettirilmesi yoluyla doku iskelesi üretiminin mümkün olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla bir elektronik devre ve farklı elektrot dizilimine sahip üç PCB tasarlanmıştır. Çeşitli dokulardaki yaygın bulunurluğu sebebi ile doku iskelesi materyali olarak kolajen tip-I kullanılmıştır.

Lineer, dairesel ve çapraz yerleşimli elektrotlar belirlenen sırayla enerjilendirilerek TW-DEP etkisi yaratılmıştır. Kolajen partikülleri kapalı bir çözelti haznesine alınarak PCB'lerin üzerine bırakılmıştır. Bu, modüler çalışma tarzı, çalışmanın temel hedeflerinden birisi olan yaygın kullanımın sağlanabilmesi için özellikle tercih edilmiştir. Lineer yerleşimli PCB-1'de gözlenen $\text{Ø}70 \mu\text{m}$ çapındaki partikül-1'in $10 \mu\text{m/s}$ hızla lineer olarak hareket ettiği, dairesel yerleşimli PCB-2'de gözlenen $L:85 \mu\text{m}$ boyutundaki partikül-2'nin 120 d/dak hızla kendi ekseninde rotasyonel hareket ettiği ve çapraz yerleşimli PCB-3'te gözlenen $\text{Ø}30 \mu\text{m}$ çapındaki partikül-3'ün de $100 \mu\text{m/s}$ hızla hareket ettiği gözlenmiştir. PCB-1'de çoklu kolajen partikülü hareketleri, PCB-2 ve 3'te ise tek partikül hareketi gözlenmiştir. Kolajen partiküllerinin elektriksel geçirgenliği bulunduğu ortamdan düşük olduğu için partiküller, nDEP etkisi ile çevrelerindeki elektrik alan gradyanının sık olduğu bölgenin tersi yönde hareket etmişler yani potansiyelin uygulandığı elektrottan uzaklaşmışlardır.

Partiküllerin lineer ve rotasyonel hareketler dışında planlanan görece karmaşık hareketleri de yapabilmiş olması partikül hareketliliği ve elektrot tasarımı arasında öngörülebilir, kuvvetli bir ilişki olduğu göstermiştir. Partikül boyutunun da bilinmesi halinde uygulanması gereken potansiyel fark şiddetinin de tespit edilebilmesi mümkün görülmektedir. Partiküllerin sıvı yüzeyine yakın seviyede yüzdükleri gözlemine dayanarak ileri çalışmalarda elektrotların çözeltinin üstünde bulunduğu ve böylece üst katmanda istenilen bölgelerde lokal konsantrasyon artışları sağlanan bölgelere çapraz bağlayıcılar uygulanarak 3 boyutlu inşa denemeleri yapılabileceği düşünülmüştür. Ayrıca çeşitli hücre ve yapı moleküllerini bulunduran bir düzenek ile materyallerin ihtiyaca göre seçilip taşınması yoluyla hücre tipi geçişkenliğine sahip bir doku iskelesi oluşturmak mümkün görülmektedir.

Bu çalışmada edinilen deneyimler doğrultusunda çeşitli doku modellerinin benzetimlerini yapmaya yönelik bir cihaz tasarlanarak "Biyolojik Materyal Yönlendirme Cihazı" başlığı ve 2021/019014 başvuru numarasıyla Türk Patent Enstitüsüne faydalı model başvurusu yapılmıştır. Önerilen cihaz ile kolajenin steril kapalı bir paket içinde elektrik alan üreten bir plakanın üzerine koyularak hücre hatları için bir temel teşkil edecek şekilde organize edilmesi planlanmıştır. Böylece dielektroforezin kullanımı açısından yeni bir araç sunulmuştur.

