



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Ekstrakte Edilen Doğal Atıklardan Biyoink Hazırlanması
ve Mueller Polarimetri Yardımıyla Karakterizasyonu**

Yüksek Lisans Tezi

Abdülbaki Belet

Mayıs 2024



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Ekstrakte Edilen Doğal Atıklardan Biyoink Hazırlanması
ve Mueller Polarimetri Yardımıyla Karakterizasyonu**

Yüksek Lisans Tezi

Abdulkaki Belet

Danışman

Prof. Dr. Murat Kazancı

Eş Danışman

Dr. Öğr. Ü. Ömer Polat

Mayıs 2024

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Abdulkaki Belet tarafından hazırlanan "Ekstrakte Edilen Doğal Atıklardan Biyoink Hazırlanması ve Mueller Polarimetri Yardımıyla Karakterizasyonu" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Murat Kazancı
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Dr. Öğr. Ü. Nurullah Çalık
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Doç. Dr. Onur Ferhanoglu
İstanbul Teknik Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 31/ 05 / 2024

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin APA yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun kaynak metin içi gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Murat Kazancı

Etik İlkelerine Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Abdülbaki Belet

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen, bana sürekli yol gösteren, deneysel çalışmalarında yardımını esirgemeyen, he anlamda bana bilgi birikimini aktaran değerli danışmanım Prof. Dr. Murat KAZANCI'ya teşekkürümü borç bilirim.

Tez dönemim boyunca deneysel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğr. Ü. Nurullah ÇALIK'a, Dr. Öğr. Ü. Ümmühan DEMİR'e ve Dr. Öğr. Ü. Melike GÜNEY AKKURT'a ve eş danışmanım Doç. Dr. Ömer POLAT'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmamda bilgilerini benimle paylaşan, sıkıştığım noktada yardım eden, işlerimi kolaylaştıran başta Selçuk Kaan HACIOSMANOĞLU ve Öğr. Gör Enes ATAŞ olmak üzere BİLTAM'daki arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bana manevi olarak desteğini veren, bana güvenen ve her şeyi başarabileceğime inanan Araf GECE'ye teşekkürümü sunarım.

Beni aralarından biri gibi gören, adeta İstanbul'da yeni bir ailem olan BULUT ve ÖZSAĞLAM ailesine teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca bana güvenen, başarılı olacağıma inanan, yüksek lisansa başladığımda benimle gurur duyan, her türlü yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili annem, abim, kardeşlerim ve değerli akrabalarıma teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından (122M820 ve 122F010 numaralı projeler) ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından (22501 numaralı proje) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1 3D Biyoyazıcı Teknolojisi	1
1.2 Biyoinkler (Biyomürekkepler)	4
1.2.1 Kollajen.....	5
1.2.2 Müsilaj	6
1.3 Çapraz Bağlama ve Yöntemleri	6
1.3.1 Genipin.....	7
1.3.2 Riboflavin	8
1.4 Karakterizasyon Yöntemleri.....	8
1.4.1 Mueller Polarimetri.....	9
1.4.2 Raman Spektroskopisi	11
1.4.3 Sinkrotron Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi.....	12
2. YÖNTEM.....	12
2.1 Üç Boyutlu Biyoyazıcı Hazırlanması ve Optimizasyonu	12
2.1.1 Biyoyazıcının Optimizasyon Ayarının Yapılması	13
2.1.2 Kollajen Biyobaskı Denemeleri	17
2.2 Ekstraksiyon İşlemleri.....	18
2.2.1 Sığan Kuyruğundan Kollajen Ekstraksiyonu	18
2.2.2 Sığır Derisinden Kollajen Ekstraksiyonu.....	19
2.2.3 Müsilaj Ekstraksiyonu	21
2.3 Kollajen Tabanlı Yapı İskelelerinin Basımı	23
2.3.1 Kollajen Hidrojellerinin Hazırlanması.....	23
2.3.2.1 Genipin Çözeltilisinin Hazırlanması	24
2.3.2.2 Riboflavin Çözeltilisinin Hazırlanması.....	24
2.4 Yapı İskelelerinin Basılması	25
2.4.1 Yapı İskelelerinin Çizilmesi ve Biyobasım Hazırlığı.....	25
2.4.2 Çapraz Bağlayıcı Olmadan Yapılan Biyobasımlar.....	25
2.4.3 Genipin ile Yapılan Biyobasımlar	28
2.4.4 Riboflavin ile Yapılan Biyobasımlar	29
2.5 Mueller Polarimetri Kurulumu	31
2.6 Karakterizasyonlar	35
2.6.1 Mueller Polarimetri Ölçümleri.....	35
2.6.2 Raman Spektroskopisi Ölçümleri	35
2.6.3 Sinkrotron Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (sFTIR) Spektroskopisi Ölçümleri.....	36
2.6.4 Hücre Kültürü Canlılık Testi.....	36

3. BULGULAR VE YORUM.....	37
3.1 Karakterizasyon.....	37
3.1.1 Optik Mikroskop Altında Yapı iskelelerinin İncelenmesi.....	37
3.1.2 Sinkrotron Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (sFTIR) Spektroskopisi.....	38
3.1.3 Raman Spektroskopisi	41
3.1.3.1 Kollajenin Raman Ölçümleri	41
3.1.3.2 Müsilajın Raman Ölçümleri.....	45
3.1.4 Mueller Polarimetri Ölçüm Sonuçları.....	47
3.1.4.1 Mueller Polarimetrisinin Çalışma İspatı.....	47
3.1.4.2 Kollajenin Mueller Polarimetri ile Ölçümleri.....	50
3.1.4.3 Müsilajın Mueller Polarimetri ile Ölçümleri	52
3.1.5 Hücre Kültürü Canlılık Testi Sonuçları	54
4. SONUÇ.....	56
4.1 3D Biyoyazıcının Üretimi	56
4.2 Doğal Malzemelerin Ekstraksiyonu	56
4.3 Yapı İskelelerinin Üretimi ve Çapraz Bağlama.....	57
4.4 Mueller Polarimetri Cihazının Üretimi	57
4.5 Karakterizasyon Sonuçları	58
5. KAYNAKLAR.....	59

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

M ve mM: Molar ve milimolar

cm, μ m, nm: santimetre, mikrometre, nanometre

$^{\circ}$ C: santigrat derece

a/h ve h/h

$^{\circ}$: derece

%: yüzde

mW: miliwatt

Hz: hertz (1/saniye)

Xg: bir kütleye etki eden hızlanma (g kuvveti)

Rpm: dakikadaki tur sayısı

sFTIR: Sinkrotron Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

TANIMLAR

Polarizör: Işığın elektrik alanının yayılma yönü boyunca tek bir düzlemle sınırlandıran optik malzeme

Çeyrek dalga plakası: Doğrusal polarize ışığı 90° faz kaydırarak dairesel polarize ışığa dönüştüren optik malzeme

Dairesel çift kırılma (gama): sağ ve sol dairesel polarize ışığın kırılmasındaki farktır.

Doğrusal çift kırılma (beta): ortogonal polarizasyon düzlemleri ile doğrusal olarak polarize edilmiş ışığın kırılmasındaki fark

Dairesel dikroizm (R): sağ ve sol dairesel polarize ışığın absorpsiyonu fark

Doğrusal dikroizm (D): ortogonal polarizasyon düzlemlerine sahip doğrusal polarize ışık ışınlarının absorpsiyonu arasındaki fark

ŞEKİLLER

Şekil 1. Biyoyazıcı türlerinin şematik gösterimi a) mikro ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcı b) mürekkep püskürtmeli biyoyazıcı c) lazer destekli biyoyazıcı d) Stereolitografi tabanlı biyoyazıcı (Jeong vd., 2020).....	3
Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcı teknolojisinin avantaj ve dezavantajları (Daly vd., 2021):..	4
Şekil 2. Kollajen yapısının şematik gösterimi (Sobczak-Kupiec vd., 2021).....	5
Şekil 3. Genipinin çapraz bağlama mekanizmasının şematik gösterimi (Riacci vd., 2021).....	7
Şekil 4. Riboflavin çapraz bağlama mekanizmasının şematik gösterimi (Heo vd., 2016).....	8
Şekil 5. Stokes parametrelerinin kullanılmasıyla M matrisinin hesaplanması (a ve b). “M” matrisinin normalize edilerek örneğin “m” matrisinin bulunması (c) (Pham ve Lo, 2012a).	10
Şekil 6. a) Doğrusal dikroizm (D) b) Doğrusal dikroizmin yönelme açısı (θ_d) c) Dairesel dikroizmin hesaplanması (R) d) Dairesel dikroizmin matrisinin hesaplanması (M_{cd}) e) Doğrusal dikroizmin matrisinin hesaplanması (M_{ld}) (Pham ve Lo, 2012a).....	10
Şekil 7. a) 6x6’lık B matrisi, dairesele ve doğrusal matrisin elde edilmesi b) B matrisinin tersi ile “m” vektörü ile soldan çarpılarak “A” vektörü elde edilmesi (Pham ve Lo, 2012a).	11
Şekil 8. Dairesel çift kırılmanın optik dönüşünün hesaplanması (gama) (a), doğrusal çift kırılmanın hesaplanması (beta) (b ve c), doğrusal çift kırılmanın optik dönüşünün hesaplanması (alfa) (d ve e) (Pham ve Lo, 2012a).	11
Şekil 9. a) Anet A8 3 boyutlu yazıcı b) 3 boyutlu biyoyazıcının ilk taslak hali c) Enjektörün baskı yapması için kullanılan basım parçası	13
Şekil 10. %5 Sodyum aljinat deneme çalışmalarının biyobasımları	14
Şekil 11. Alüminyum profil kullanılarak yeniden tasarlanmış biyoyazıcı	15
Şekil 12. Sodyum aljinat/PVA karışım hidrojel ile basılan yapı iskelesi.....	15
Şekil 13. Sodyum aljinat/PVA karışım tabanlı yapı iskelesinin optik mikroskop altında incelenmesi	16
Şekil 14. 3 Boyutlu biyoyazıcının son hali	17
Şekil 15. a) Enjektör içerisine yüklenmiş hava kabarcığı bulunan biyoink b) Santrifüjleme işlemi c) Santrifüjleme sonrası enjektörde hava kabarcığından tamamen arındırılmış kollajen biyoink d) Hava boşluğu olmadan 30 mm dış kenar uzunluğu 2,5 mm iç kare kenar uzunluğu olan kollajen yapı iskelesi	17
Şekil 16. Mekanik karıştırıcı yardımı ile karıştırılarak çözödürölen tendon örnekleri.....	19

Şekil 17. Sığır derisinden elde edilen temizlenmiş deri parçalarının NaOH solüsyonu içerisinde bekletilme aşaması	20
Şekil 18. Diyaliz membranları içerisinde bulunan deri kollajen solüsyonu	21
Şekil 19. a) Liyofilizasyon öncesi, diyaliz membranlarından alınan deri kollajen b) ekstraksiyon sonrası elde edilen deri kaynaklı kollajen.....	21
Şekil 20. a) Sahil kenarından toplanan deniz marulları b) Müsilaj oluşumu için deniz suyunda bekletilen deniz marulu. Deniz suyu üzerinde oluşan müsilaj tabakaları (c ve d)	22
Şekil 21. a) Deniz suyundan alınan müsilaj katmanları b) Elde edilen müsilaj örneği	23
Şekil 22. Kollajen hidrojellerinin hazırlanma aşamaları	24
Şekil 23. a) AutoCAD programı ile çizilen yapı iskelesi. b) PrusaSlicer ile 3 boyutlu çizimin dilimlenmesi.....	25
Şekil 24. a) 0,34 mm b) 0,30 mm c) 0,26 çapa sahip iğne uçlarıyla basılan kollajen yapı iskeleleri.....	26
Şekil 25. a) %3 (a/h), b) %4 (a/h) ve c) %5 (a/h) konsantrasyonlarına sahip kollajen biyoinklerle basılan yapı iskeleleri	27
Şekil 26. UVA ışık altında bekletilen kollajen yapı iskelesi	31
Şekil 27. a) Çapraz bağlama yapılmayan kollajen yapı iskelesi b) genipin ile çapraz bağlanmış yapı iskelesi c) riboflavin ile çapraz bağlanmış yağı iskelesi.....	31
Şekil 28. a) Motorize döndürme sistemine takılı polarizör b) Motor kontrolörü	32
Şekil 29. a) Adım motora takılı olan çeyrek dalga plakası b ve c) Adım motor kontrol sürücüsü ve arduino kart sistemi.....	33
Şekil 30. a) Nötr yoğunluk filtresi b) Polarizör ve yoğunluk filtresinin hareketini sağlayan arabalı kızak c) Lazere göre optik parçaların konumunu ayarlamaya yardımcı olan hedef tahtası	33
Şekil 31. Isıtma ve soğutma özelliğine sahip örnek tutucu	34
Şekil 32. Mueller polarimetri cihazının tam kurulum hali	34
Şekil 33. Yapı iskelelerinin optik mikroskop altında görüntüleri. a) Çapraz bağlama yapılmayan kollajen yapı iskelesi b) Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi c) Riboflavin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi.....	38
Şekil 34. Kollajen yapı iskelesinin sFTIR ölçümü	39
Şekil 35. Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesinin sFTIR ölçümü	40
Şekil 36. Riboflavin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesinin sFTIR ölçümü	40

Şekil 37. Çapraz bağlanmamış kollajen ve riboflavin ve genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelelerinin sFTIR spektroskopisi ölçümleri	41
Şekil 38. a) Toz genipinin Raman spektrum ölçümü b) Toz riboflavinin Raman spektrum ölçümü.....	42
Şekil 39. Kollajen yapı iskelesinin Raman spektrum ölçümü	43
Şekil 40. Riboflavin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi Raman spektrum ölçümü	44
Şekil 41. Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi Raman spektrum ölçümü .	45
Şekil 42. Deniz suyu Raman spektrum ölçümü	46
Şekil 43. Müsilajın Raman spektrum ölçümü.....	46
Şekil 44. Çeyrek dalga plakasının optik parametre değerleri	47
Şekil 45. Polarizörün optik parametre değerleri	48
Şekil 46. D-glukoz optik parametre değerleri.....	49
Şekil 47. a) Kollajen yapısının sıcaklığa bağlı dikroizm optik parametre sonuçları b) Kollajen yapısının sıcaklığa bağlı çift kırılma optik parametre sonuçları	51
Şekil 48. Kollajen ısıtıldıktan sonra tekrar sıcaklığa bağlı olarak optik parametre değişimleri.....	52
Şekil 49. a) Müsilajın sıcaklığa bağlı dikroizm optik parametre sonuçları b) Müsilajın sıcaklığa bağlı çift kırılma optik parametre sonuçları.....	53
Şekil 50. a) Bir katlı b) İki katlı c) üç katlı yapı iskelelerinin hücre tutunmaları	54
Şekil 51. Hücre canlılık testi sonuçları	55

TABLOLAR

Tablo 1. Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcı teknolojisinin avantaj ve dezavantajları	4
Tablo 2. Biyomalzemelerin ekstraksiyonunda kullanılan ve elde edilen malzeme miktarları.....	23
Tablo 3. Yapı iskeleleri için ideal sonuç veren parametreler	27

ÖZET

Ekstrakte Edilen Doğal Atıklardan Biyoink Hazırlanması ve Mueller Polarimetri Yardımıyla Karakterizasyonu

Belet, Abdulbaki

Yüksek Lisans Tezi, Nanobilim ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı, Nanobilim ve Nanoteknoloji Programı

Danışman: Prof. Dr. Murat Kazancı

Mayıs 2024

3D biyoyazıcılar, doku mühendisliğinde kullanılan son yıllarda popüler olan bir teknolojidir. Bu teknolojiyle, doku veya organların iyileştirilmesi amacıyla hücrelerin çoğalması, büyümesi ve yeni sağlıklı dokunun oluşturulması için 3D yapı iskeleleri üretimi gerçekleştirilmektedir. Biyoyazıcılarda, yapı iskelelerinin üretimi için biyoink olarak, polimerlerden oluşan hidrojeller kullanılmaktadır. Doğal polimerlerden olan kollajen, hücre dışı matrisin temel bileşeni olduğundan, yapı iskeleleri üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvanların derisinde, kıkırdak yapısında ve diğer bağ dokularında çokça bulunur. Bu yüzden çalışmada kollajen ekstraksiyonu için hayvansal kaynaklar kullanılmıştır. Kollajen yapı iskeleleri üretiminde yaygın olarak kullanılsa da mekanik dayanımı düşüktür ve yüksek sıcaklıklarda yapısı bozulmaktadır. Kollajenin yapısını güçlendirmek ve sıcaklığa olan dayanıklılığını arttırmak için kimyasal kullanılarak çapraz bağlama yapılır. Çapraz bağlamada, yüksek biyoyumumluluğa sahip ve toksik olmayan kimyasallar tercih edilir. Bu çalışmada kollajen yapı iskelelerinin çapraz bağlanması için genipin ve riboflavin kimyasalları kullanılmış ve hücre canlılığına olan etkileri karşılaştırılmıştır.

Doğal malzemelerin ve dokuların analizinde optik karakterizasyon cihazları da kullanılmaktadır. Mueller polarimetri, yakın zaman içerisinde biyolojik malzemelerin moleküler yapısındaki değişikliği incelemek için kullanılmaktadır. Kollajenin ve müsilağın moleküler zincir yapısı, artan sıcaklık değerlerine göre mueller polarimetri ile incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyoyazıcı, yapı iskelesi, kollajen, Mueller polarimetri

ABSTRACT

Preparation of Bioink From Extracted Natural Wastes and Characterization by Muller Polymimetry

Belet, Abdulbaki

Master Thesis, Department of Nanoscience and Nanotechnology, Nanoscience and
Nanotechnology Program

Supervisor: Prof. Dr. Murat Kazanci

May 2024

Bioprinters are a recently popular technology used in the field of tissue engineering. Scaffolds are produced for the proliferation and growth of cells and the creation of new healthy tissue for the improvement of tissues or organs. Hydrogels composed of polymers are used as bioinks for the production of scaffolds. Collagen, a natural polymer, is widely used in the production of scaffolds as it is the main component of the extracellular matrix. It is abundant in the skin, cartilage and other connective tissues of animals. Therefore, animal sources were used for collagen extraction. Although collagen is widely used in the production of scaffolds but its mechanical strength is low and its structure denaturated at the high temperatures. To strengthen the structure of collagen and increase its resistance to temperature, its crosslinked by using chemicals. In crosslinking, with high biocompatibility and non-toxicity chemicals are preferred. In this study, genipin and riboflavin were used to crosslink collagen scaffolds and their effects were compared on cell viability.

Optical characterization devices are also used in the analysis of natural materials and tissues. Mueller polarimetry has recently been used to analyze changes in the molecular structure of biological materials. The molecular structure of collagen was analyzed by increasing temperature values and also the temperature-dependent change of the molecular chain structure of mucilage examined.

Key words: Bioprinter, scaffodls, collagen, Mueller polarimetry

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde insan hayatının başlamasından itibaren yaralanma, hastalık ve doğuştan sakatlık gibi durumlar daima mevcut olmuştur. Bu hastalıkların ve yaralanmaların tedavisi için insanlık tarihi boyunca çeşitli alanlarda çalışmalar yapılmıştır (Wu vd., 2020). Bu çalışmaların son yıllardaki en popüler alanlarından bir tanesi ise organ ve dokuların yeniden yapılandırılması, yapay olarak üretilmesi ve hastalıklı dokuların yerine nakledilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak doku ve organ naklinde bazı kısıtlamalar mevcuttur. Doku ve organ bekleyen hasta sayısı ile bu hastalara doku/organ bağışlayacak insan sayısında farklılıklar mevcuttur. Buna ek olarak yapılan ameliyatların yan etkileri, ameliyat sonrası enfeksiyon kapma ve/veya organ reddi gibi riskler de bulunmaktadır (Chung ve King, 2011). Bu duruma çözüm oluşturmak için doku mühendisliği bölümü çıkmıştır. Doku mühendisliği, biyolojik yapıları, ilaçları ve doğal ve/veya sentetik malzemeleri mühendislik stratejileri uygulayarak hasarlı doku veya organları iyileştirmeyi amaçlayan bir disiplinlerarası alandır (Garcia-Villen vd., 2023) Bu malzemelerin birleşmesiyle hasarlı dokuyu yenilemek veya değiştirmek için insan vücuduna uygulanması amacıyla yapı iskeleleri üretmişlerdir.

Doku mühendisliğinin temel bir bileşeni haline gelen yapı iskeleleri, doku fonksiyonlarını simüle etmek ve hücrelerin çoğalması, büyümesi ve yeni sağlıklı dokunun yeniden oluşması için uygun bir ortam sağlaması amacıyla üretilmiştir (Abdelaziz vd., 2023). 2 boyutlu (2D) doku kültürü kabı gibi malzemelerde hücre büyümesi daha hızlı olmasına rağmen, hücreler birleştiğinde yeterli alan kalmadığı için çoğalma durmaktadır. Bu durum sonucunda da vücut içerisindeki gerçek doku ve hücre ortamının taklidi yetersiz kalmaktadır. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için hücre bağlanması ve çoğalmasında 2 boyutlu malzemelere göre daha geniş yüzey alanına sahip 3 boyutlu (3D) gözenekli yapı iskeleleri kullanılmaktadır (Hosseinkhani vd., 2014). Ayrıca vücut dokularının yapısına ve işlevine benzeyebilen 3 boyutlu hücre yapılarının oluşumuna yardımcı oldukları için de tercih edilmişlerdir.

1.1 3D Biyoyazıcı Teknolojisi

Günümüzde doku mühendisliği için üç boyutlu yapı iskelelerinin üretilmesinde yaygın olarak kullanılan üretim teknolojilerinden bazıları elektro-eğirme (Rahmati vd., 2021), dondurarak kurutma (Du vd., 2022) ve sol-jel (Shirehjini vd., 2022) yöntemi sayılabilir.

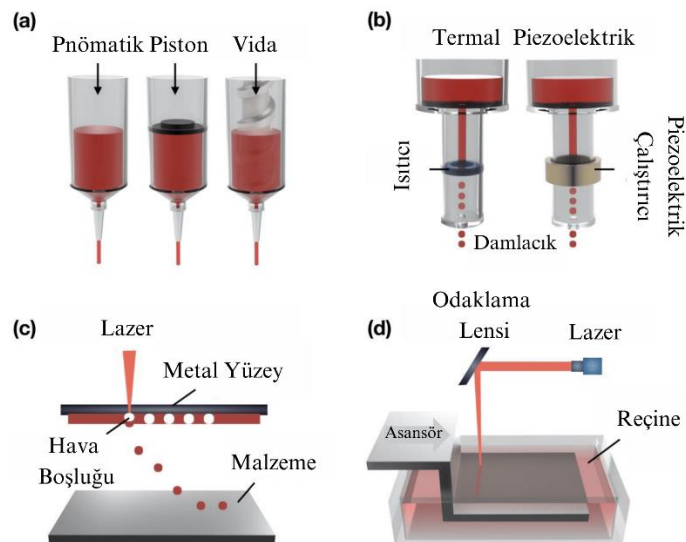
Bu yöntemlerde üretilen yapı iskelelerinin homojenliği ve yapının boyutunun kontrolü zordur. Bu zorlukların ve dezavantajların üstesinden katman biriktirme prensibine dayanarak çalışan 3D biyobaskı teknolojisi, diğer bir adıyla 3D biyoyazıcı teknolojisi geliştirilmiştir (Mandrycky vd., 2016). Son zamanlarda biyobaskı teknolojisi hızla gelişen doku mühendisliği teknolojisi haline gelmiştir. Biyoyazıcı teknolojisi, son yıllarda doku mühendisliği alanının en popüler üretim yöntemi haline gelmiştir (Seol vd., 2014).

Bu teknoloji ilk olarak, 1986 yılında Charles W. Hull tarafından geliştirilmiştir (Varkey vd., 2019). 3D basım, dijital ortamda 3D olarak tasarlanan modelin, katmanlar halinde biriktirilerek programlanmış bir şekilde üretilmesini ifade etmektedir. 3D biyoyazıcı ile yapılan bu işlemler bütünü biyobasım olarak adlandırılmaktadır. 3D biyoyazıcıların hareket hassasiyeti ve üretim için kullanılacak malzemelerin çeşitliliği sayesinde karmaşık ve küçük ayrıntılara sahip yapıların üretilmesine olanak sağlar (Ravanbakhsh vd., 2021). Bu teknoloji sayesinde farklı tipte dokuların onarımı veya yenilenmesi için gerekli olan yapı iskeleleri daha kontrollü bir şekilde üretilmektedir (Osidak vd., 2020). Mevcut 3D biyoyazıcı teknolojileri; mürekkep püskürtmeli, lazer destekli, stereolitografi tabanlı ve ekstrüzyon tabanlı olmak üzere dört kategoriden oluşmaktadır (Kolan vd., 2019).

- a) Mürekkep püskürtmeli biyoyazıcı: Diğer bir ismi damlacık bazlı biyobaskı olan mürekkep püskürtmeli biyobaskı teknolojisi, malzemenin damlalar halinde yüzeye akıtılmasıyla basım yapan teknolojidir. Bu teknolojiye piezoelektrik, termal veya elektrostatik mekanizması kullanılarak malzemenin akışı sağlanır. Mürekkep püskürtmeli biyoyazıcıların avantajı, 3D yazıcılara benzerlikleri nedeniyle ucuzdurlar ve yüksek yazma hızına sahiptirler. Ancak bu biyobaskı teknolojisinde kullanılan malzemenin viskozitesi sınırlıdır ve iletken olmalıdır. Yoğun malzemeler iğne ucundan çıkamayacağı için basımda düşük yoğunluktaki malzemeler kullanılması gerekmektedir. Ayrıca iletken malzemeler kullanılması gerektiğinden bu durum biyobasımı yapılacak malzemelerin kısıtlı olması anlamına da gelmektedir (Fatimi vd., 2022; Roseti vd., 2018; Vanaei vd., 2021; Vijayavenkataraman vd., 2018).
- b) Lazer destekli biyoyazıcı: Basımda kullanılan malzemeler, metal film desteği üzerinde biriken sıvı veya jel çözelti içindeki hücrelerdir. Metal film, üzerine gelen lazer ışığıyla birlikte buharlaştırılır ve malzemenin şeritler halinde akmasına yol açar. Lazer destekli biyobaskıda iğne veya püskürtme uçları

kullanılmadığından, hücre tıkanma sorunları yaşanmaz. Yüksek yoğunluktaki malzemelerin biyo basımını gerçekleştirebilir. Lazer destekli biyoyazıcılar yüksek hücre canlılığına sahip olmalarına rağmen en önemli dezavantajları; maliyetli, zor ve zaman alıcı olmasıdır (Fatimi vd., 2022; Roseti vd., 2018; Vanaei vd., 2021)

- c) Stereolitografi tabanlı biyoyazıcı: Stereolitografi tabanlı biyoyazıcı, 3 boyutlu yapılar oluşturmak için bir lazer kaynağı kullanan bir teknoloji biçimidir. Bu teknolojiye ışıqla sertleştirilebilen reçine bazlı malzemeler kullanılmaktadır. Bu teknolojiyle yüksek hassasiyete sahip malzemelerin biyobasımı gerçekleştirilebilir. Ancak ışıqla sertleştirilebilen reçinelerin sitotoksitesi ve sistem kurulumunun yüksek maliyeti nedeniyle oldukça zor ve az tercih edilen bir yöntemdir (Jeong vd., 2020).
- d) Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcı: Malzemeyi kalıptan (enjektör veya benzeri yapı) çıkarmak için pnömatik basınç, piston veya metal vida sistemini kullanan baskı teknolojisidir. Bu teknik diğer biyoyazıcı tekniklerine göre daha düşük hassasiyete sahip olmasına rağmen, yoğun malzemeleri basabildiğinden daha geniş bir malzeme seçimine izin vermektedir. Bu biyoyazıcı türü birden fazla başlık kullanabildiği için, aynı anda farklı türdeki malzemelerin basımını da gerçekleştirebilmektedir ve bu en önemli avantajıdır (Gao vd., 2019) Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı yöntemi en çok kullanılan yöntemlerden bir tanesidir (Cavallo vd., 2023).



Şekil 1. Biyoyazıcı türlerinin şematik gösterimi a) mikro ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcı b) mürekkep püskürtmeli biyoyazıcı c) lazer destekli biyoyazıcı d) Stereolitografi tabanlı biyoyazıcı (Jeong vd., 2020)

Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcı teknolojisinin avantaj ve dezavantajları (Daly vd., 2021):

AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Çoklu başlık kullanarak heterojen yapılar basabilir	Basım için orta hücre yoğunluğu uygundur ($\sim 5 \times 10^4$ hücre/ml)
Karmaşık yapıya sahip geometrik şekilleri basabilir	Basım hassasiyeti orta seviyededir
Hızlı basma işlemi gerçekleştirebilir	Kullanılacak malzemenin basılabilirliğe uygun reolojik özelliğe sahip olması gerekmektedir (farklı malzemelerde farklı konsantrasyon)
Ucuzdur	

Tablo 1. Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcı teknolojisinin avantaj ve dezavantajları

Genellikle biyomalzemelerden, biyokimyasal moleküllerden, canlı hücrelerden veya bunların karışımından oluşan ve biyoyazıcılarda ürün elde etmek için kullanılan malzemeler biyoink (biyomürekkep) olarak adlandırılır (Groll vd., 2018).

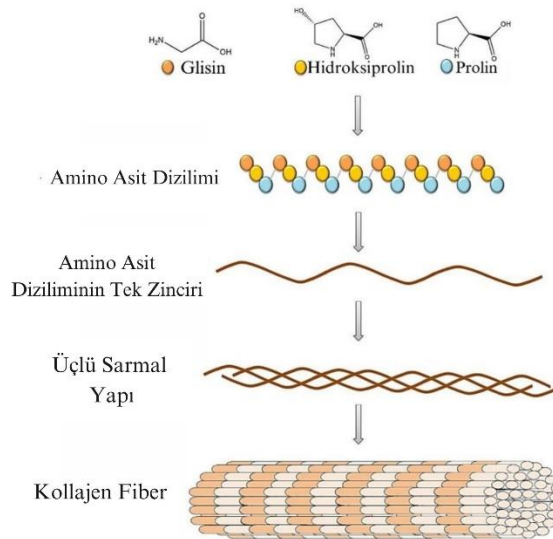
1.2 Biyoinkler (Biyomürekkepler)

Yüksek su içeriği, biyoyumluluğu ve canlı hücreler için uygun bir ortam sağlamaları sebebiyle bir çeşit hidrojel olan biyoinkler, yapı iskelesi üretimi için temel malzeme olarak kullanılmaktadırlar (Cavallo vd., 2023; Rider vd., 2018). Biyoinkler uzun zincirlere sahip hücre fonksiyonlarını (hücre tutunması, canlılığı, çoğalması ve farklılaşması gibi), doku yenilenmesini sağlayan polimerlerden oluşan yapılardır. Bu yapılar genel olarak biyoyazıcı teknolojisi ile işlenmeye uygun bir formülasyon olarak da tanımlanabilir (Daly vd., 2021). Tüm 3D biyobaskı yöntemlerinde öncelikli ve en önemli adımlardan bir tanesi biyoink seçimidir (Andrea ve Bill, 2024). Biyoinklerin uygun viskoziteye sahip olmaları tek başına yeterli olmamakla birlikte aynı zamanda yüksek mekanik dayanıklılığa da sahip olmaları gerekmektedir. Bunun yanında biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır (Xia vd., 2018). Bu özellikleri sağlaması sebebiyle polimerler biyoink hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanılan polimerler doğal (polisakkarit veya protein bazlı) ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılırlar (Chen vd., 2023; Fatimi vd., 2022; Ren vd., 2022). Biyoinklerde yaygın olarak kullanılan; polietilen glikol, polikaprolakton, polivinilpirolidon, polilaktik asit, polivinil alkol gibi biyomalzemeler, sentetik polimerler arasında yer almaktadırlar. Doğal

polimerler ise; kollajen, jelatin, aljinat, kitosan, hyaluronik asit, selüloz, müsilaj gibi biyomalzemelerdir (Embafrash Berhe vd., 2023; Jeong vd., 2020).

1.2.1 Kollajen

Üç polipeptit zincir ve karakteristik üçlü sarmal yapıdan oluşan ve yaklaşık 20 türü olan, protein ailesine genel bir terim olarak kollajen ismi kullanılır (Gelse vd., 2003). Kollajen, vücuttaki çeşitli bağ dokularının (deri, kemikler, bağdokular, tendonlar ve kıkırdak gibi) hücre dışı matrisinde en bol bulunan yapısal proteindir (Jafari vd., 2020). Kollajen, yapısındaki hidroksil ve amid grupları hem hidrojen hem de kovalent bağlarla bir arada tutulan, kendi kendine toplanan polipeptit zincirli bir yapıdır. Her zincirin karşısında ayrı bir bükümü ve amino asit vardır. Üçlü sarmal yapıyı üç temel amino asit içerir. Bunlar; glisin (gly), prolin (pro) ve hidroksiprolindir (hyp) (Veiga vd., 2022).



Şekil 2. Kollajen yapısının şematik gösterimi (Sobczak-Kupiec vd., 2021)

Kollajen, memeli dokularında, tendonlarında, bağlarında ve derisinde en çok bulunan protein olduğu için doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Kollajenin biyoyumluluğu yüksektir, düşük immünojeniteye sahiptir ve hücre yapışmasını ve yenilenmesini desteklemektedir (Drzewiecki vd., 2017; Veiga vd., 2022).

Tanımlanmış bir dizi farklı kollajen türü vardır. Doku mühendisliğinde en yaygın kullanılanları tip I, II, IV ve V oluşumlarıdır (Chen vd., 2023). Bolluğu, her yerde bulunması ve biyoyumluluğu nedeniyle tip I kollajen en yaygın kullanılanıdır. Tip I kollajen, hücre yapışmasını, farklılaşmasını ve diğer doğal süreçleri desteklediğinden

vücuttaki birçok dokuya özgüdür. Aynı zamanda da yara iyileşmesi sırasında vücudun kendi rejeneratif yaklaşımının birincil bileşeni olduğundan doku mühendisliğinde temel bir malzeme olarak seçilmektedir (Drzewiecki vd., 2017; Glowacki ve Mizuno, 2008).

Kollajen, hayvanların derisinde, kıkırdaklarında ve diğer bağ dokularında yaygın olarak bulunduğundan hayvan kaynaklarından elde edilebilir. Aynı zamanda rekombinant genetik tekniklerden de elde edilebilmektedir. Kollajen eldesi için en çok kullanılan hayvan kaynakları; sığır derisi, domuz derisi, sıçan kuyruğu ve deniz hayvanlarıdır (Yang vd., 2023). Kollajen eldesinde kullanılan sığır derisi yaklaşık olarak %30 protein içeriğine sahiptir ve kollajen esas olarak iç alt tabakasında bulunmaktadır (González-Masís, Cubero-Sesin, Guerrero, vd., 2020). Literatürde en yaygın tip I kollajen kaynağı ise sıçan kuyruğu tendonudur. Sıçan kuyruğu tendonu ağırlıkça %90-95 oranında tip I kollajen içermektedir ve ekstraksiyon işlemi sonrası yüksek kollajen verimi sağlar (Yang vd., 2023).

1.2.2 Müsilaj

Boyutları birkaç milimetreden birkaç metreye kadar değişen amorf agregatlara deniz karı adı verilmektedir. Deniz karı, okyanusların her yerinde bulunur (Simon vd., 2002). Yaz koşullarında (sıcak havalarda) su sütunu tabakalaşması, küçük boyutlu agregatların büyük ve ince tabakalar halinde topak veya bulutsu yapılar olarak birleşmesini sağlar. Oluşan jelimsi yapı müsilaj olarak bilinmektedir (Precali vd., 2005).