7. KAYNAKLAR

- Abd-Khorsand, S., S. Saber-Samandari and S. Saber-Samandari 2017. Development of nanocomposite scaffolds based on TiO₂ doped in grafted chitosan/hydroxyapatite by freeze drying method and evaluation of biocompatibility. *International journal of biological macromolecules*, 101: 51-58.
- Abhari, S., M. Eisenback, H. J. Kaplan, E. Walters, R. S. Prather and P. A. Scott 2018. Anatomic studies of the miniature swine cornea. *The Anatomical Record*, 301(11): 1955-1967.
- Adamiak, K. and A. Sionkowska 2020. Current methods of collagen cross-linking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161: 550-560.
- Agarwal, G. (2016). DDRs and collagen fibrillogenesis. Discoidin Domain Receptors in Health and Disease. New York, Springer: 23-56.
- Andersen, V., J. Sonne, S. Sletting and A. Prip 2000. The volume of the liver in patients correlates to body weight and alcohol consumption. *Alcohol and Alcoholism*, 35(5): 531-532.
- Andia, I., A. Perez-Valle, C. Del Amo and N. Maffulli 2020. Freeze-Drying of Platelet-Rich Plasma: The Quest for Standardization. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18): 6904.
- Angammana, C. J. and S. H. Jayaram 2016. Fundamentals of electrospinning and processing technologies. *Particulate Science and Technology*, 34(1): 72-82.
- Bahrieh, G., M. Erdem, E. Özgür, U. Gündüz and H. Külah 2014. Assessment of effects of multi drug resistance on dielectric properties of K562 leukemic cells using electrorotation. *RSC advances*, 4(85): 44879-44887.
- Bak, S. Y., S. W. Lee, C. H. Choi and H. W. Kim 2018. Assessment of the influence of acetic acid residue on type I collagen during isolation and characterization. *Materials*, 11(12): 2518.
- Barker, C. F. and J. F. Markmann 2013. Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4): a014977.
- Basha, R. Y., S. K. TS and M. Doble 2015. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 57: 452-463.
- Bharadwaj, T. and D. Verma 2021. Open source bioprinters: Revolutionizing the accessibility of biofabrication. *Bioprinting*: e00155.
- Bishop, E. S., S. Mostafa, M. Pakvasa, H. H. Luu, M. J. Lee, J. M. Wolf, G. A. Ameer, T.-C. He and R. R. Reid 2017. 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes & diseases*, 4(4): 185-195.

- Blackstone, B. N., S. C. Gallentine and H. M. Powell 2021. Collagen-based electrospun materials for tissue engineering: a systematic review. *Bioengineering*, 8(3): 39.
- Bohigas, X. and J. Tejada 2009. Dielectric properties of acetic acid and vinegar in the microwave frequencies range 1–20 GHz. *Journal of food engineering*, 94(1): 46-51.
- Bosman, F. T. and I. Stamenkovic 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(4): 423-428.
- Bozec, L., G. van der Heijden and M. Horton 2007. Collagen fibrils: nanoscale ropes. *Biophysical journal*, 92(1): 70-75.
- Bumann, A., R. Carvalho, C. Schwarzer and E. Yen 1997. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *European journal of orthodontics*, 19(1): 29-37.
- Butreddy, A., K. Y. Janga, S. Ajjarapu, S. Sarabu and N. Dudhipala 2021. Instability of therapeutic proteins—An overview of stresses, stabilization mechanisms and analytical techniques involved in Lyophilized proteins. *International journal of biological macromolecules*, 167: 309-325.
- Bürck, J., S. Heissler, U. Geckle, M. F. Ardakani, R. Schneider, A. S. Ulrich and M. Kazanci 2013. Resemblance of electrospun collagen nanofibers to their native structure. *Langmuir*, 29(5): 1562-1572.
- Carver, W., M. Nagpal, M. Nachtigal, T. Borg and L. Terracio 1991. Collagen expression in mechanically stimulated cardiac fibroblasts. *Circulation research*, 69(1): 116-122.
- Cerrolaza, M., V. Duarte and D. Garzón-Alvarado 2017. Analysis of bone remodeling under piezoelectricity effects using boundary elements. *Journal of Bionic Engineering*, 14(4): 659-671.
- Chan, W. W., D. C. L. Yeo, V. Tan, S. Singh, D. Choudhury and M. W. Naing 2020. Additive biomanufacturing with collagen inks. *Bioengineering*, 7(3): 66.
- Chang, H.-I. and Y. Wang (2011). Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. *Regenerative medicine and tissue engineering-cells and biomaterials*. P. D. E. (Ed.), InTechOpen: 588.
- Chen, Y.-J., C.-M. Chiou, Y.-W. Huang, P.-W. Tu, Y.-C. Lee and C.-H. Chien 2018. A comparative study of medical device regulations: US, Europe, Canada, and Taiwan. *Therapeutic innovation & regulatory science*, 52(1): 62-69.
- Chen, Y.-S., C.-K. Tung, T.-H. Dai, X. Wang, C.-T. Yeh, S.-K. Fan and C.-H. Liu 2021. Liver-Lobule-Mimicking Patterning via Dielectrophoresis and Hydrogel Photopolymerization. *Sensors and Actuators B: Chemical*: 130159.