Bir polimerik polisakkarit olan müsilaj yapısal olarak, L-arabinoz, D-galaktoz, D-ksiloz, D-glukoz ve galakturonik monomerlerinden oluşan dallanmış karbohidratlardan oluşmaktadır. Ayrıca yapısında glikoproteinler ve tanen, alkaloid ve steroidler gibi farklı biyoaktif bileşenleri de içermektedirler (Tosif vd., 2021). Müsilaj, yüksek termal ve kimyasal stabiliteye sahiptir, biyolojik olarak parçalanabilir ve viskoz çözeltiler oluşturabilir (Alpizar-Reyes vd., 2017).

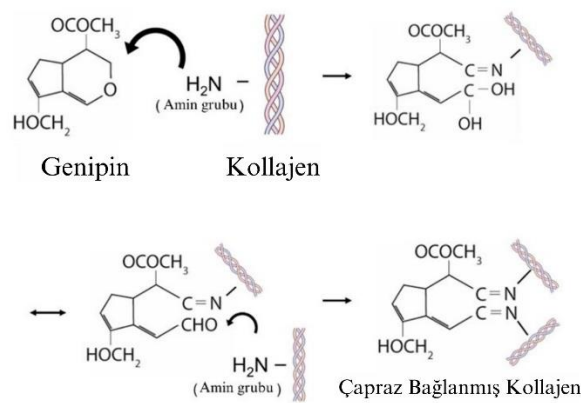
1.3 Çapraz Bağlama ve Yöntemleri

Kollajen hidrojelleri, doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılsa da mekanik özellikleri ve yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklılığı, üçlü sarmal yapıyı oluşturan hidrojen bağları bozulduğu için düşüktür. Kollajenin yapısını güçlendirmek ve dayanıklılığını arttırmak için fonksiyonel grupları (amino ve karboksil gruplar) bağlayarak çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilir (Adamiak ve Sionkowska, 2020; Rhee

vd., 2016). Çapraz bağlayıcılar, mekanik özellikler, enzim toleransı, ısıl dayanıklılık olmak üzere doku ve organlara benzer fizikokimyasal özelliklere sahip kollajen yapı iskelesi üretmek için kullanılmaktadır. Çapraz bağlama yöntemleri kimyasal, fiziksel ve enzimatik olmak üzere üçe ayrılırlar (Islam vd., 2021). Fiziksel çapraz bağlama teknikleri arasında dehidrotermal arıtma ve ultraviyole (UV) ışına örnek olarak verilebilir. Kimyasal çapraz bağlama yöntemi için kullanılan başlıca kimyasallar ise; glutaraldehit, karbodiimid, formaldehit, riboflavin ve genipin örnek olarak gösterilebilir. En çok kullanılan çapraz bağlama tekniği kimyasal çapraz bağlama tekniğidir (Heo vd., 2016; Jiang vd., 2022).

1.3.1 Genipin

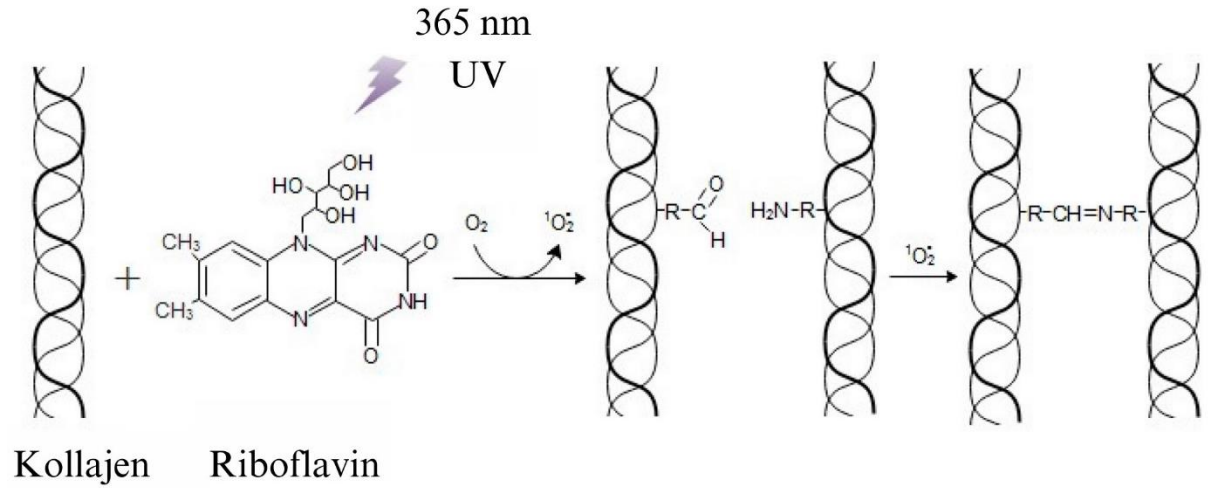
Genipin, gardenya meyvelerinde bulunan, yüksek biyoyumluluğa sahip, biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan ve stabil olan bir çapraz bağlayıcıdır (Masri vd., 2022). Genipin biyomalzemelerin ikincil veya üçüncül amin grupları yerine sadece birincil amin grupları ile reaksiyona girmektedir. Lisin veya hidroksilisin kalıntılarının serbest amino gruplarını çapraz bağlar aynı zamanda da mavi renk pigmentlerine neden olmaktadır. Bu renk değişimi sayesinde çapraz bağlanma derecesi hassas bir şekilde ayarlanabilmekte ve çapraz bağlanmanın gerçekleştiği kontrol edilebilmektedir (Scialla vd., 2022). Toksik olmaması, biyoyumlu olması ve görsel olarak çapraz bağlayıcı olarak kullanımı oldukça yaygındır. Genipin çalışma mekanizması şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Genipinin çapraz bağlama mekanizmasının şematik gösterimi (Riacci vd., 2021)

1.3.2 Riboflavin

Kimyasal çapraz bağlama tekniğinin en önemli dezavantajlarından biri, kullanılan kimyasal malzemelerin, çapraz bağlı yapıların biyolojik parçalanması ve biyoyumluluğu üzerinde zararlı etkilere sahip olabilmesidir. Fotokimyasal çapraz bağlama diğer yöntemlere göre toksisitesi azaltılmış, hızlı ve etkili bir yöntemdir (Rich vd., 2014). Riboflavin, kolaylıkla emilebilen, düşük toksisiteye sahip olduğu için bu yöntemde tercih edilen ışığa duyarlı bir B vitaminidir (Brennan-Pierce vd., 2014). Riboflavin, ışıkla uyarılarak tekli oksijen üretir ve amino gruplarını köprüleyen kovalent bağları oluşturur. Oluşan güçlü kovalent bağlarla daha güçlü yapı ortaya çıkar (Heo vd., 2016). Riboflavin çalışma mekanizması şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Riboflavin çapraz bağlama mekanizmasının şematik gösterimi (Heo vd., 2016)

1.4 Karakterizasyon Yöntemleri

Bir malzemenin fiziksel, kimyasal, biyolojik ve morfolojik özellikleri hakkında çeşitli yöntemler, teknikler ve araçlar kullanılarak bilgi alma işlemine karakterizasyon denir. Malzemelerin karakterizasyonunda, mikroskopi, spektroskopik, optik ve termodinamik gibi çeşitli teknikler bulunmaktadır. Yaptığımız tez çalışmasında bu yöntemlerinden spektroskopik ve optik teknikleri biyomalzemelerin analizi için kullandık.

1.4.1 Mueller Polarimetri

Optik karakterizasyon, ışık (radyasyon) ile malzeme arasındaki etkileşime dayanan bir çeşit karakterizasyon yöntemidir. Geleneksel optik karakterizasyon cihazları, ışığın polarizasyon durumundaki değişiklikleri hesaba katmadan sadece ışık yoğunluğunu ölçmektedir. Polarizasyondaki değişiklikleri de tespit eden teknikler, incelenen malzeme hakkında ek bilgiler verebilir ve bu sayede ölçüm doğruluğunu arttırabilme potansiyeline sahiptirler. Mueller matrisi, bir nesnenin tamamen veya kısmen polarize edilmiş ışıkla etkileşimini en iyi şekilde tanımlamaktadır. Bu nedenle mevcut polarimetrik yöntemler Mueller formalizmi ile genelleştirilebilir ve bu genellemeye Mueller polarimetrisi adı verilir (Ignatenko vd., 2022). Mueller polarimetrisi, iki ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; polarizasyon durum üreticisi ve polarizasyon durumu analizörüdür. Polarizasyon durum üreticisi sırayla tek dalga boyu lazer ışık kaynağı, polarizör ve çeyrek dalga plakasından oluşmaktadır. Polarizör durumu analizörü ise sırasıyla çeyrek dalga plakası, polarizör ve dedektörden oluşmaktadır. Ölçümü yapılacak olan örnek ise iki bileşenin arasında durmaktadır (Le vd., 2022).

Mueller polarimetresi, biyolojik örnekleri analiz etmek için polarize ışık ölçümlerinin kullanıldığı temel ve klinik öncesi araştırmalarda kullanılmaktadır. Özellikle, optik çift kırılma ile yakından ilişkili bir optik ölçüm olan geciktirme, dokuların yapısal anizotropisi ile ilişkilidir ve bu da dokuların bileşenlerinden (kas lifleri, kollajen vb.) ortaya çıkmaktadır. Dokunun hücre dışı matrisinde morfolojik değişikliklere yol açan herhangi bir gelişme, mueller polarimetri ile görüntülenebilir, tanımlanabilir veya ölçülebilir (Ahmad vd., 2020).

Mueller matris ölçümlerinde örnek üzerine gönderilen ışık polarizasyonu, Stokes vektörleri olarak adlandırılan dört elementli bir vektör olarak tanımlanır (Pham ve Lo, 2012a). Bir malzemenin ölçümlerinden elde edilen Stokes parametreleri ile bir “M” matris hesaplaması yapılır. Elde edilen matrisin birinci satır- birinci sütun değeri (M₁₁) ile normalize edilerek örneğin normalize edilmiş “m” matrisi bulunur. Aşıda belirtilen formüller uygulanarak örneğin optik parametreleri hesaplanır.

$$\begin{aligned}
\text{(a)} \quad S_{0^\circ} &= \begin{bmatrix} m_{11} + m_{12}, & m_{21} + m_{22}, & m_{31} + m_{32}, & m_{41} + m_{42} \end{bmatrix}^T & \text{(b)} \quad S_{135^\circ} &= \begin{bmatrix} m_{11} - m_{13}, & m_{21} - m_{23}, & m_{31} - m_{33}, & m_{41} - m_{43} \end{bmatrix}^T \\
& \quad (6) & & \quad (9) \\
S_{45^\circ} &= \begin{bmatrix} m_{11} + m_{13}, & m_{21} + m_{23}, & m_{31} + m_{33}, & m_{41} + m_{43} \end{bmatrix}^T & S_{\text{RHC}} &= \begin{bmatrix} m_{11} + m_{14}, & m_{21} + m_{24}, & m_{31} + m_{34}, & m_{41} + m_{44} \end{bmatrix}^T \\
& \quad (7) & & \quad (10) \\
S_{90^\circ} &= \begin{bmatrix} m_{11} - m_{12}, & m_{21} - m_{22}, & m_{31} - m_{32}, & m_{41} - m_{42} \end{bmatrix}^T & S_{\text{LHC}} &= \begin{bmatrix} m_{11} - m_{14}, & m_{21} - m_{24}, & m_{31} - m_{34}, & m_{41} - m_{44} \end{bmatrix}^T \\
& \quad (8) & & \quad (11) \\
\text{(c)} \quad \begin{pmatrix} m_{11} & m_{12} & m_{13} & m_{14} \\ m_{21} & m_{22} & m_{23} & m_{24} \\ m_{31} & m_{32} & m_{33} & m_{34} \\ m_{41} & m_{42} & m_{43} & m_{44} \end{pmatrix} & \text{(d)} \quad \mathbf{M} = \begin{bmatrix} \mathbf{AM11} & \mathbf{AM12} & \mathbf{BM13} & \mathbf{EM14} \\ \mathbf{AM21} & \mathbf{AM22} & \mathbf{BM23} & \mathbf{EM24} \\ \mathbf{AM31} & \mathbf{AM32} & \mathbf{BM33} & \mathbf{EM34} \\ \mathbf{AM41} & \mathbf{AM42} & \mathbf{BM43} & \mathbf{EM44} \end{bmatrix} ; \\
& & & \text{Nor} = \mathbf{M} / \mathbf{M}(1,1) ;
\end{aligned}$$

Şekil 5. Stokes parametrelerinin kullanılmasıyla M matrisinin hesaplanması (a ve b). “M” matrisinin normalize edilerek örneğin “m” matrisinin bulunması (c) (Pham ve Lo, 2012a).

Matris hesaplamalarından sonra sırasıyla aşağıdaki formüller uygulanır:

$$\begin{aligned}
\text{(a)} \quad D &= \sqrt{\frac{\left[S_{0^\circ}(S_0) - S_{90^\circ}(S_0) \right]^2 + \left[S_{45^\circ}(S_0) - S_{135^\circ}(S_0) \right]^2}{\left[S_{0^\circ}(S_0) + S_{90^\circ}(S_0) \right]^2 - \left[S_{\text{RHC}}(S_0) - S_{\text{LHC}}(S_0) \right]^2}} & \text{(b)} \quad 2\theta_d &= \tan^{-1} \left(\frac{S_{45^\circ}(S_0) - S_{135^\circ}(S_0)}{S_{0^\circ}(S_0) - S_{90^\circ}(S_0)} \right) \\
\text{(c)} \quad R &= \frac{\left[S_{0^\circ}(S_0) + S_{90^\circ}(S_0) \right] - \sqrt{\left[S_{0^\circ}(S_0) + S_{90^\circ}(S_0) \right]^2 - \left[S_{\text{RHC}}(S_0) - S_{\text{LHC}}(S_0) \right]^2}}{\left[S_{\text{RHC}}(S_0) - S_{\text{LHC}}(S_0) \right]} & \text{(d)} \quad M_{cd} &= \begin{bmatrix} 1 + R^2 & 0 & 0 & 2R \\ 0 & 1 - R^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 - R^2 & 0 \\ 2R & 0 & 0 & 1 + R^2 \end{bmatrix} \\
\text{(e)} \quad M_{ld} &= \begin{pmatrix} \frac{1}{2} \left(1 + \frac{1-D}{1+D} \right) & \frac{1}{2} \cos(2\theta_d) \left(1 - \frac{1-D}{1+D} \right) & \frac{1}{2} \sin(2\theta_d) \left(1 - \frac{1-D}{1+D} \right) & 0 \\ \frac{1}{2} \cos(2\theta_d) \left(1 - \frac{1-D}{1+D} \right) & \frac{1}{4} \left[\left(1 + \sqrt{\frac{1-D}{1+D}} \right)^2 + \cos(4\theta_d) \left(1 - \sqrt{\frac{1-D}{1+D}} \right)^2 \right] & \frac{1}{4} \sin(4\theta_d) \left(1 - \sqrt{\frac{1-D}{1+D}} \right)^2 & 0 \\ \frac{1}{2} \sin(2\theta_d) \left(1 - \frac{1-D}{1+D} \right) & \frac{1}{4} \sin(4\theta_d) \left(1 - \sqrt{\frac{1-D}{1+D}} \right)^2 & \frac{1}{4} \left[\left(1 + \sqrt{\frac{1-D}{1+D}} \right)^2 - \cos(4\theta_d) \left(1 - \sqrt{\frac{1-D}{1+D}} \right)^2 \right] & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \sqrt{\frac{1-D}{1+D}} \end{pmatrix}
\end{aligned}$$

Şekil 6. a) Doğrusal dikroizm (D) b) Doğrusal dikroizmin yönelme açısı (θ_d) c) Dairesel dikroizmin hesaplanması (R) d) Dairesel dikroizmin matrisinin hesaplanması (M_{cd}) e) Doğrusal dikroizmin matrisinin hesaplanması (M_{ld}) (Pham ve Lo, 2012a).

$$(a) \quad M_D = [M_{ld}][M_{cd}] = \begin{pmatrix} B_{11} & B_{12} & B_{13} & B_{14} \\ B_{12} & B_{22} & B_{23} & B_{24} \\ B_{13} & B_{23} & B_{33} & B_{34} \\ B_{41} & B_{42} & B_{43} & B_{44} \end{pmatrix} (b) \quad \begin{bmatrix} B_{22} & B_{23} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ B_{23} & B_{33} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & B_{22} & B_{23} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & B_{23} & B_{33} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & B_{22} & B_{23} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & B_{23} & B_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_{22} \\ A_{23} \\ A_{32} \\ A_{33} \\ A_{42} \\ A_{43} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} m_{22} \\ m_{23} \\ m_{32} \\ m_{33} \\ m_{42} \\ m_{43} \end{bmatrix}$$

Şekil 7. a) 6x6'lık B matrisi, dairesel ve doğrusal matrisin elde edilmesi b) B matrisinin tersi ile “m” vektörü ile soldan çarpılarak “A” vektörü elde edilmesi (Pham ve Lo, 2012a).

$$(a) \quad \gamma = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{A_{23} - A_{32}}{A_{22} + A_{33}} \right) \quad (b) \quad 2\alpha + 2\gamma = \tan^{-1} \left(-\frac{A_{42}}{A_{43}} \right) \quad (c) \quad \beta = \sin^{-1} \left[-\frac{A_{43}}{\cos(2\alpha + 2\gamma)} \right]$$

$$(d) \quad C_{11} = \cos(2\gamma) \sin(\beta), \quad (e) \quad C_{22} = \sin(2\gamma) \sin(\beta). \quad \alpha = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{C_{11}A_{42} + C_{22}A_{43}}{C_{22}A_{42} - C_{11}A_{43}} \right)$$

Şekil 8. Dairesel çift kırılmanın optik dönüşünün hesaplanması (gama) (a), doğrusal çift kırılmanın hesaplanması (beta) (b ve c), doğrusal çift kırılmanın optik dönüşünün hesaplanması (alfa) (d ve e) (Pham ve Lo, 2012a).

1.4.2 Raman Spektroskopisi

Elektromanyetik ışımının madde ile etkileşiminin incelenmesine spektroskop denir. Spektroskopik yöntemler; emisyon, absorpsiyon, floresan veya saçılma olaylarına dayanmaktadır. Spektrofotometri, kütle spektroskopisi, kızıl ötesi spektroskopisi, Raman spektroskopisi gibi çeşitli spektroskopik yöntemler mevcuttur (Bumbrah ve Sharma, 2016).

Raman spektroskopisi, örnek üzerinden elastik olmayan şekilde saçılan ışığın frekans kaymasını, moleküllerinin dönme ve titreşim enerjilerini ölçen spektroskopik bir ölçüm yöntemidir (Muehlethaler vd., 2013). Ölçümlerde, örnek üzerine gönderilen ışık, malzemenin moleküllerinden çarpılarak saçılırlar. Bu saçılmalar elastik ve elastik olmayan saçılım olmak üzere ikiye ayrılırlar. Elastik saçılım, ışığın frekansında kayma olmayan veya dalga boyunda değişim olmayan saçılımlardır. Işığın frekansı veya dalga boyu değişiyorsa bu saçılma elastik olmayan (inelastik) saçılım olarak adlandırılır (Rostron vd.,

2016). Bu saçılma aynı zamanda Raman saçılımı olarak da adlandırılmaktadır. Raman spektroskopisi, kullanım kolaylığı, minimum örnek hazırlama gereksinimi ve biyolojik maddelerin moleküler yapısına yönelik yüksek hassasiyeti nedeniyle biyomalzemelerin karakterizasyonunda tercih edilmektedir (Kızıl ve Irudayaraj, 2018).

1.4.3 Sinkrotron Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, kompleks molekülleri analiz etmek için kullanılan bir spektroskopi tekniğidir. FTIR spektroskopisinde, örnek malzemeden ölçüm almak için kızılötesi ışık kullanılır. Ölçümlerde örnek üzerine gönderilen ışık, örneğin molekülleri tarafından absorplanır ve bu emilim sonucu moleküller aldıkları enerjiyi titreşimsel bir enerjiye dönüştürür. Her bir molekül veya kimyasal yapıların kendine özgü bir titreşim hareketi ve enerjisi olduğu için alınan ölçümlerden örnek içerisinde bulunan moleküller veya kimyasal yapılar belirlenir. FTIR spektroskopisi, yaklaşık olarak 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki titreşimleri ölçmektedir (Litescu vd., 2012).

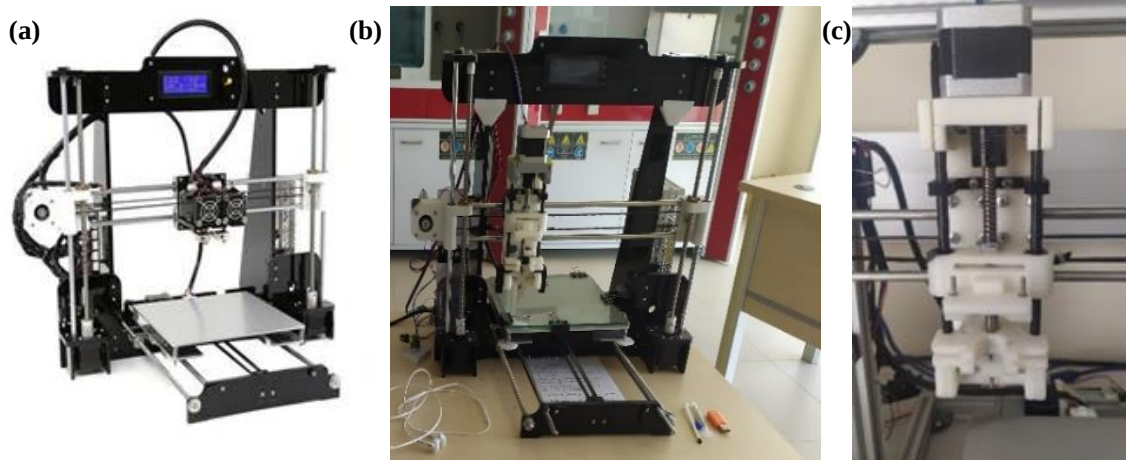
Sinkrotron ışık kökenli Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (sFTIR), malzemeleri mikron seviyede veya mikro alanda analiz eden bir spektroskopi analiz cihazıdır. sFTIR spektroskopisinde kullanılan sinkrotron ışığı (radyasyonu), geleneksel FTIR ışık kaynaklarından yaklaşık 100-1000 kat daha parlaktır. Hasarsız bir analiz yöntemi olan sFTIR, sinkrotron ışık parlaklığından faydalanarak yüksek sinyal-gürültü (S/G) oranında mikro yapılar içerisindeki moleküllerin kimyasal yapısını inceler. Bu teknik örneklerdeki kimyasal bileşenlerin ve fonksiyonel grupların miktarı, bileşimi, yapısı ve dağılımı dahil olmak üzere bilgi sağlamakta ve geleneksel FTIR spektroskopisine göre daha ayrıntılı bilgi vermektedir (Pascolo vd., 2014; Wang vd., 2015).

2. YÖNTEM

2.1 Üç Boyutlu Biyoyazıcı Hazırlanması ve Optimizasyonu

3D biyoyazıcıların ve üç boyutlu yazıcıların genel çalışma prensipleri aynıdır. Çalışmamızda bir biyoyazıcı hazırlamak için üç boyutlu yazıcı kullanılmıştır. İlk taslak biyoyazıcı olarak Anet A8 marka üç boyutlu yazıcı tercih edilmiştir. Bu yazıcının ısıtıcılı baskı kısmı çıkartılmış yerine enjektörden biyomürekkebin basımını sağlayacak parça

konulmuştur. Üç boyutlu yazıcıda filamentin hareketini sağlayan motor bu parçada enjektöre baskı yapılarak basım yapılmasını sağlayan motor olarak kullanılmıştır. Böylelikle yazıcının kodlamalarında herhangi bir değişiklik yapılmaksızın enjektöre baskı yapılarak basım gerçekleştirilmiştir. Baskı işlemi; motora takılan vidayı döndürerek enjektör üzerindeki parçanın hareketi sağlanmakta ve enjektöre basınç uygulanmıştır. Uygulanan basınçta enjektörün yerinden çıkması ve dengesizlik oluşmaması için ise alt kısım ile enjektöre destek uygulanmıştır.



Şekil 9. a) Anet A8 3 boyutlu yazıcı b) 3 boyutlu biyoyazıcının ilk taslak hali c) Enjektörün baskı yapması için kullanılan basım parçası

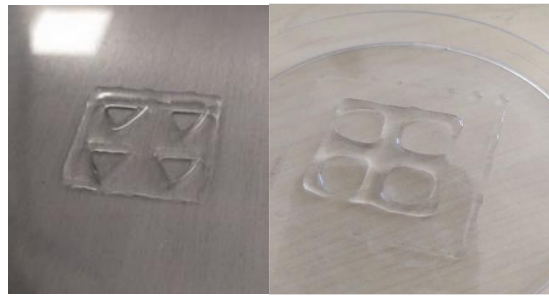
2.1.1 Biyoyazıcının Optimizasyon Ayarının Yapılması

Biyoyazıcının tasarım modelinin deneme basımlarını gerçekleştirmek için, iki farklı viskoziteye sahip biyoink kullanılmıştır. Bu mürekkepler Wei ve arkadaşlarının çalışması referans alınarak belirlenmiştir (Wei vd., 2022). Viskozitesi düşük biyoink için sodyum aljinat hidrojel ve viskozitesi yüksek biyoink için ise sodyum aljinat/polivinil alkol (PVA) karışım hidrojelleri kullanılmıştır. Sodyum aljinat hidrojel; %5 (a/h) konsantrasyonda ultra saf su içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır. Sodyum aljinat/PVA hidrojel; çalışmadaki en verimli sonucu veren değerler olarak %16 (a/h) konsantrasyonunda ve sodyum aljinat/PVA oranı 8/2 olacak şekilde hidrojeller hazırlanmıştır. Hidrojel saf suda iki gün boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak çözdürülmüştür. Biyoinkler hazırlandıktan sonra basımı yapılacak üç boyutlu şekiller Solidworks programı kullanılarak çizilmiştir. Bu üç boyutlu çizimler, Ideamaker programı ile dilimlenerek g-code diline dönüştürülerek biyobasıma hazır hale getirilmiştir. G-code

dilleri Anet A8'in kendi yazdırma programı olmadığı için üçüncü taraf program veya hafıza kartı kullanılarak yazıcıya aktarılması sağlanmıştır.

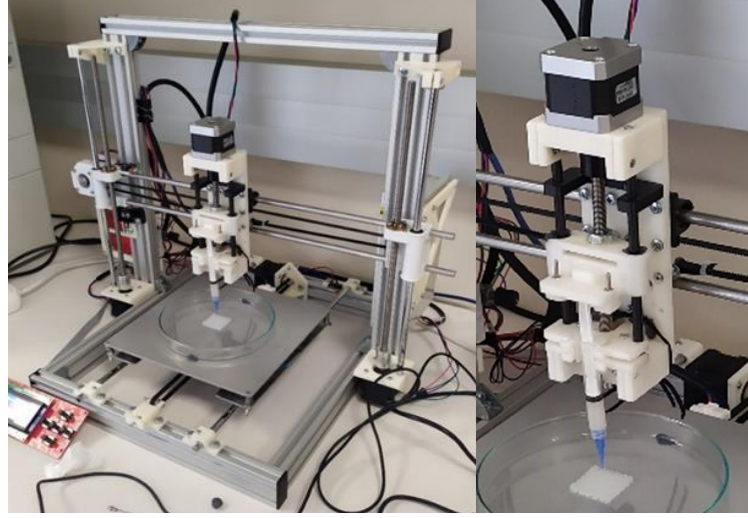
Sodyum aljinat hidrojelinin biyobasımında kullanılacak olan parametreler g-code hazırlama programının ilk önerdiği değerlere göre belirlenmiştir. Bu değerler; x, y ve z eksenlerinde enjektörün hareket hızı 100 mm/s ve enjektörün baskı hızı 100 mm/s²'dir. Basımda kullanılan örneklerin dış kenar uzunlukları 30 mm ve iç boşlukların kenar uzunlukları ise 10 mm'dir. Baskıda kullanılan iğne çapı 0.41 mm'dir, bu iğne çapı 3 boyutlu yazıcılarda standart olarak kullanıldığı için tercih edilmiştir.

Sodyum aljinat hidrojel ile yapılan deneme çalışmalarında, biyobaskı işlemi başarı ile gerçekleşmiş, basılan ürün görsel olarak şeklini korumuştur. Sodyum aljinat hidrojelinin viskozitesi düşük olduğu için basım yapılırken hem enjektör üzerinde hem de plastik konik iğne ucunda basınç oluşmadığı için basım şekilleri çizildiği gibi gerçekleşmiştir.



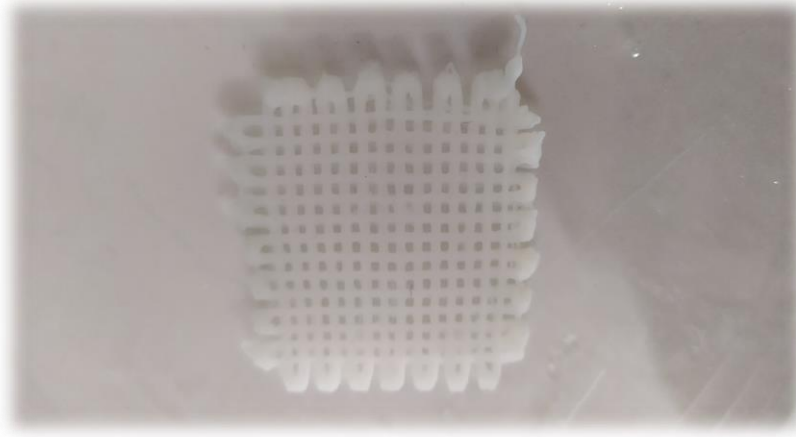
Şekil 10. %5 Sodyum aljinat deneme çalışmalarının biyobasımları

Viskozitesi yüksek olan biyoink daha yoğun malzemelerin basılabilirliğinin denenmesi amacıyla kullanılmıştır. Sodyum aljinat/PVA hidrojelinin basımında iğne ucu üzerinde oluşan basınçtan dolayı, enjektör eğilmiş ve iğne ucu petri cama temas ederek sürtünmeye neden olmuştur. Bundan dolayı basımlar yapılamamıştır. İğne ucunda oluşan basının azaltılması için önce enjektör hareket hızı ve baskı hızı kademeli olarak düşürülmüş ancak enjektörde oluşan basınçtan dolayı görülen eğilme sorunu düzeltilememiştir. Bu sorunun çözülmesi için biyoyazıcının plastikten oluşan iskelet yapısı daha dayanıklı ve aynı zamanda da hafif olan alüminyum profil ile değiştirilmiştir.



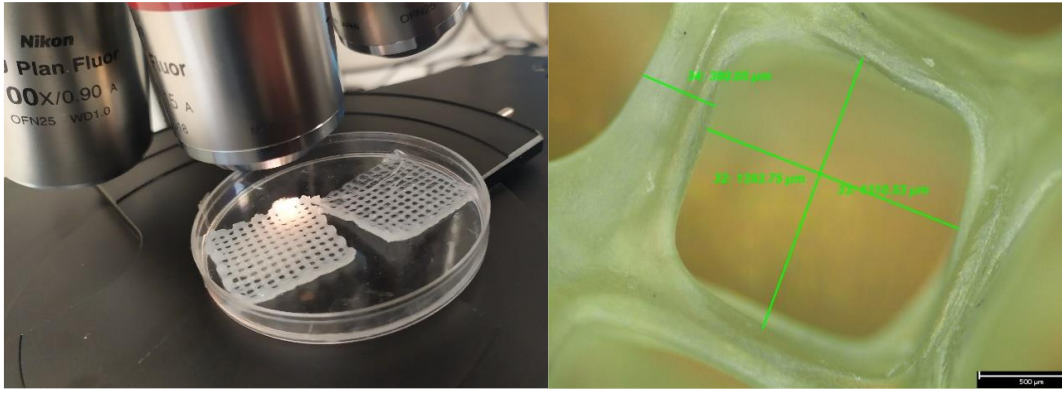
Şekil 11. Alüminyum profil kullanılarak yeniden tasarlanmış biyoyazıcı

Alüminyum profil ile daha sağlam hale getirilen biyoyazıcı ile sodyum aljinat/PVA karışım hidrojel 50mm/s enjektör hareket hızı ve 50 mm/s² baskı hızı ile ızgara şeklinde yapı iskelesi olarak basılmıştır. Basılan şeklin çiziminde dış kenar uzunluğu 30 mm ve iç karelerin kenar uzunluğu ise 2,5 mm'dir. Basımda kullanılan iğne ucu çapı 0.41 mm'dir.



Şekil 12. Sodyum aljinat/PVA karışım hidrojel ile basılan yapı iskelesi

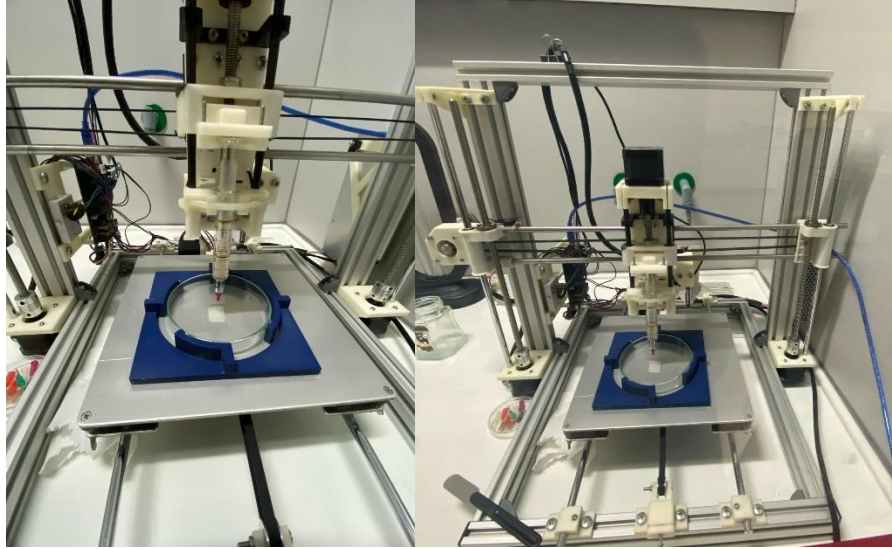
Basılan yapı iskeleleri kurutulmuş ve iç kareleri optik mikroskop altında incelenmiştir. Kurutulan yapı iskelelerinin iç kenar uzunluklarının yaklaşık olarak 1.3 mm ile 1.4 mm arasında değişiklik gösterdiği ve çizgilerin kalınlığı yaklaşık olarak 0.4 mm olduğu ölçülmüştür.



Şekil 13. Sodyum aljinat/PVA karışım tabanlı yapı iskelesinin optik mikroskop altında incelenmesi

Yapılan denemeler sonucunda biyoyazıcının hız ve tasarım optimizasyonları sentetik olarak gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlara göre biyoyazıcının istenilen şekillerde ve istenilen parametrelerde basım yapılabildiği gözlemlenmiştir.