- Cheng, X., U. A. Gurkan, C. J. Dehen, M. P. Tate, H. W. Hillhouse, G. J. Simpson and O. Akkus 2008. An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles. *Biomaterials*, 29(22): 3278-3288.
- Cheng, X. and P. M. Pinsky 2013. Mechanisms of self-organization for the collagen fibril lattice in the human cornea. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(87): 20130512.
- Choi, Y.-H., M.-g. Kim, D.-H. Kang, J. Sim, J. Kim and Y.-J. Kim 2012. An electrodynamic preconcentrator integrated thermoelectric biosensor chip for continuous monitoring of biochemical process. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 22(4): 045022.
- Crane, G. M., S. L. Ishaug and A. G. Mikos 1995. Bone tissue engineering. *Nature Medicine*, 1(12): 1322-1324.
- Crapo, P. M., T. W. Gilbert and S. F. Badylak 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12): 3233-3243.
- Çetin, B. and D. Li 2011. Dielectrophoresis in microfluidics technology. *Electrophoresis*, 32(18): 2410-2427.
- Dasgupta, A., N. Sori, S. Petrova, Y. Maghdouri-White, N. Thayer, N. Kemper, S. Polk, D. Leathers, K. Coughenour and J. Dascoli 2021. Comprehensive collagen crosslinking comparison of microfluidic wet-extruded microfibers for bioactive surgical suture development. *Acta Biomaterialia*, 128: 186-200.
- De Pieri, A., Y. Rochev and D. I. Zeugolis 2021. Scaffold-free cell-based tissue engineering therapies: advances, shortfalls and forecast. *Nature Portfolio Journals Regenerative Medicine*, 6(1): 1-15.
- Do, P.-C., E. H. Lee and L. Le 2018. Steered molecular dynamics simulation in rational drug design. *Journal of chemical information and modeling*, 58(8): 1473-1482.
- Drexler, J. W. and H. M. Powell 2011. Dehydrothermal crosslinking of electrospun collagen. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(1): 9-17.
- Duan, B. 2017. State-of-the-art review of 3D bioprinting for cardiovascular tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*, 45(1): 195-209.
- Duval, K., H. Grover, L.-H. Han, Y. Mou, A. F. Pegoraro, J. Fredberg and Z. Chen 2017. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, 32(4): 266-277.
- Esfandyarpour, R., M. J. DiDonato, Y. Yang, N. G. Durmus, J. S. Harris and R. W. Davis 2017. Multifunctional, inexpensive, and reusable nanoparticle-printed biochip for cell manipulation and diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(8): E1306-E1315.

- Fan, D., A. Takawale, J. Lee and Z. Kassiri 2012. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis & tissue repair*, 5(1): 1-13.
- Fan, Z., J. Swadener, J. Rho, M. Roy and G. Pharr 2002. Anisotropic properties of human tibial cortical bone as measured by nanoindentation. *Journal of orthopaedic research*, 20(4): 806-810.
- Fereshteh, Z. (2018). Freeze-drying technologies for 3D scaffold engineering. Functional 3D tissue engineering scaffolds, Elsevier: 151-174.
- Franchi, M., A. Trirè, M. Quaranta, E. Orsini and V. Ottani 2007. Collagen structure of tendon relates to function. *TheScientificWorldJournal*, 7: 404-420.
- Frantz, C., K. M. Stewart and V. M. Weaver 2010. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*, 123(24): 4195-4200.
- Fukada, E. and I. Yasuda 1957. On the piezoelectric effect of bone. *Journal of the physical society of Japan*, 12(10): 1158-1162.
- Gagnon, Z. R. 2011. Cellular dielectrophoresis: applications to the characterization, manipulation, separation and patterning of cells. *Electrophoresis*, 32(18): 2466-2487.
- Gascoyne, P. R. and J. V. Vykoukal 2004. Dielectrophoresis-based sample handling in general-purpose programmable diagnostic instruments. *Proceedings of the IEEE*, 92(1): 22-42.
- Gelse, K., E. Pöschl and T. Aigner 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12): 1531-1546.
- Gilbert, T. W., T. L. Sellaro and S. F. Badylak 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19): 3675-3683.
- Govindan, R., F. Gu, S. Karthi and E. Girija 2020. Effect of phosphate glass reinforcement on the mechanical and biological properties of freeze-dried gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Materials today communications*, 22: 100765.
- Greiner, J. F., M. Gottschalk, N. Fokin, B. Büker, B. P. Kaltschmidt, A. Dreyer, T. Vordemvenne, C. Kaltschmidt, A. Hütten and B. Kaltschmidt 2019. Natural and synthetic nanopores directing osteogenic differentiation of human stem cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 17: 319-328.
- Gunson, D., K. E. Gropp and A. Varela (2013). Bone and joints. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, Elsevier: 2761-2858.
- Gurumurthy, B. and A. V. Janorkar 2021. Improvements in mechanical properties of collagen-based scaffolds for tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 17: 100253.