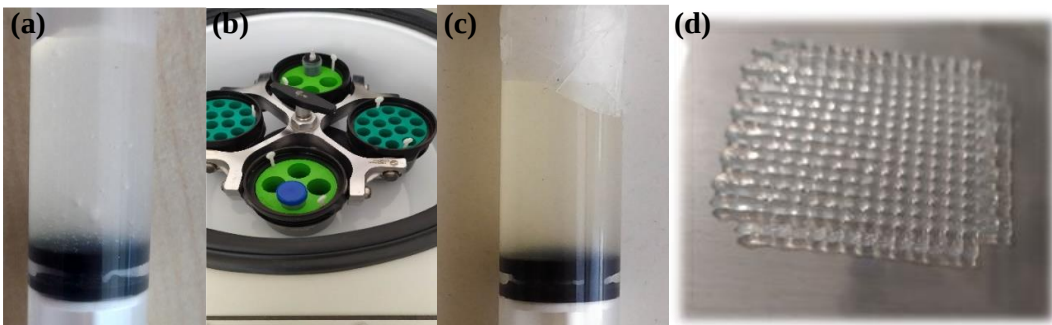
Biyoyazıcının basım parametrelerinin belirlendikten sonra basımlarda kullanılmak üzere bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu değişikliklerden biri plastik konik iğne ucu kullanıldığında fazla malzeme harcandığından plastik konik uçlar, metal uçlu kısa künt iğne uçlar ile değiştirilmiştir. Yaptığımız değişikliklerden bir diğeri basım olarak kullanılan plastik enjektörler karşılaştıkları basınçta eğilerek deforme oldukları için kolay temizlenebilen ve steril edilebilen cam enjektör ile değiştirilmiştir. Biyoyazıcının, iğne ucu veya enjektör boyutu değiştirildiği zaman başlangıç yüksekliğinin kolay belirlenebilmesi için yükseklik sensörü takılmıştır. Bu sensörün takılabilmesi için yükseklik sensörüne sahip bir 3 boyutlu yazıcı olan Prusa MK3S adlı yazıcının anakartı alınmış ve biyoyazıcıda bulunan Anet A8 yazıcının anakartı ile değiştirilmiştir. Yapılan bu değişiklikle hem başlangıç yüksekliği kolay ayarlanabilmiş hem de dilimleme ve g-code yazdırma dili yazıcının kendi programı ile kolaylıkla yapılmıştır. Bu değişiklik ayarlarının yapılması ile 3 boyutlu biyoyazıcı; farklı yoğunluk, şekil, enjektör boyutu veya iğne ucu boyutundaki malzemelerin kullanılmasıyla basım yapmaya hazır hale getirilmiştir.



Şekil 14. 3 Boyutlu biyoyazıcının son hali

2.1.2 Kollajen Biyobaskı Denemeleri

Kollajen biyomürekkebinin hazırlanışı; 17.4 mM asetik asit içerisinde %4 (a/h) konsantrasyonunda kollajenin küçük parçalar halinde eklenmesiyle hazırlanmıştır. Kollajenin çözündürülmesi işleminde yapısının bozulmaması için hidrojel 17°C'nin altında sıcaklıkta bekletilmiştir. Hazırlanan kollajen biyomürekkebi enjektör içerisine yüklenmiştir. Enjektör içerisindeki biyoinkte hem karışımdan hem de yüklemeden dolayı oluşan küçük hava kabarcıkları gözlemlenmiştir. Hava kabarcıklarını biyomürekkebin içerisinden gidermek için santrifüj cihazı ile merkezkaç kuvveti uygulayarak mürekkebin sıkışması ve sağlanmıştır. Santrifüjle döndürme işlemi 1000 xg hızında 15 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası enjektör biyoyazıcıya yerleştirerek 50 mm/s hareket hızında ve 50 mm/s² baskı hızında basım işlemi yapılmıştır.



Şekil 15. a) Enjektör içerisine yüklenmiş hava kabarcığı bulunan biyoink b) Santrifüjleme işlemi c) Santrifüjleme sonrası enjektörde hava kabarcığından tamamen arındırılmış

kollajen biyoink d) Hava boşluğu olmadan 30 mm dış kenar uzunluğu 2,5 mm iç kare kenar uzunluğu olan kollajen yapı iskelesi

2.2 Ekstraksiyon İşlemleri

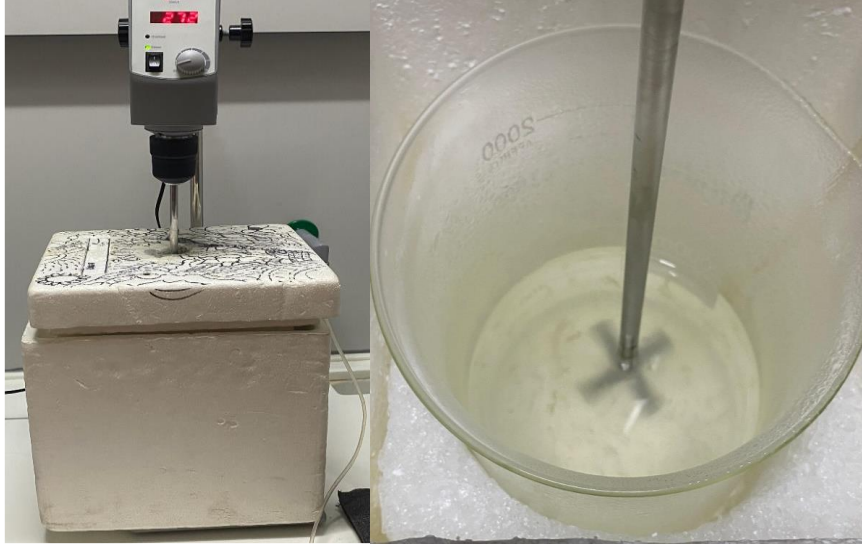
Kollajen ekstraksiyonu için laboratuvar koşullarında kolay ulaşılabilecek ve ekstraksiyon için iyi bir kollajen verimi sağlayan iki farklı kaynak kullanılmıştır. Bu kaynaklardan biri sığır derisi, diğeri ise sıçan tendonudur. Bu kaynakların kullanılmasının diğeri bir sebebi ise ekstraksiyon işleminin kolay olmasıdır.

2.2.1 Sıçan Kuyruğundan Kollajen Ekstraksiyonu

Kollajen ekstraksiyonu için kullanılan hayvan temelli ham maddelerden biri sıçan kuyruğudur. Kollajenin sıçan tendonundan ekstraksiyon protokolü González-Masís ve arkadaşlarının çalışması referans alınarak yapılmıştır (González-Masís, Cubero-Sesin, Corrales-Ureña, vd., 2020). Kollajen ekstraksiyonu için kullanılacak olan sıçan tendonları İstanbul Medeniyet Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan bağış olarak alınmıştır. Sıçan kuyruğunun derisi bistüri yardımı ile kesilmiş ve yüzülerek kuyruktan alınmıştır. Kuyruk üzerindeki tendonlar, sıçan kuyruğundaki beyaz şeritli yapılar, pens yardımı ile alınıp petri içerisine koyulmuştur. Bu yapılar alınırken herhangi bir doku parçası almadan tek tek kuyruktan alınıp petri içerisine koyulmuştur. Kollajenin saflığına ve çözülebilirliğine herhangi bir etkisi olmaması için doku parçalarının alınmadığına emin olunmuştur. Ekstraksiyon aşamasında 3 adet sıçan kuyruğundan yaklaşık olarak 5 gram tendon parçası elde edilmiştir. Kuyrukta bulunan tendonların ayrılma işlemi yapının bozulmaması için 4 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Tendonlar, %3 (h/h)'lük asetik asit solüsyonu içerisine %0,5 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde (her 1 gram tendon için 200 ml %3 (h/h)'lük asetik asit) eklenmiştir. Kollajen, asetik asit içerisinde pH:2 veya 2'den düşük seviyelerde daha verimli bir şekilde çözölmektedir (İbrahim vd., 2023). Bu yüzden tendonun asetik asit içerisinde çözödürölme işlemi sırasında solüsyonun pH değeri 2 veya daha düşük olacak şekilde ayarlanmıştır.

Solüsyon 72 saat boyunca 4 °C'de mekanik karıştırıcı yardımı ile 250-300 rpm hızında karıştırılmıştır. Çözödürme işlemi boyunca solüsyon pH değeri 2 olacak şekilde sürekli kontrol edilmiştir. pH artması durumunda solüsyona 1M asetik asit eklenerek pH:2 seviyesinde tutulmuştur.



Şekil 16. Mekanik karıştırıcı yardımı ile karıştırılarak çözdürülen tendon örnekleri

Tendonlar 3 gün boyunca karıştırıldıktan sonra 7000 xg kuvvetinde 1 saat boyunca santrifüjlenerak çözülmeyen tendonların çöktürülmesi sağlanmıştır.

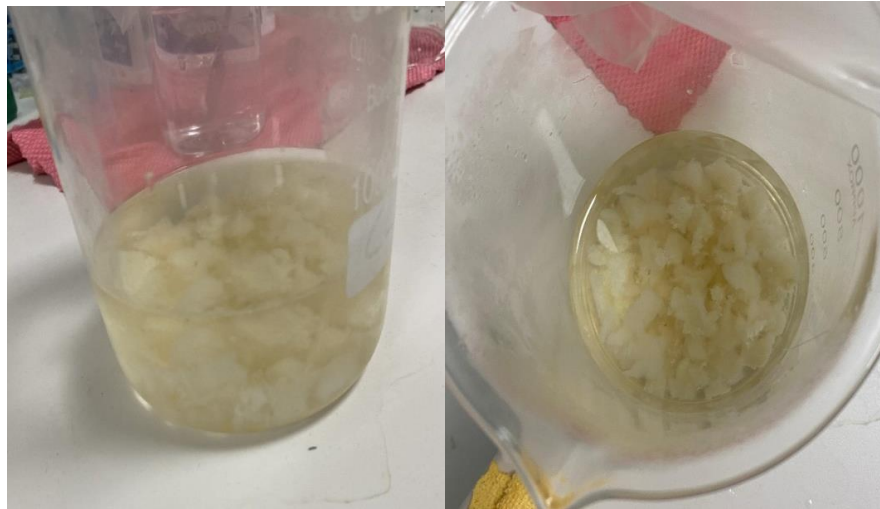
Elde edilen kollajen çözeltisinden, sıvıyı uzaklaştırmak ve sade kollajeni toz halde elde etmek için liyofilizasyon işlemi yapılmıştır. Liyofilizasyon işlemi öncesi malzeme -80 °C’de buz kristalleri olacak şekilde dondurulmuştur. Dondurulan, malzeme tekrar çözülüp sıvı forma gelmemesi için -55 °C sıcaklığa sahip hazneye yerleştirilmiştir. Malzemede bulunan buz kristalleri, bir pompa yardımı ile sürekli vakumlanarak malzemeden uzaklaştırılmış ve tüm buz kristalleri uzaklaştığında geriye toz halde bir yapı kalmıştır. Kollajenlerin liyofilizasyon işlemi, 1 mbar basınç altında 96 saat boyunca sürmüştür. Liyofilizasyon sonrası tamamen kuru bir şekilde süngerimsi yapıda elde edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası 5 gram tendondan yaklaşık 1,52 gram kollajen elde edilmiştir.

2.2.2 Sığır Derisinden Kollajen Ekstraksiyonu

Sığır derisinden kollajen ekstraksiyonu için Kazancı ve arkadaşlarının çalışması referans alınmıştır (Kazancı vd., 2021). Ekstraksiyonda kullanılacak sığır derisi bağış olarak alınmıştır. Sığırdan alınan deri üzerindeki kıl, tüy ve yağ dokusu bistüri yardımı ile ayrılarak temizlenmişlerdir. Temizlenen deri parçaları küçük parçalar halinde kesilmiş ve -20 °C’de stok olarak saklanmıştır.

Sığır derisi parçalarındaki kıl, tüy ve yağ dokusu alınsa bile üzerinde hala kalma ihtimali bulunmaktadır. Kalan bu doku parçalarını gidermek için sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi kullanılmıştır. 20 gram sığır derisi, 0.1 M NaOH çözeltisinde 48 saat bekletilerek

kalan parçalar çözdürülmüş ve malzemeden uzaklaştırılmıştır. NaOH solüsyonu 24 saatte bir değiştirilmiş ve işlem sonrası deriler saf su ile üç kez yıkanmıştır.

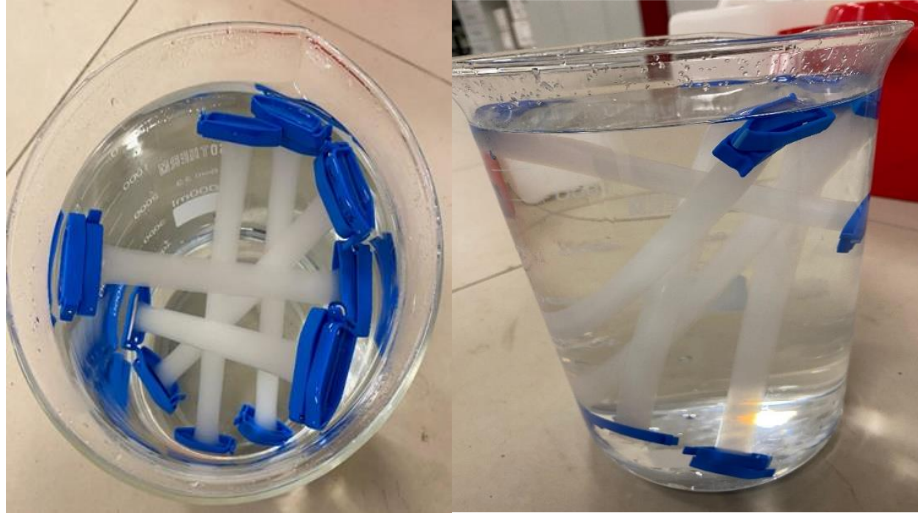


Şekil 17. Sığır derisinden elde edilen temizlenmiş deri parçalarının NaOH solüsyonu içerisinde bekletilme aşaması

Sığır derileri 300 ml hacimde 10 milimolar (mM) hidroklorik asit (HCl) solüsyonuna eklenmiştir. Deri parçaları solüsyona eklendikten sonra deriler NaOH çözeltisinden alındığı için solüsyonun pH değeri ikiden yüksektir bu yüzden solüsyon önce biraz karıştırılmış ve pH:2’de sabit olana kadar üzerine HCl asit eklenmiştir. pH değeri sabit olana kadar bu işlem tekrarlanmıştır. pH:2’de sabitlendikten sonra solüsyona 1 gram pepsin koyularak kollajen mekanik karıştırıcı yardımı ile 4 °C’de karıştırılmaya bırakılmıştır. Kollajenlerin çözülmesiyle solüsyon akışkanlığı düşmüş ve jel kıvamına gelmiştir. Deri parçalarından çözölen malzeme her 24 saatte bir, ayrı bir behere elek yardımı ile süzölmüştür. Süzölen solüsyon 4 °C’de saklanmıştır. Kalan deri parçaları için işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

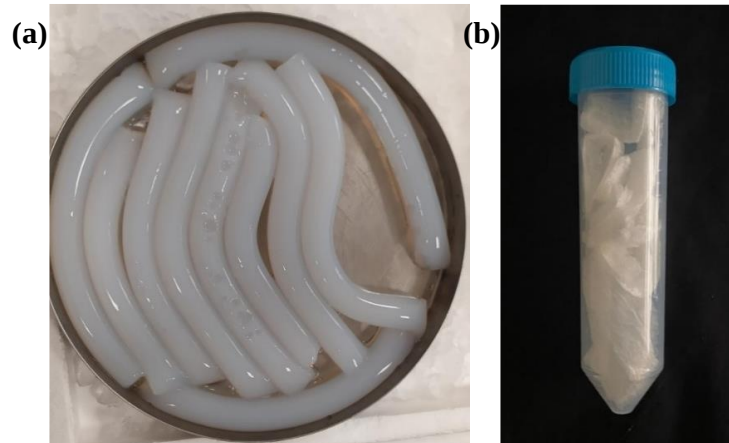
Çözdürme işlemi sonrası, reaksiyonu durdurmak amacıyla solüsyona 2 M üre ve 50 mM sodyum klorür (NaCl) eklenmiş ve tris-edta ile pH değeri 7’de sabitlenmiştir. Böylelikle enzim aktivitesi durdurulmuştur. Çözelti içerisinde bulunan deri parçaları santrifüjleme işlemi ile çöktürölerek solüsyondan uzaklaştırılmıştır. Solüsyon içerisinde bulunan tuz kalıntılarını uzaklaştırmak için diyaliz işlemi yapılmıştır. Diyaliz işlemi için solüsyon diyaliz membranlarına yüklenmiştir ve 5 litre 0.1X PBS (fosfat tamponlu salin) içerisine koyulmuştur ve 4 gün boyunca diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. PBS çözeltisi 48 saatte bir yenilenmiştir. Diyaliz işlemi sırasında diyaliz suyunun iletkenlik ve pH üzerindeki

değişimi takip edilmiştir ve diyaliz suyu 24 saatte bir değiştirilmiştir. Diyaliz işleminde diyaliz suyunun pH değeri kollajen içerisindeki asit dışarı çıktığı için yükselmekte ve kollajen içerisindeki tuzlar dışarı çıktığı için ise iletkenlik değeri artmaktadır.



Şekil 18. Diyaliz membranları içerisinde bulunan deri kollajen solüsyonu

Diyalizden sonra elde edilen kollajenler, liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuştur. Liyofilizasyon işlemi; -55 °C'de 1 milibar vakum altında 4 gün süre ile gerçekleşmektedir. Liyofilizasyon işlemi sonrası tamamen kurumuş hafif sert süngerimsi kollajen elde edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası 20 gram deriden yaklaşık olarak 3,2 gram kollajen üretimi gerçekleşmiştir.

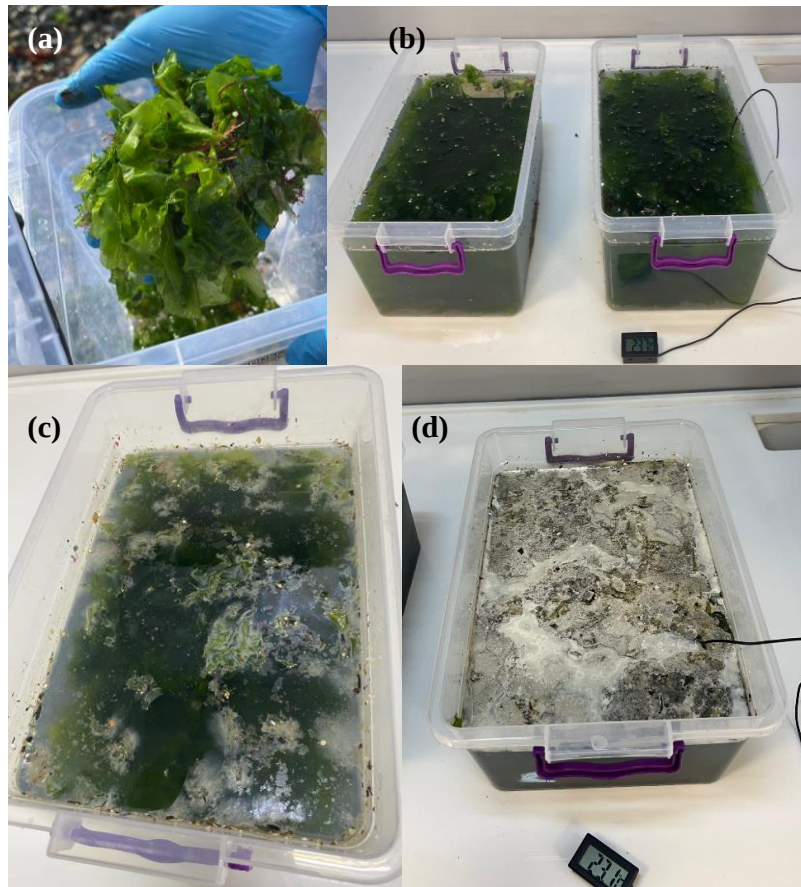


Şekil 19. a) Liyofilizasyon öncesi, diyaliz membranlarından alınan deri kollajen b) ekstraksiyon sonrası elde edilen deri kaynaklı kollajen

2.2.3 Müsilaj Ekstraksiyonu

Müsilajın ekstraksiyonu için Mecozzi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma göz önünde bulundurulmuştur (Mecozzi vd., 2008). Müsilaj ekstraksiyonu için; T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden E-

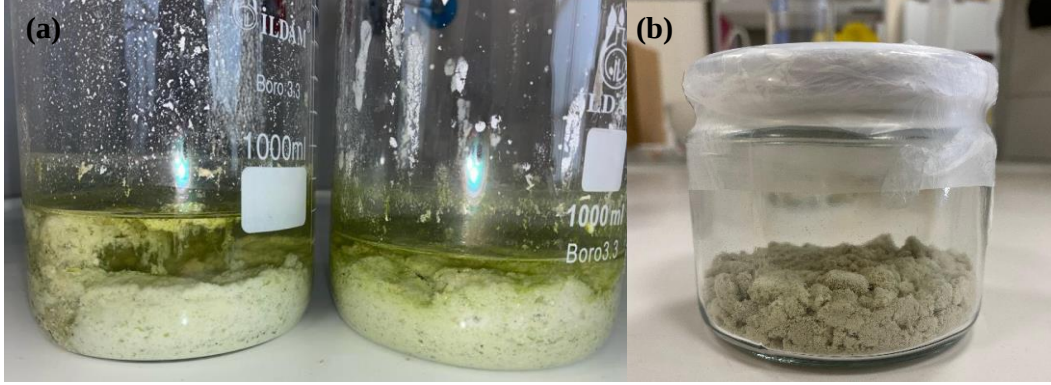
21264211-288.04-7216683 sayılı araştırma izni ve yine T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nden E-90461321-407-7657550 sayılı araştırma izinleri alınmıştır. Ekstraksiyon için Caddebostan-Bostancı sahilden deniz marulları ve yine aynı bölgeden deniz suyu toplanmıştır. Toplanan deniz marulları saf su ile içerisinde bulunan deniz kumu, çakıl veya deniz kabuklarından arındırmak ve kirliliği gidermek amacıyla yıkanmıştır. Deniz marulları 10 litrelik tanklara koyulmuştur ve üzerine habitatını bozmamak ve farklı mikro organizmalar olmaması için aynı bölgeden alınan deniz suyu eklenmiştir. Müsilaj oluşumunda sıcaklık değeri etken değerlerden biridir (Mecozzi vd., 2008). Sıcak yaz havalarda deniz suyunun sıcaklığı simüle edilerek, deniz marulu örneklerinin bulunduğu ortam sıcaklığı ve deniz suyu sıcaklığı 23 °C'de tutulmuştur.



Şekil 20. a) Sahil kenarından toplanan deniz marulları b) Müsilaj oluşumu için deniz suyu bekletilen deniz marulu. Deniz suyu üzerinde oluşan müsilaj tabakaları (c ve d)

7. günün sonunda üst tabakada oluşan müsilaj katmanları süzülerek ayrı bir kaba alınmıştır (Şekil 21.a). Suyun hacmini düşürmek için, üzerine hacminin 2 katı oranında %96 (h/h)'lık etil alkol eklenmiştir (müsilaj tabakası:etil alkol) ve bir gün bekletilmiştir.

Ortamin yoğunluğu müsilağın yoğunluğundan düşük olduğu için oluşan müsilağlar dibe çökmüştür. Müsilağlar, etil alkol ve su karışımından kolaylıkla santrifüj edilerek ayrılmıştır. Santrifüj işleminden sonra, santrifüj tüpünün tabanında kalan müsilağ saf su ile süspanse hale getirilmiş ve liyofilizasyon işlemi ile toz müsilağ elde edilmiştir.



Şekil 21. a) Deniz suyundan alınan müsilağ katmanları b) Elde edilen müsilağ örneği

Biyomalzemelerin Ekstraksiyonu		
Kullanılan Kaynak Malzeme	Kullanılan Miktar	Elde Edilen Malzeme Miktarı
Sıçan Kuyruğu	100 gram	~30,5 gram
Sığır Derisi	100 gram	~16 gram
Deniz Müsilağı	1 litre	~0,75 gram

Tablo 2. Biyomalzemelerin ekstraksiyonunda kullanılan ve elde edilen malzeme miktarları

2.3 Kollajen Tabanlı Yapı İskelelerinin Basımı

2.3.1 Kollajen Hidrojellerinin Hazırlanması

Biyoyazıcıda biyoink olarak kullanılması amacıyla hidrojeller hazırlanmaktadır. Kollajen hidrojellerinin hazırlanması için önce, sıçan tendonundan ekstrakte edilen kollajenler küçük parçalar halinde kesilmiştir. Kollajen küçük parçalara ayrıldıktan sonra üzerlerine 17,4 mM asetik asit çözücü olarak eklenmiştir. Hazırlanan solüsyon 4°C’de bir gün boyunca bekletilmiştir. Kollajen, mekanik homojenizatör yardımı ile parçalanarak karıştırılmıştır. Mekanik homojenizatör ile parçalama işlemi 12000 rpm’de (devir/dakika), birer dakika arayla 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karışan hidrojel daha sonra tekrar 4°C’de bir gün boyunca dinlenmeye bırakılmıştır. Dinlenme sonrası tekrar mekanik homojenizatörle parçalama ve karıştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler kollajen tamamen çözünene ve homojen bir hidrojel yapı oluşana kadar tekrarlanmıştır. Biyoink

olarak hazır hale gelen kollajen hidrojel­leri, 4°C’de hava almayacak şekilde saklanmıştır. Aynı işlemler sığır derisinden ekstrakte edilen toz kollajende de gerçekleştirilmiştir. Kollajen hidrojel­leri 4 ml hacimde, farklı konsantrasyonların basıma etkisini incelemek amacıyla %3 (a/h), %4 (a/h) ve %5 (a/h) olacak şekilde üç ayrı konsantrasyonda hazırlanmıştır.



şekil 22. Kollajen hidrojel­lerinin hazırlanma aşamaları

Çalışmada iki farklı kimyasal çapraz bağlayıcı olarak kullanılması tercih edilmiştir. Bunlar, genipin ve riboflavindir.

2.3.2.1 Genipin özeltisinin Hazırlanması

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılacak olan genipin, stok çözelti olarak hazırlanmıştır. 10 ml %70 (h/h)’lik etil alkol içerisine, 0,2 gram toz halde bulunan genipin (Wako) hassas tartı ile tartılıp eklenmiştir. Karışım, 18°C’de tamamen özölene kadar manyetik karıştırıcı yardımı ile yapılmıştır. Karışım sonunda, %2 (a/h) konsantrasyonundaki stok genipin özeltisi 4°C’de muhafaza edilmiştir.

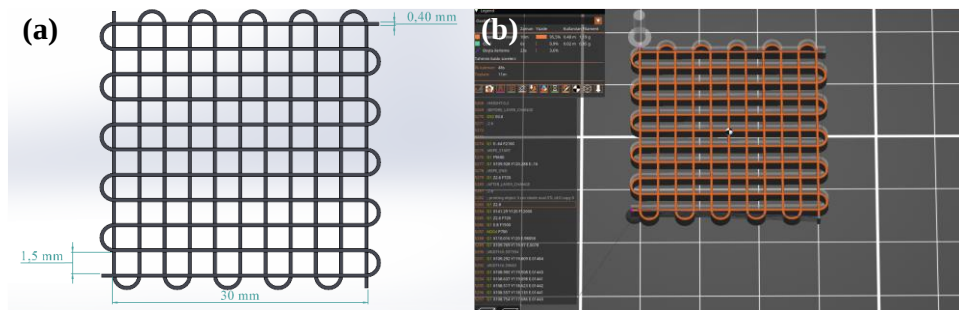
2.3.2.2 Riboflavin özeltisinin Hazırlanması

Riboflavin apraz bağlayıcı solüsyonunda, riboflavin hidrat 5’-monofosfat sodyum tuzu (Sigma) kullanılmıştır. Riboflavin %1 (a/h) konsantrasyonda stok olarak hazırlanmıştır. 2 ml 1X PBS (Fosfat Bazlı Salin) içerisine, 0,02 gram riboflavinin hassas tartı ile tartılıp eklenmiştir. Riboflavinin eklenmesinden sonra çözelti manyetik karıştırıcı yardımı ile 18°C’de tamamen özölene kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan riboflavin stok çözeltisi gün ışığı ile etkileşimde yapısının bozulması sebebiyle alüminyum folyo ile etrafı sarılıp 4°C’de muhafaza edilmiştir.

2.4 Yapı İskelelerinin Basılması

2.4.1 Yapı İskelelerinin Çizilmesi ve Biyobasım Hazırlığı

Biyobasım için kullanılacak olan şekil, AutoCAD programı ile 3 boyutlu olarak yatay ve dikey düz çizgilerin çizilmesiyle oluşturulmuştur. Her bir çizgi birbirine oval şekilde birleştirilmiştir ve bir ızgara deseni meydana gelmiştir. Çizilen ızgaranın boyutları 30 mm X 30 mm kenar uzunluklarına sahiptir. Çizgilerin kalınlığı 0,40 mm ve çizgiler arasındaki mesafe ise 1,5 mm'dir. Kollajen yapı iskelelerinde, yüzey alanını arttırmak amacı ile yapı iskelesindeki çizgiler arasındaki mesafe 2,5 mm'den 1,5 mm'ye kısaltılmıştır. Şeklin kalınlığının daha sonra değiştirilebilir olması için 4 cm olarak ölçeklendirilmiştir. 3 boyutlu çizilen şekil PrusaSlicer programı ile biyoyazıcı için basıma uygun dilimlenmiş ve Gcode dosyası olarak kaydedilmiştir. Notepad++ programı kullanılarak her bir katman arası mesafe yapı iskelesinin basımı için kullanılan iğne ucu çapıyla aynı olacak şekilde ayarlanmış ve katman sayısı istenilen doğrultuda belirlenmiştir.



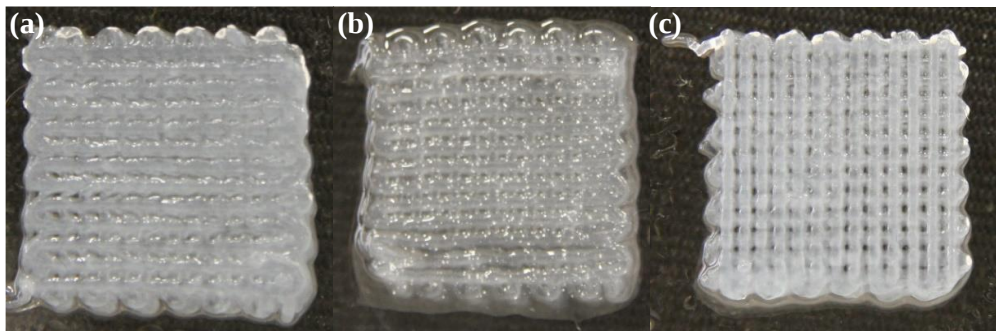
Şekil 23. a) AutoCAD programı ile çizilen yapı iskelesi. b) PrusaSlicer ile 3 boyutlu çizimin dilimlenmesi

2.4.2 Çapraz Bağlayıcı Olmadan Yapılan Biyobasımlar

Biyoyazıcıda, biyoink için doğal malzemeler kullanıldığından, basılan üründe herhangi bir bakteri, küf veya mantar üreme ihtimali bulunmaktadır. Bu yüzden, biyobasım öncesinde, kullanılacak malzemeler (cam enjektörler, cam petri kapları gibi) otoklavlanmış ve basımın yapılacağı alan ve saklama için kullanılan plastik petri kapları da %70 (h/h)'lik etil alkol ile silinmiştir. Daha sonra ortam, 36 watt güce ve 254 nm dalga boyuna sahip morötesi C (ultraviyole, UV-C) ışığa 30 dakika boyunca maruz bırakılmıştır.

Hazırlanan %3 (a/h), %4 (a/h) ve %5 (a/h) konsantrasyonlardaki biyoinkler steril plastik enjektörlere yüklenmişlerdir. Açılı santrifüj ile 1250 xg kuvvetinde 30 dakika süresince sıkıştırılmıştır. Sıkıştırılan biyoinkler plastik boru aparatı yardımıyla biyoyazıcıda kullanılacak olan cam enjektöre aktarılmıştır. Pronterface programı ile hazırlanan şekil yazıcıya aktarılmıştır. Sıçan tendonundan ekstrakte edilen kollajen ile hazırlanan biyoink ile 3 katmanlı yapı iskelesi basımı 17°C’de gerçekleştirilmiştir. Basım, 10 mm/s hareket hızında, 1,07 mm/s² baskı hızında ve 0,26 mm, 0,30 mm ve 0,34 mm kör iğne ucu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapı iskelesindeki iki çizgi arasındaki mesafe kısaltıldığından, optimizasyonda kullanılan 0,41 mm çapa sahip iğne ucu ile yapılan basımlarda boşluklardaki mesafenin kısa olmasından dolayı kapanma gözlemlenmiştir. Bu yüzden farklı çaplara sahip iğne uçları ile denem yapılmıştır. Basılan şeklin kenar uzunlukları 30 mm X 30 mm’dir. Basım cam petri içerisinde yapılmıştır.

Basımlarda %4 (a/h) konsantrasyona sahip tendondan elde edilen kollajen hidrojel kullanılmıştır. 0,26 mm çapından daha küçük çaplara sahip iğne uçları kullanıldığında kollajenin tokluğundan ve iğne çapları çok küçük olduğundan basım yapılamamıştır. 0,26 mm, 0,30 mm ve 0,34 mm çaplarına sahip iğne uçları kullanıldığında basım yapılabilmektedir ancak 0,34 mm çapındaki iğne ucunda kalınlıktan dolayı yapı iskelesindeki boşluklar kapalı olarak basılmıştır. 0,30 mm çapına sahip iğne ucu kullanıldığında ise boşluklar gözlemlense de bazı boşluklarda kapanma meydana gelmiştir. 0,26 mm çapa sahip iğne ucunda basım yapıldığında yapı iskelesindeki boşluklar net bir şekilde görülebilmektedir. Bundan sonraki yapılan sıçan tendonu kaynaklı kollajen tabanlı yapı iskelelerinde 0,26 mm çapa sahip iğne ucu kullanılmıştır.



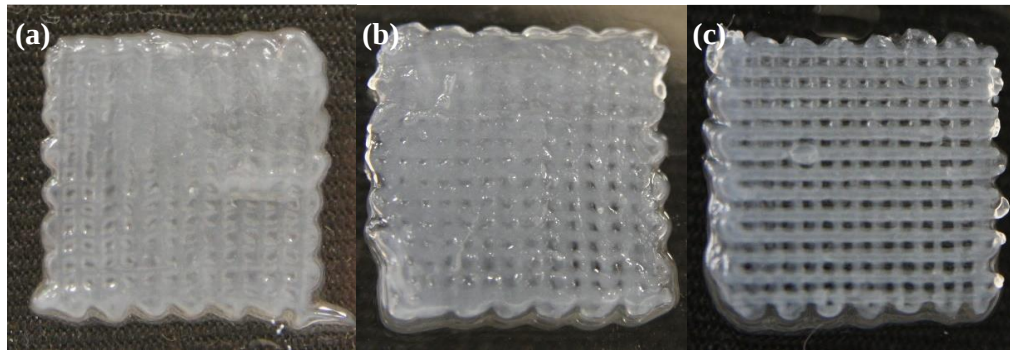
Şekil 24. a) 0,34 mm b) 0,30 mm c) 0,26 çapa sahip iğne uçlarıyla basılan kollajen yapı iskeleleri

İğne ucu çapı belirlendikten sonra Koo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma referans alınmış ve 3 farklı konsantrasyona sahip kollajenlerden biyoinkler hazırlanarak

basılabilirlikleri karşılaştırılmıştır (Koo vd., 2018). %3 (a/h) konsantrasyondaki tendon kollajen biyoinkinde hidrojel çok akışkan olduğu için boşluklarda basım esnasında kapanma olmuştur ve basım sonucunda yapı iskelesi içi dolu kare şeklinde olmuştur.

%4 (a/h) konsantrasyonuna sahip kollajen ile yapılan basımlarda yapı iskelesinde bulunan boşluklar görülmüş olmasına rağmen, iskeledeki bazı boşlukların kapandığı veya kapanmak üzere olduğu gözlemlenmiştir.

%5 (a/h) konsantrasyonuna sahip kollajen biyoink ile basım yapıldığında, yapı iskelesi içerisindeki boşlukların formunu korumuş ve boşluklar net bir şekilde gözle görülmektedir. Sıçan tendonundan ekstrakte edilen kollajen ile yapılan basımlarda da %5 (a/h) konsantrasyonuna sahip biyomürekkebin basımında da aynı sonuca ulaşılmıştır.