- Gutsmann, T., G. E. Fantner, J. H. Kindt, M. Venturoni, S. Danielsen and P. K. Hansma 2004. Force spectroscopy of collagen fibers to investigate their mechanical properties and structural organization. *Biophysical journal*, 86(5): 3186-3193.
- Hackett, T. L. and E. T. Osei 2021. Modeling Extracellular Matrix-Cell Interactions in Lung Repair and Chronic Disease. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 10(8): 2145.
- Hasan, A. 2017. Tissue engineering for artificial organs: regenerative medicine, smart diagnostics and personalized medicine. John Wiley & Sons, 705 s.
- Hashimoto, T., T. Wakabayashi, A. Watanabe, H. Kowa, R. Hosoda, A. Nakamura, I. Kanazawa, T. Arai, K. Takio and D. M. Mann 2002. CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *The EMBO journal*, 21(7): 1524-1534.
- Hassan, A., L. Sapir, I. Nitsan, R. T. G. Ben-El, N. Halachmi, A. Salzberg and S. Tzlil 2019. A change in ECM composition affects sensory organ mechanics and function. *Cell reports*, 27(8): 2272-2280. e2274.
- Hernández-Rangel, A. and E. S. Martin-Martinez 2021. Collagen based electrospun materials for skin wounds treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.
- Huang, D. (2021). Engineering Patient-specific Liver Microtissues with Prolonged Phenotypic Maintenance and Disease Modeling Potential, Columbia University City.
- in't Veld, P. J. and M. J. Stevens 2008. Simulation of the mechanical strength of a single collagen molecule. *Biophysical journal*, 95(1): 33-39.
- Jackson, M., P. H. Watson, W. C. Halliday and H. H. Mantsch 1995. Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1270(1): 1-6.
- Jammalamadaka, U. and K. Tappa 2018. Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering. *Journal of functional biomaterials*, 9(1): 22.
- Jones, T. B. 2003. Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation. *IEEE Engineering in medicine and Biology Magazine*, 22(6): 33-42.
- Kalantar Motamedi, Y., M. Peymani, H. Baharvand, M. H. Nasr-Esfahani and A. Bender 2016. Systematic selection of small molecules to promote differentiation of embryonic stem cells and experimental validation for generating cardiomyocytes. *Cell death discovery*, 2(1): 1-8.
- Karra, N., E. Swindle and H. Morgan 2019. Drug delivery for traditional and emerging airway models. *Organs-on-a-Chip*, 1: 100002.

- Karsdal, M. 2019. Biochemistry of collagens, laminins and elastin: structure, function and biomarkers. Academic Press, 8 s.
- Khademhosseini, A. and R. Langer 2016. A Decade of Progress in Tissue Engineering. *Nature protocols*, 11(10): 1775-1781.
- Khalili, M., M. Asadi, H. Kahroba, M. R. Soleyman, H. Andre and E. Alizadeh 2021. Corneal endothelium tissue engineering: An evolution of signaling molecules, cells, and scaffolds toward 3D bioprinting and cell sheets. *Journal of Cellular Physiology*, 236(5): 3275-3303.
- Kim, J. E., S. H. Kim and Y. Jung 2016. Current status of three-dimensional printing inks for soft tissue regeneration. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 13(6): 636-646.
- Kishan, A. P. and E. M. Cosgriff-Hernandez 2017. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(10): 2892-2905.
- Koh, C. J. and A. Atala 2004. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(5): 1113-1125.
- Kordjamshidi, A., S. Saber-Samandari, M. G. Nejad and A. Khandan 2019. Preparation of novel porous calcium silicate scaffold loaded by celecoxib drug using freeze drying technique: Fabrication, characterization and simulation. *Ceramics International*, 45(11): 14126-14135.
- Kumar, B. A. and S. K. Mattoo 2015. Organ transplant & the psychiatrist: An overview. *The Indian journal of medical research*, 141(4): 408.
- Kurugol, S., C. E. Come, A. A. Diaz, J. C. Ross, G. L. Kinney, J. L. Black-Shinn, J. E. Hokanson, M. J. Budoff, G. R. Washko and R. San Jose Estepar 2015. Automated quantitative 3D analysis of aorta size, morphology, and mural calcification distributions. *Medical physics*, 42(9): 5467-5478.
- Latvanlehto, A., M. A. Fox, R. Sormunen, H. Tu, T. Oikarainen, A. Koski, N. Naumenko, A. Shakirzyanova, M. Kallio and M. Ilves 2010. Muscle-derived collagen XIII regulates maturation of the skeletal neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience*, 30(37): 12230-12241.
- Lee, A., A. Hudson, D. Shiwardski, J. Tashman, T. Hinton, S. Yerneni, J. Bliley, P. Campbell and A. Feinberg 2019. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart. *Science*, 365(6452): 482-487.
- Li, M., W. Li, J. Zhang, G. Alici and W. Wen 2014. A review of microfabrication techniques and dielectrophoretic microdevices for particle manipulation and separation. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(6): 063001.