Şekil 25. a) %3 (a/h), b) %4 (a/h) ve c) %5 (a/h) konsantrasyonlarına sahip kollajen biyoinklerle basılan yapı iskeleleri

Sığır derisinden ekstrakte edilen kollajen ile hazırlanan biyoink, sıçan kuyruğundan ekstrakte edilen kollajen ile aynı basım parametrelerinde basılmıştır. Basım, 10 mm/s hareket hızında, 1,07 mm/s² baskı hızında yapılmıştır. Sığır derisinden ekstraksiyonu yapılan kollajenden hazırlanan biyoinklerle yapılan basımlarda ise, biyo mürekkebin akışkanlığı yüksek olduğu için daha küçük çaplı iğne ucu (0,24 mm çapa sahip) tercih edilmiştir.

Biyoink Türü	İğne Ucu Çapı (mm)	Konsantrasyon (%)	Hareket Hızı (mm/s)	Basım Hızı (mm/s ²)
Sıçan Tendonundan Ekstrakte Edilen Kollajen	0,26	5	10	1,07
Sığır Derisinden Ekstrakte Edilen Kollajen	0,24	5	10	1,07

Tablo 3. Yapı iskeleleri için ideal sonuç veren parametreler

Kollajen yapı iskeleleri basımdan sonra cam petri kabının yüzeyine yapıştığı için yapı bozulmadan yüzeyden kaldırılamamıştır. Bu yüzden sıvı içerisinde yüzdürerek alınması denenmiştir. İlk olarak basım doğrudan saf su içeren cam petride yapılmaya çalışıldığında biyoink yüzeye tutunamadığı için basım yapılamamıştır. Sonraki denemede basım yapıldıktan sonra yapı iskelesi üzerine yapı iskelesinin üzerini örtecek miktarda saf su dökülerek kaldırılmaya çalışılmış ancak yapı kaldırılmadan bozulmuştur.

PBS (Fosfat Yüklü Salin) hücre deneylerinde yıkama amaçlı kullanıldığı için, yapı iskelesi üzerine PBS eklenmiştir. Yapı iskelesi yüzeyden ince spatül aracılığı ile kolaylıkla kaldırılmıştır ancak yapı çok yumuşak olduğu için katlanmış ve yapı bozulmuştur.

Son olarak alkollerde bulunan hidroksil grubu sayısının artması kollajeni daha stabil hale getirdiği için etil alkol yapı iskelesi üzerine ilave edilmiştir (Xu vd., 2021). %98 (h/h)'lik etil alkol yapı iskelesi üzerine döküldüğünde yapı iskelesi stabil olduğundan kolayca yüzeyden kaldırılmıştır. Etil alkol uçarak kaybolmuş ve yapı iskelesi kurumıştır. Hem etil alkolün uçmasını yavaşlatmak hem de sterilizasyon amacı ile kullanıldığından, etil alkol konsantrasyonu %70 (h/h) oranına seyreltilmiştir. Sonuç olarak yapı iskelesi hem kolaylıkla cam petri yüzeyinden kaldırılmış hem de yapı bozulmadan korunması sağlanmıştır.

2.4.3 Genipin ile Yapılan Biyobasımlar

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada genipin konsantrasyonu arttıkça yapı iskelesinin dayanımı artmaktadır. Bu göz önünde bulundurularak yapılan çalışmada kollajen yapı iskelelerini 1 mM, 3 mM ve 5 mM genipin konsantrasyonlarında çapraz bağlanmasını yapmak amacıyla stok genipin çözeltisi seyreltilmiştir (Zhang vd., 2014). 1 mM genipin ile çapraz bağlamak için stok çözelti, %70 (h/h)'lik etanol eklenerek çözelti %0,44 (a/h) konsantrasyonuna seyreltilmiştir. 3 mM genipin ile çapraz bağlamak için stok çözelti %70 (h/h)'lik etanol eklenerek çözelti %1,2 (a/h) konsantrasyonuna seyreltilmiştir. 5 mM genipin ile çapraz bağlamak için ise stok çözelti seyreltilmemiş %2 (a/h)'lik genipin çözeltisi kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler 4°C'de hava almayacak şekilde saklanmıştır.

Genipin ile çapraz bağlama yapılacak olan toz kollajenler, 3,8 ml asetik asit içerisinde %5 (a/h) konsantrasyonunda hazırlanarak hidrojel oluşturulmuştur. Hidrojellerin içerisine 0,2 ml hacimde seyreltilerek hazırlanan genipin çözeltileri eklenerek toplam hacime göre hidrojel içerisinde 1 mM, 3 mM ve 5 mM genipin olmuştur. Çapraz bağlamada kullanılan genipinin son konsantrasyonları 1 mM için %0,02 (a/h), 3 mM için %0,06 (a/h) ve 5 mM için %0,1 (a/h) olmuştur.

Hidrojeller içerisine genipin eklenerek hazırlanan biyoinkler, steril plastik enjektörde açılı santrifüj ile sıkıştırılmış ve cam enjektöre aktarılmıştır. Cam enjektör biyoyazıcıya eklenerek yapı iskeleleri 17°C’de basılmıştır. Basım sonrası yapı iskeleleri %70 (a/h)’lik etil alkol ile cam petriden alınarak plastik petri kabına koyulmuştur. Plastik petrideki yapı iskelesine 0,5 ml %70 (a/h)’lik etil alkol eklenmiştir. Petriler hava almayacak şekilde parafilm ile kapatılarak gerekli testlerin daha sonra uygulanabilmesi için 4°C’de saklanmıştır. Biyobasım öncesi basımın yapılacağı alana ve basım sonrası üretilen yapı iskelelerine 30 dakika süresince UV-C ışık tutulmuştur.

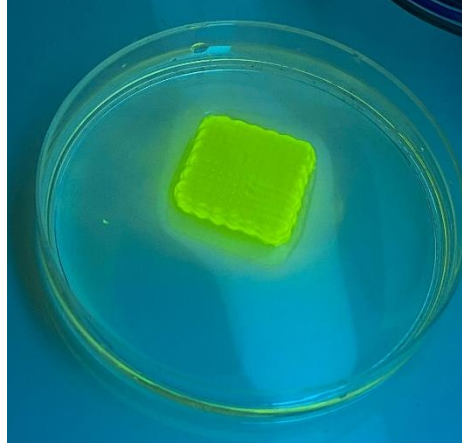
Genipin, biyomalzemelerdeki amino (lisin gibi) gruplarını çapraz bağlayarak renkli pigment oluşumuna neden olmaktadır (Neves vd., 2022; Wang vd., 2020). Genipin ile çapraz bağlanan kollajen yapı iskelelerinde, zamanla renk değişimi olduğu görülmüş ve çapraz bağlamanın gerçekleştiği görsel olarak doğrulanmıştır (Şekil 27b).

1 mM ve 3 mM konsantrasyonlardaki genipin ile karıştırılan kollajen biyomürekkebin basımı santrifüj ile sıkıştırma işleminden dolayı yaklaşık 30 dakika sonra başlamıştır. 30 dakikalık süre boyunca genipin amino gruplarına bağlanmaya başlamıştır ancak konsantrasyon düşük olduğu için biyobasımı etkilememiştir. Ancak 5 mM konsantrasyondaki genipin ile karıştırılan kollajen biyomürekkebin basımında, çapraz bağlanma daha fazla için kollajenin akışkanlığı azalmaya başlamıştır. Akışkanlığın basım esnasında azalması enjektör üzerinde oluşan basıncı arttırmış ve bir saatlik süre sonra basım yapılamaz duruma gelmiştir. 5 mM ve daha yüksek konsantrasyona sahip genipin ile karıştırılarak çapraz bağlanacak olan kollajen biyoinkleri daha kısa sürede basılmalıdır.

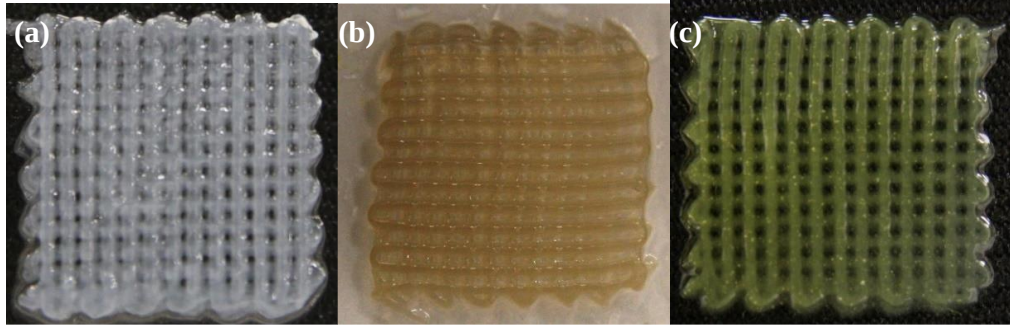
2.4.4 Riboflavin ile Yapılan Biyobasımlar

Riboflavin (riboflavin hidrat 5’-monofosfat sodyum tuzu) çapraz bağlanması için kullanılan konsantrasyon Kang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre belirlenmiştir

(Kang vd., 2021). Riboflavin konsantrasyonu artarken kollajen esnekliğini de arttırmaktadır, ancak %0,05 (a/h) konsantrasyonu üzerine çıktığında esneklik azalmaktadır. Bu sonuçtan dolayı yapılan çalışmada kullanılacak hidrojel içerisindeki riboflavin konsantrasyonu %0,05 (a/h) oranda tercih edilmiştir. Toz kollajenler, 3,8 ml asetik asit içerisinde %5 (a/h) konsantrasyonunda çözündürülerek hidrojel hazırlanmıştır. Hazırlanan hidrojin içerisinde karanlık ortamda %1 (a/h)'lik riboflavin çözeltisi 0,2 ml hacimde eklenmiştir. Riboflavin ışığa duyarlı bir malzeme olduğu için, onunla yapılan tüm çalışmalar karanlık ortamda yapılmıştır (Sheraz vd., 2014). Hidrojel içerisinde riboflavin son konsantrasyonu %0,05 (a/h) konsantrasyonunda 2,5 mM olmuştur. Çapraz bağlayıcının ve hidrojin karıştırılmasıyla hazırlanan biyoink steril plastik enjektöre yüklenerek santrifüj ile çöktürülmüştür. Daha sonra biyoink cam enjektöre eklenerek karanlık ortamda 17°C'de, cam petriye biyobasım yapılmıştır. Basılan yapı iskeleleri %70 (a/h)'lik etil alkol ile petriden alınarak plastik petrilere koyulmuştur ve üzerlerine 0,5 ml %70 (a/h)'lik etil alkol eklenmiştir. Çapraz bağlanma 365 nm dalga boyundaki 15 watt UV-A ışık ile gerçekleştirilmiştir. Riboflavin ile karıştırılmış kollajen biyomürekkebiyle basılan yapı iskeleleri, 365 nm dalga boyuna sahip morötesi A (ultraviyole A, UV-A) ışık altında bekletilmiştir. UVA ışık kaynağı yapı iskelelerine ilk başta 30 cm yükseklikte denenmiştir ve çalışmaya göre 30 dakika boyunca çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için bekletilmiştir. Riboflavinli yapı iskelesi petri kabından kaldırılmaya çalışıldığında, iskeleler hala jel formunda olup yüzeyden alınamamıştır. Çapraz bağlamanın sağlıklı olabilmesi için UVA ışık kaynağının yapı iskelesine olan mesafesi 10 cm'ye düşürülmüştür. Mesafe kısaltıldığı için riboflavinli yapı iskeleleri UVA ışık altında 5, 15, 30, 45 ve 60 dakikalık sürelerle bekletilmiştir. 5 ve 15 dakikalık süre boyunca bekletilen yapı iskeleleri yüzeyden alınamamıştır, 45 ve 60 dakikalık sürelerle bekletilen yapı iskelelerinde kuruma gözlemlenmiş ve cam petri kabı yüzeyine film olarak yapışmışlardır. 30 dakika süreyle bekletilen yapı iskeleleri yüzeyden bir bütün olarak alınabilmişlerdir. Ekstraktı yapılan sığır derisi ve sıçan tendonu kaynaklı kollajen hidrojellerinin riboflavin ile çapraz bağlanması için UVA ışığı malzeme yüzeyinden 10 cm yükseklikte ve 30 dakika süreyle tutulması sonucuna varılmıştır. Çapraz bağlanma gerçekleşikten sonra petri kapları hava almayacak şekilde kapatılıp 4°C'de testlerin uygulanması için saklanmıştır. Biyobasım öncesi basımın yapılacağı alana ve basım sonrası üretilen yapı iskelelerine 30 dakika süresince UV-C ışık tutulmuştur.



Şekil 26. UVA ışık altında bekletilen kollajen yapı iskelesi



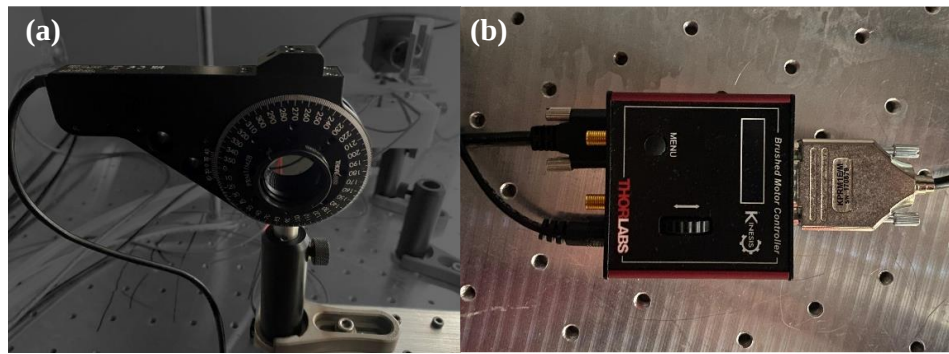
Şekil 27. a) Çapraz bağlama yapılmayan kollajen yapı iskelesi b) genipin ile çapraz bağlanmış yapı iskelesi c) riboflavin ile çapraz bağlanmış yağı iskelesi

2.5 Mueller Polarimetri Kurulumu

Organik malzemelerin fiziksel yapıları ve bu yapıların hangi şartlarda değişim gösterdiğini ölçmek için mueller polarimetri cihazının kurulumu, Pham ve ark. ve Lo ve ark. kullanmış oldukları sistem örnek alınarak yapılmıştır (Lo ve Chen, 2010; Pham ve Lo, 2012b).

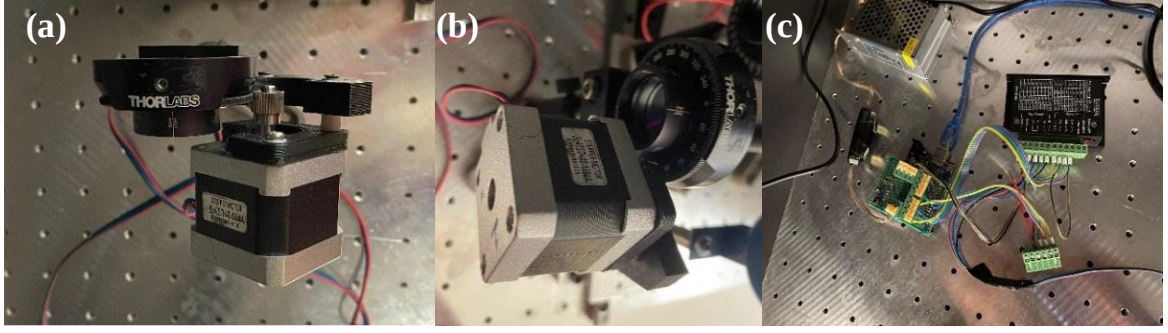
Mueller polarimetri sisteminde ışık kaynağı olarak 633 nanometre dalga boyuna sahip doğrusal polarize lazer (HNL050LB, Thorlabs) kullanılmıştır. Lazerden çıkan ışık kutuplaştırıcı olan polarizörden (LPVISE100-A Thorlabs) geçmektedir. Ancak lazerden çıkan ışık sadece dikey polarize durumda çıkmaktadır. Bu yüzden polarizör lazerden çıkan ışığa 90 derecelik açıyla denk geldiğinde gelen ışık geçmemektedir. Bu durumu önlemek için lazer ışık kaynağı ve polarizör arasına bir çeyrek dalga plakası (WPQ10M-633 Thorlabs) konulmuştur. Çeyrek dalga plakası +45 derecelik açı konumunda tutularak ışığın her açıdan geçmesi sağlanmaktadır.

Ölçümlerde çeyrek dalga plakası +45 derece konumunda tutulurken polarizör, 0, 45, 90 ve 135 derece konumlarına getirilerek, bu açılarda 0°, 45°, 90° ve 135°'ye yönlendirilmiş doğrusal polarize ışık üretilmiş ve numune üzerine bu durumlardaki polarize ışık gönderilmiştir. Polarizörün 0 derece konumu, ışığın tam yataya yönlendirilmiş haline göre belirlenmiştir. Yani polarizör, lazere göre tam 90 derece olacak şekilde ayarlanmıştır. Mueller polarimetri cihazında ölçümler hassas olduğu ve kullanılan optik malzemeler hep aynı konumda olmak zorundadır. Bu göz önünde bulundurularak polarizör, $\pm 0,1^\circ$ hassasiyete sahip bir motorize döndürme sistemine (PRM1/MZ8 Thorlabs) takılmış ve bir motor kontrolörü (KDC101 Thorlabs) aracılığıyla hareketi sağlanmaktadır.