- Li, Z., Y. Su, B. Xie, H. Wang, T. Wen, C. He, H. Shen, D. Wu and D. Wang 2013. A tough hydrogel–hydroxyapatite bone-like composite fabricated in situ by the electrophoresis approach. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(12): 1755-1764.
- Liang, W., X. Yang, J. Wang, Y. Wang, W. Yang and L. Liu 2020. Determination of Dielectric Properties of Cells using AC Electrokinetic-based Microfluidic Platform: A Review of Recent Advances. *Micromachines*, 11(5): 513.
- Lien, S.-M., L.-Y. Ko and T.-J. Huang 2009. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 5(2): 670-679.
- Lima, C., R. De Oliveira, S. Figueiro, C. Wehmann, J. Goes and A. Sombra 2006. DC conductivity and dielectric permittivity of collagen–chitosan films. *Materials chemistry and physics*, 99(2-3): 284-288.
- Linsenmayer, T. (1991). Collagen. Cell biology of extracellular matrix, Springer: 7-44.
- Lorente, S., M. Hautefeuille and A. Sanchez-Cedillo 2020. The liver, a functionalized vascular structure. *Scientific Reports*, 10(1): 1-10.
- Lorenzo, A. C. and E. R. Caffarena 2005. Elastic properties, Young's modulus determination and structural stability of the tropocollagen molecule: a computational study by steered molecular dynamics. *Journal of biomechanics*, 38(7): 1527-1533.
- Macchiarini, P. 2004. Trachea-guided generation: déjà vu all over again? *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 128(1): 14-16.
- Maher, M., M. Castilho, Z. Yue, V. Glattauer, T. C. Hughes, J. A. Ramshaw and G. G. Wallace 2021. Shaping collagen for engineering hard tissues: Towards a printomics approach. *Acta Biomaterialia*, 131: 41-61.
- Maione-Silva, L., E. G. de Castro, T. L. Nascimento, E. R. Cintra, L. C. Moreira, B. A. S. Cintra, M. C. Valadares and E. M. Lima 2019. Ascorbic acid encapsulated into negatively charged liposomes exhibits increased skin permeation, retention and enhances collagen synthesis by fibroblasts. *Scientific reports*, 9(1): 1-14.
- Malmberg, C. and A. Maryott 1956. Dielectric Constant of Water from 00 to 1000 C. *Journal of research of the National Bureau of Standards*, 56(1): 1.
- Mannhardt, I., A. Marsano and A. Teuschl 2021. Perfusion bioreactors for prevascularization strategies in cardiac tissue engineering. *Vascularization for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*: 475-488.
- Martin, I., D. Wendt and M. Heberer 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *TRENDS in Biotechnology*, 22(2): 80-86.
- Martin, J. L., B. J. Norris, E. Murphy and J. A. Crowe 2008. Medical device development: The challenge for ergonomics. *Applied ergonomics*, 39(3): 271-283.

- Matthews, J. A., G. E. Wnek, D. G. Simpson and G. L. Bowlin 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3(2): 232-238.
- McCarthy, I. 2006. The physiology of bone blood flow: a review. *JBJS*, 88(suppl_3): 4-9.
- Mironov, V., T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs and R. R. Markwald 2003. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 21(4): 157-161.
- Miyata, T., T. Taira and Y. Noishiki 1992. Collagen engineering for biomaterial use. *Clinical materials*, 9(3-4): 139-148.
- Morgan, H., N. G. Green, M. Hughes, W. Monaghan and T. Tan 1997. Large-area travelling-wave dielectrophoresis particle separator. *Journal of micromechanics and Microengineering*, 7(2): 65.
- Neff, L. S. and A. D. Bradshaw 2021. Cross your heart? Collagen cross-links in cardiac health and disease. *Cellular Signalling*, 79: 109889.
- Nielsen, S. H., N. Willumsen, S. Brix, S. Sun, T. Manon-Jensen, M. Karsdal and F. Genovese 2018. Tumstatin, a matrikine derived from collagen type IV α 3, is elevated in serum from patients with non-small cell lung cancer. *Translational oncology*, 11(2): 528-534.
- Nimni, M. E. and R. D. Harkness (2018). Molecular structure and functions of collagen. Collagen, CRC Press: 1-78.
- Njoo, M. D. 2000. AA systematic review of autologous transplantation methods in vitiligo. 134(1): 1543-1549.
- O'Brien, F. J., B. A. Harley, I. V. Yannas and L. Gibson 2004. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 25(6): 1077-1086.
- Osada, Y., T. Hashimoto, A. Nishimura, Y. Matsuo, T. Wakabayashi and T. Iwatsubo 2005. CLAC binds to amyloid β peptides through the positively charged amino acid cluster within the collagenous domain 1 and inhibits formation of amyloid fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9): 8596-8605.
- Osidak, E. O., E. P. Kalabusheva, E. V. Alpeeva, S. I. Belousov, S. V. Krashennnikov, T. E. Grigoriev, S. P. Domogatsky, E. A. Vorotelyak and E. S. Chermnykh 2021. Concentrated collagen hydrogels: A new approach for developing artificial tissues. *Materialia*, 20: 101217.
- Pethig, R. R. 2017. Dielectrophoresis: Theory, methodology and biological applications. John Wiley & Sons, 4 s.

- Piacentini, N., G. Mernier, R. Tornay and P. Renaud 2011. Separation of platelets from other blood cells in continuous-flow by dielectrophoresis field-flow-fractionation. *Biomicrofluidics*, 5(3): 034122.
- Pohl, H. A. 1958. Some effects of nonuniform fields on dielectrics. *Journal of Applied Physics*, 29(8): 1182-1188.
- Puyana, V., M. Jiménez-Rosado, A. Romero and A. Guerrero 2020. Polymer-based scaffolds for soft-tissue engineering. *Polymers*, 12(7): 1566.
- R Ibañez, R. I., R. J. do Amaral, R. L. Reis, A. P. Marques, C. M. Murphy and F. J. O'Brien 2021. 3D-printed gelatin methacrylate scaffolds with controlled architecture and stiffness modulate the fibroblast phenotype towards dermal regeneration. *Polymers*, 13(15): 2510.
- Radhakrishnan, S., S. Nagarajan, M. Bechelany and S. N. Kalkura 2020. Collagen based biomaterials for tissue engineering applications: A review. *Processes and phenomena on the boundary between biogenic and Abiogenic nature*: 3-22.
- Ramshaw, J. A., N. K. Shah and B. Brodsky 1998. Gly-XY tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *Journal of structural biology*, 122(1-2): 86-91.
- Ranjit, P. M., C. Anuradha, S. Vishnupriya, G. Girijasankar, K. Girish and Y. Chowdary 2012. Endogenous angiogenesis inhibitor endostatin: an overview. *liver*, 13: 14.
- Ratner, B. D., A. S. Hoffman, F. J. Schoen and J. E. Lemons 2004. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Elsevier, 10 s.
- Rho, J.-Y., T. Y. Tsui and G. M. Pharr 1997. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials*, 18(20): 1325-1330.
- Ricard-Blum, S. 2011. The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1): a004978.
- Rico-Llanos, G. A., S. Borrego-González, M. Moncayo-Donoso, J. Becerra and R. Visser 2021. Collagen type I Biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers*, 13(4): 599.
- Rnjak-Kovacina, J., F. Tang, J. M. Whitelock and M. S. Lord 2018. Glycosaminoglycan and proteoglycan-based biomaterials: current trends and future perspectives. *Advanced healthcare materials*, 7(6): 1701042.
- Roseman, D. A., S.-J. Hwang, N. Oyama-Manabe, M. L. Chuang, C. J. O'Donnell, W. J. Manning and C. S. Fox 2017. Clinical associations of total kidney volume: the Framingham Heart Study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 32(8): 1344-1350.

- Sadat-Shojai, M., M.-T. Khorasani and A. Jamshidi 2016. A new strategy for fabrication of bone scaffolds using electrospun nano-HAp/PHB fibers and protein hydrogels. *Chemical Engineering Journal*, 289: 38-47.
- Sakr, M. A., K. Sakthivel, T. Hossain, S. R. Shin, S. Siddiqua, J. Kim and K. Kim 2021. Recent trends in gelatin methacryloyl nanocomposite hydrogels for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.
- Saksena, R., C. Gao, M. Wicox and A. de Mel 2016. Tubular organ epithelialisation. *Journal of tissue engineering*, 7: 2041731416683950.
- Salvatore, L., N. Gallo, M. L. Natali, A. Terzi, A. Sannino and M. Madaghiele 2021. Mimicking the Hierarchical Organization of Natural Collagen: Toward the Development of Ideal Scaffolding Material for Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9: 258.
- Santini, M. T., G. Rainaldi and P. L. Indovina 2000. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Critical reviews in oncology/hematology*, 36(2-3): 75-87.
- Saraf, S. and R. S. Parihar 2007. Sushruta: the first plastic surgeon in 600 BC. *Int J Plast Surg*, 4(2).
- Scott, I., M. Yamauchi and M. Sricholpech 2012. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays in biochemistry*, 52: 113-133.
- Scott, M. 1983. 32,000 years of sutures. *NATNews*, 20(5): 15-17.
- Shafiee, H., M. B. Sano, E. A. Henslee, J. L. Caldwell and R. V. Davalos 2010. Selective isolation of live/dead cells using contactless dielectrophoresis (cDEP). *Lab on a Chip*, 10(4): 438-445.
- Shieh, S.-J. and J. P. Vacanti 2005. State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery*, 137(1): 1-7.
- Shim, S., K. Stemke-Hale, J. Noshari, F. F. Becker and P. R. Gascoyne 2013. Dielectrophoresis has broad applicability to marker-free isolation of tumor cells from blood by microfluidic systems. *Biomicrofluidics*, 7(1): 011808.
- Soffe, R., S.-Y. Tang, S. Baratchi, S. Nahavandi, M. Nasabi, J. M. Cooper, A. Mitchell and K. Khoshmanesh 2015. Controlled rotation and vibration of patterned cell clusters using dielectrophoresis. *Analytical chemistry*, 87(4): 2389-2395.
- Spoerl, E., M. Huhle and T. Seiler 1998. Induction of cross-links in corneal tissue. *Experimental eye research*, 66(1): 97-103.
- Stipniece, L., S. Wilson, J. Curran, R. Chen, K. Salma-Ancane, P. Sharma, B. Meenan and A. Boyd 2021. Strontium substituted hydroxyapatite promotes direct primary human osteoblast maturation. *Ceramics International*, 47(3): 3368-3379.

- Su, J.-M., L.-Y. Wang, Y.-L. Liang and X.-L. Zha 2005. Role of cell adhesion signal molecules in hepatocellular carcinoma cell apoptosis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(30): 4667.
- Sudhakar, A., H. Sugimoto, C. Yang, J. Lively, M. Zeisberg and R. Kalluri 2003. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(8): 4766-4771.
- Sushruta, S. 1963. An English translation of the Sushruta Samhita, based on original Sanskrit text. Рипол Классик, s.
- Sylvestre, D. J. (2017). Optimizing riboflavin/ultraviolet-a corneal collagen cross-linking for the treatment of progressive keratoconus, Boston University City.
- Szczepaniak, E. W., K. Malliaras, M. D. Nelson and L. S. Szczepaniak 2013. Measurement of pancreatic volume by abdominal MRI: a validation study. *PloS one*, 8(2): e55991.
- Tabata, Y. 2009. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society interface*, 6(suppl_3): S311-S324.
- Taylor, G. I. 1964. Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 280(1382): 383-397.
- Tebyanian, H., M. H. Norahan, H. Eyni, M. Movahedin, S. J. Mortazavi, A. Karami, M. R. Nourani and N. Baheiraei 2019. Effects of collagen/ β -tricalcium phosphate bone graft to regenerate bone in critically sized rabbit calvarial defects. *Journal of applied biomaterials & functional materials*, 17(1): 2280800018820490.
- Tong, Y., Y. Xu, K. Searce-Levie, L. J. Ptáček and Y.-H. Fu 2010. COL25A1 triggers and promotes Alzheimer's disease-like pathology in vivo. *Neurogenetics*, 11(1): 41-52.
- Tryggvason, K. and J. Wartiovaara 2005. How does the kidney filter plasma? *Physiology*, 20(2): 96-101.
- Uquillas, J. A. and O. Akkus 2012. Modeling the electromobility of type-I collagen molecules in the electrochemical fabrication of dense and aligned tissue constructs. *Annals of biomedical engineering*, 40(8): 1641-1653.
- Vacanti, J. P. and C. A. Vacanti (2014). The history and scope of tissue engineering. *Principles of tissue engineering*, Elsevier: 3-8.
- Van Der Rijt, J. A., K. O. Van Der Werf, M. L. Bennink, P. J. Dijkstra and J. Feijen 2006. Micromechanical testing of individual collagen fibrils. *Macromolecular bioscience*, 6(9): 697-702.

- Wahl, D. A., E. Sachlos, C. Liu and J. T. Czernuszka 2007. Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(2): 201-209.
- Wang, X., X. Chen, P. Hodgson and C. Wen 2006. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bovine bone measured by nanoindentation. *Transactions of nonferrous metals society of china*, 16: s744-s748.
- Wenger, M. P., L. Bozec, M. A. Horton and P. Mesquida 2007. Mechanical properties of collagen fibrils. *Biophysical journal*, 93(4): 1255-1263.
- Williams, D. F. 2017. A paradigm for the evaluation of tissue-engineering biomaterials and templates. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 23(12): 926-937.
- Wilson Jr, W. C. and T. Boland 2003. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *The Anatomical Record Part A: discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 272(2): 491-496.
- Wubneh, A., E. K. Tsekoura, C. Ayranci and H. Uludağ 2018. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 80: 1-30.
- Yannas, I., J. Burke, P. Gordon, C. Huang and R. Rubenstein 1980. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *Journal of biomedical materials research*, 14(2): 107-132.
- Yannas, I. and J. F. Burke 1980. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *Journal of biomedical materials research*, 14(1): 65-81.
- Yıldızhan, Y., N. Erdem, M. Islam, R. Martinez-Duarte and M. Elitas 2017. Dielectrophoretic separation of live and dead monocytes using 3D carbon-electrodes. *Sensors*, 17(11): 2691.
- Yu, Y. E., Y. J. Hu, B. Zhou, J. Wang and X. E. Guo 2021. Microstructure Determines Apparent-Level Mechanics Despite Tissue-Level Anisotropy and Heterogeneity of Individual Plates and Rods in Normal Human Trabecular Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 36(9): 1796-1807.
- Zeugolis, D. I., S. T. Khew, E. S. Yew, A. K. Ekaputra, Y. W. Tong, L.-Y. L. Yung, D. W. Hutmacher, C. Sheppard and M. Raghunath 2008. Electro-spinning of pure collagen nano-fibres—just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials*, 29(15): 2293-2305.
- Zhang, B., X. Yan, H.-W. He, M. Yu, X. Ning and Y.-Z. Long 2017. Solvent-free electrospinning: opportunities and challenges. *Polymer Chemistry*, 8(2): 333-352.
- Zhang, H., H. Chang and P. Neuzil 2019. DEP-on-a-chip: Dielectrophoresis applied to microfluidic platforms. *Micromachines*, 10(6): 423.

- Zhang, Y., T. Lei, C. Tang, Y. Chen, Y. Liao, W. Ju, H. Zhang, B. Zhou, R. Liang and T. Zhang 2021. 3D printing of chemical-empowered tendon stem/progenitor cells for functional tissue repair. *Biomaterials*, 271: 120722.
- Zhang, Y., Z. Qin, Z. Qu, M. Ge and J. Yang 2020. Cadherin-based biomaterials: Inducing stem cell fate towards tissue construction and therapeutics. *Progress in Natural Science: Materials International*, 30(5): 597-608.
- Zheng, Z., D. Eglin, M. Alini, G. R. Richards, L. Qin and Y. Lai 2021. Visible light-induced 3D bioprinting technologies and corresponding bioink materials for tissue engineering: A review. *Engineering*, 7(7): 966-978.
- Zhou, T., Y. Ming, S. F. Perry and S. Tatic-Lucic 2016. Estimation of the physical properties of neurons and glial cells using dielectrophoresis crossover frequency. *Journal of biological physics*, 42(4): 571-586.
- Zurina, I. M., V. S. Presniakova, D. V. Butnaru, A. A. Svistunov, P. S. Timashev and Y. A. Rochev 2020. Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach. *Acta biomaterialia*, 113: 63-83.
- Zysset, P. K. 2003. A review of morphology–elasticity relationships in human trabecular bone: theories and experiments. *Journal of biomechanics*, 36(10): 1469-1485.

ÖZGEÇMİŞ

Resul ÖZDEMİR

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2022	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2008-2012	Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Makine Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta
Lisans 1999-2004	Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Isparta

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Tasarım Mühendisi 2022-Devam Ediyor	SM Yachts Antalya Serbest Bölge/ Antalya
Tasarım Mühendisi 2021-2022	ND Biyolojik ve Medikal Ürünleri Tıbbi Cihazlar Araştırmaları Laboratuvar Deney Hizmetleri Antalya Teknokent, Antalya

Teknik Hizmetler Direktörü 2019-2021	Özel Anadolu Hastaneleri Merkez Yönetim Binası-Meydan Kavağı, Antalya
Üretim Geliştirme Mühendisi 2016-2019	Tezman Holding Jelatin Üretim Fabrikası-Gönen, Balıkesir
Tasarım Mühendisi 2014-2016	SARGE Tıp Teknolojileri Akdeniz Üniversitesi Teknokenti, Antalya
Tasarım Mühendisi 2012-2014	Cantek, Mezbaha ekipmanları Üretim Tesisi Organize Sanayi Bölgesi, Antalya
Uzakyol Vardiya Mühendisi 2010-2012	ARKAS Denizcilik İzmir
Tasarım Mühendisi 2009-2010	Cantek Soğuk Hava Deposu Üretim Tesisi Organize Sanayi Bölgesi, Antalya
Tasarım Mühendisi 2008-2009	Ertuğrullar Bıçerdöver Üretim Tesisi Burdur
Tasarım Mühendisi 2006-2008	AKE Asansör ve Yürüyen Merdiven Üretim Tesisi Organize Sanayi Bölgesi, Antalya
Servis Müdürü 2005-2006	Arçelik Yetkili Servisi Güllük, Antalya