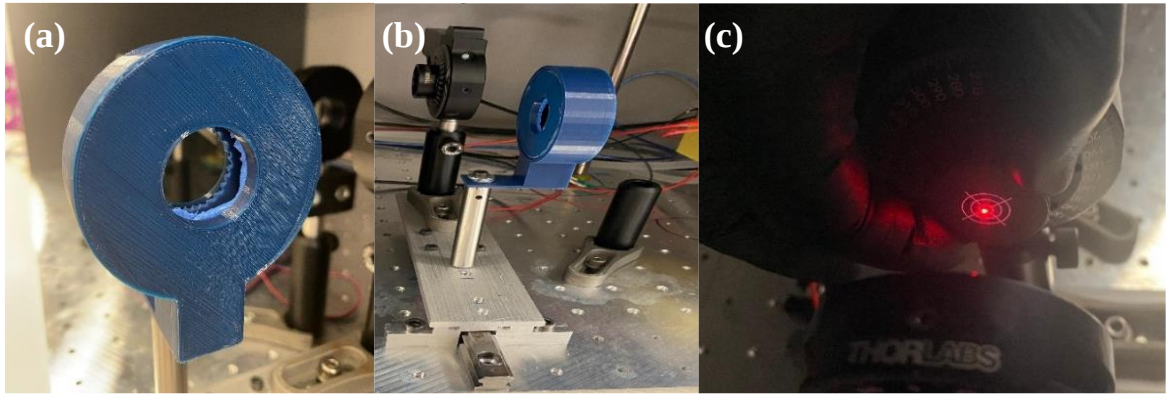
Şekil 28. a) Motorize döndürme sistemine takılı polarizör b) Motor kontrolörü

Dört farklı doğrusal yönlendirilmiş ışık örneğe gönderildikten sonra çeyrek dalga plakası kullanılarak örnek üzerine sağ ve sol yönelimli dairesel polarize ışık gönderilmektedir. Bunun için polarizör sistemden çıkarılmıştır ve sistemde sadece çeyrek dalga plakası kullanılmıştır. Çeyrek dalga plakası ışığı hiçbir şekilde etkilemeden geçirdiği konumu hızlı eksen konumu olarak belirlenmiştir. Bu konum aynı zamanda 0 derecedeki konumuna denk gelmektedir. Sağ yönelimli polarize ışık üretmek için dalga plakası artı ekseninde 45 derece (saat yönünde), sol yönelimli polarize ışık üretmek için ise ters yönde 45 derece (saat yönünün tersine) döndürülerek üretilmiştir. Çeyrek dalga plakasının dönüşlerinin aynı olması için plaka adım motora takılarak yapılmıştır. Motorun kontrolü ise Arduino kart ve adım motor sürücüsü ile sağlanmaktadır.



Şekil 29. a) Adım motora takılı olan çeyrek dalga plakası b ve c) Adım motor kontrol sürücüsü ve arduino kart sistemi

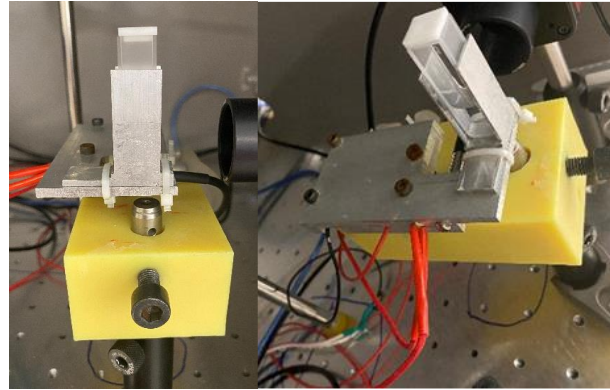
Sistemden polarizörün hem kolay bir şekilde çıkartılıp ve geri koyulması hem de lazer ışığının polarizör üzerinde hep aynı noktaya denk gelmesi için polarizör arabalı kızak üzerine koyulmuştur. Lazer ışığı polarizörde ve çeyrek dalga plakasında hep aynı noktaya gelmesini sağlamak amacıyla konumları hedefleme tahtası ile sağlanmıştır. Sistemde sadece çeyrek dalga plakası kaldığında örnek üzerine giden lazer ışığının şiddeti, polarizör ve çeyrek dalga plakası varken örnek üzerine giden ışığın şiddetinden yüksektir. Bu yüzden örnek üzerine hep aynı ışık şiddetinin gitmesini sağlamak amacıyla nötr yoğunluk filtresi (Grey ND 0,3 Heliopan) koyulmaktadır. Filtre koyulmasıyla artık örnek üzerine polarizör varken veya polarizör çıkarıldıktan sonra hep aynı şiddette ışık gönderilmektedir.



Şekil 30. a) Nötr yoğunluk filtresi b) Polarizör ve yoğunluk filtresinin hareketini sağlayan arabalı kızak c) Lazere göre optik parçaların konumunu ayarlamaya yardımcı olan hedef tahtası

Polarizörden sonra sisteme numunenin sıcaklık durumlarına göre değişiminin ölçümünün sağlanması amacıyla ısıtma ve soğutma özelliğine sahip örnek tutucu koyulmuştur. Bu örnek tutucuyla; örneğin kolaylıkla sisteme koyulup çıkarılması, örnek soğuk tutulması

gerekiyorsa bozulmadan onu sağlaması ve örneğin farklı sıcaklıklarda nasıl cevap verdiğinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 31. Isıtma ve soğutma özelliğine sahip örnek tutucu

Örnek tutucudan sonra sisteme örnekten çıkan ışığı toplayıp S0, S1, S2 ve S3 stokes parametrelerini veren stokes dedektörü (PAX1000VIS Thorlabs) koyulmuştur. Polarimetrenin topladığı ölçümler cihazın programı aracılığıyla görüntülenmekte ve Excel dosyası halinde bilgisayara kaydedilmektedir. Kaydedilen stokes parametreleri MATLAB programı ile hesaplamaları yapılarak örneğe ait optik parametreler hesaplanmaktadır. Sistem kurulduktan sonra dışarıdan herhangi bir ışık etkisinde olmaması için ve sistem içerisindeki havanın sabit kalması için ön kısmı siyah mat kumaş ve geri kalan kısımları ise koyu renkli tahta ile kapatılmıştır. Böylelikle sisteme doğru veya sistem içerisinde oluşabilecek yansıma, parlama ışık etkisi önlenmiştir.



Şekil 32. Mueller polarimetri cihazının tam kurulum hali

Polarimetride, ölçümler 30 hertz hızında (her saniyede 30 veri alınması) ve 1024 verinin hızlı Fourier dönüşümü (FFT) ile toplanmasıyla alınmıştır. Polarimetriden alınan ışığın farklı polarize durumundaki ölçüm sonuçları Excel dosyasına kaydedilmiştir. Bu dosyalardaki her biri 600 veriden oluşan S0, S1, S2 ve S3 parametrelerinin ayrı olarak

ortalaması alınır. MATLAB programı aracılığıyla birinci bölümde verilen hesaplamalar kullanılarak örnek malzemenin optik parametreleri hesaplanır. Optik parametrelerin hesaplanmasından sonra, bu parametreler bir tablo halinde Excel dosyasına çıktı olarak kaydedilmektedir.

2.6 Karakterizasyonlar

2.6.1 Mueller Polarimetri Ölçümleri

Kollajenin yapısal değişikliğini analiz etmek için, toz halindeki kollajen 0,05 M asetik asit içerisinde %0,2 konsantrasyonda buz içerisinde çözündürülmüştür. Hazırlanan kollajen kuvars küvete 1,5 ml hacimde eklenmiştir. Kollajen örneği 17°C'den 50°C'ye, sıcaklık artışı 3°C olacak şekilde ölçülmüştür.

Örnek ölçümlerinde her derece için, ilk önce 0°, 45°, 90° ve 135° yönlendirilmiş polarize ışık sonra da sağ ve sol yönelimli dairesel polarize ışık numune üzerine gönderilmiştir. Örnekten geçen ışık stokes dedektörü ile toplanmıştır. Ölçümler 1024 noktada 30 Hz hızında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ile MATLAB programı aracılığı ile optik parametreler hesaplanmıştır.

Kollajen örneği için yapılan işlemler %0,05 (a/h) konsantrasyonuna sahip müsilaaj örnekleri için de gerçekleştirilmiştir. Müsilaaj örnekleri 0,22 mikrometre (μm) filtreden geçirilen deniz suyu ile çözündürülmüştür.

2.6.2 Raman Spektroskopisi Ölçümleri

Raman spektroskopisi ölçümleri 400 mili watt (mW) gücünde, 785 nm dalga boyuna sahip ışık kaynağı ile alınmıştır. Raman spektroskopisi çalışma prensibi kısaca; lazerden çıkan ışık fiber kablo aracılığıyla toplayıcı prob uca gönderilir. Proptan çıkan ışık dalgaları örnek üzerinde etkileşimde bulunur. Işığın örnek üzerine gönderilmesini sağlayan prob aynı zamanda örnekten elastik olmayan geri saçılan ışıkları tekrar toplar ve spektrometre dedektörüne iletir. Dedektör (QEPro High_performance, Oceanview) gelen verileri işleyerek bilgisayara aktarır ve örneğin Raman ölçümleri gerçekleşmiş olur.

Biyobasımı gerçekleşen kollajen yapı iskeleleri kuvars cam üzerinde Raman probu önüne koyulmuştur. Probun kollajen yapı iskelesine olan uzaklığı 1 cm'dir. Raman spektroskopisinde ölçümler, 50 saniye boyunca 10 ölçümün ortalamasıyla alınmıştır (ortalamada kullanılan her bir ölçüm 5 saniye sürmüştür). Ölçümlerde pikleri temizleme

(clean peaks) filtresi uygulanarak işlenmemiş ölçümden arka plan ölçümleri kaldırılmaktadır. Böylelikle sadece numuneden veriler grafik olarak gösterilmektedir. Alınan verilerden çizilen grafikler keskin kenarlıklılı olduğu için savitzky gollay filtresi uygulanarak yumuşatma yapılmıştır.

Raman spektroskopisinde müsilağ ve kollajen yapı iskeleleri örnek olarak ölçülmüştür.

2.6.3 Sinkrotron Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (sFTIR) Spektroskopisi Ölçümleri

sFTIR absorpsiyon spektroskopik verileri, Ürdün'deki SESAME Sinkrotron radyasyon tesisinin (Orta Doğu'daki Deneysel Bilim ve Uygulamalar için Sinkrotron-ışığı) BM02-Kızılötesi ışın hattından elde edilmiştir. Ana ışın hattı uç istasyonu, sıvı azot soğutmalı MCT (Merkür Kadmiyum Tellürit) tek nokta dedektörü ile donatılmış ve Vertex 70v FTIR spektrometresine (Bruker Optik GmbH, Ettingen, Almanya) bağlanmış FTIR mikroskobu Bruker Hyperion 3000 mikroskobunu içermektedir. Numuneler Prior tarama motorlu tablasına yerleştirilmiştir. OPUS v.8.5. veri toplama ve spektral işleme için SP1 Bruker yazılım paketi kullanılmıştır. Spektrumlar, 64 tarama, sıfır doldurma 2 seviyeleri ve Blackman-Harris 3 dönemli apodizasyon penceresi ile 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte toplanmıştır. Katkısını değerlendirmek için arka plan spektrumları da toplanmıştır (Kamel vd., 2021; Kamel vd., 2017).

2.6.4 Hücre Kültürü Canlılık Testi

Biyobasım sonrası kollajen yapı iskeleleri, hücre canlılık testi öncesi UV-C ışık altında bekletilmiştir. Yapı iskeleleri 1 ml, 1X PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası yapı iskeleleri 6 kuyucuklu plaka içerisine yerleştirilmiştir. Fibroblast hücreleri kuyu başı 4×10^5 hücre olacak şekilde yapı iskelelerine Dulbecco'nun modifiye edilmiş ortamı (DMEM) ile eklenmiştir. Plakalar, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de %5 CO_2 gazı ortamına sahip inkübatöre koyulmuştur. Hücre tutulmaları 24. ve 48. saatlerde ters mikroskop ile takip edilmiştir. 48. saatin sonunda, doku iskeleleri yeni boş 6 kuyucuklu plakaya transfer edilmiştir. Böylelikle plaka yüzeyine yapışan hücrelerin etkisi ortadan kaldırılmıştır. Her kuyucuğa 400 μl taze besi yeri ve 40 μl hücre sayma kiti-8 (CCK-8) çözeltisi eklenmiştir. Plakalar 1-4 saat boyunca inkübe edildikten sonra 450 nm dalga boyunda plaka okuyucu ile absorbans ölçümü alınmıştır. Besi yeri içinde Hücre ekilmemiş boş doku iskeleleri kontrol olarak kullanılmıştır.

3. BULGULAR VE YORUM

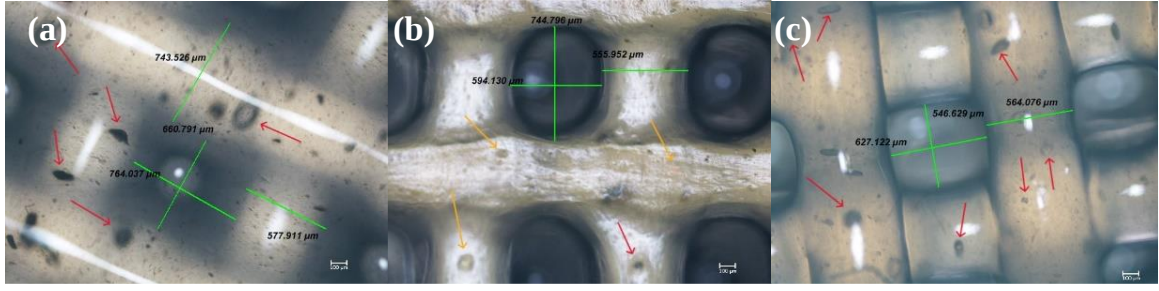
3.1 Karakterizasyon

3.1.1 Optik Mikroskop Altında Yapı iskelelerinin İncelenmesi

Dijital ortamda, üretilecek yapı iskelesinin iç kare uzunlukları 1500 μm ve kenar kalınlığı ise 500 μm olarak tasarlanmıştır. Biyoyazıcı ile üretimi yapılan yapı iskeleleri, iç kare ve çizgi kalınlık boyutları, tasarımı yapılan iskeleyle karşılaştırmak amacıyla optik mikroskop altında incelenmişlerdir. Görüntüler optik mikroskopta 5X mercekle altında 100 μm ölçeklendirmede alınmıştır. Yapı iskelelerinin optik mikroskop görüntülerinde, hidrojel içinde bulunan hava boşlukları siyah noktalar halinde gözükmemektedir. Siyah noktanın koyuluğu, hava boşluğunun ne kadar derinde olmasına bağlı olarak artıp azalmaktadır. Riboflavin ile çapraz bağlanmış yapı iskelesinde ise, yüzeyde olan riboflavin tuz kalıntıları turuncu noktalar halinde gözükmemektedir.

Çapraz bağlama yapılmayan yapı iskelesinde, çizgi kalınlıkları yaklaşık 743 ila 577 μm arasında çıkmıştır. Aynı zamanda iç kare uzunlukları da 660-760 μm boyutlarında çıkmıştır. Arada oluşan bu fark, çapraz bağlama yapılmayan kollajen yapı iskelesinde akma olmasından kaynaklanmaktadır. Riboflavin ile çapraz bağlanmış yapı iskelesinde iç kare yapıların, tasarlanandan dışında oval halde olduğu gözlemlenmiştir. Çapraz bağlama olmayan kollajen yapı iskelesine nazaran daha düşük akma olsa da oluşan bu oval görüntü hidrojel içinde birbirine yapışmasından dolayı olmuştur. Riboflavin ile çapraz bağlanmış yapı iskelesinin iç kare boyutları 600 – 700 μm olmasına rağmen, çizgi kalınlığı yaklaşık 550 μm 'dir. Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesinin, diğerlerine göre daha keskin bir kare yapısına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum biyobasım esnasında çapraz bağlanma reaksiyonunun başlamış olmasına ve basım esnasında daha yoğun olmasına atfedilmektedir. Ancak bu yapı iskelesinde de iç kare boyutları tasarlanandan küçük kalmıştır. Genipin ile çapraz bağlanmış yapı iskelesinin iç kare boyutları 550-600 μm ve çizgi kalınlığı yaklaşık 560 μm olduğu gözlemlenmiştir.

Yapı iskelelerinin iç kare ve çizgi kalınlık boyutlarının tasarlanandan farklı olması sadece hidrojellerden kaynaklanmamaktadır. Aynı zamanda kullanılan iğne ucu ve biyoyazıcının çalışmasında olan hata payından da kaynaklanmaktadır.

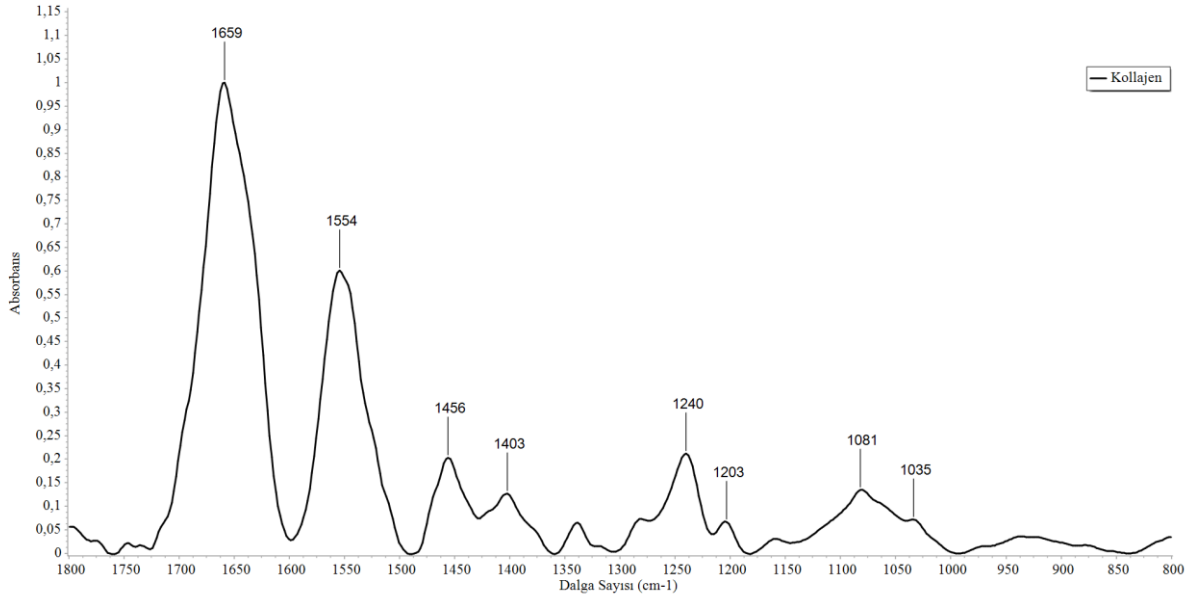


Şekil 33. Yapı iskelelerinin optik mikroskop altında görüntüleri. a) Çapraz bağlama yapılmayan kollajen yapı iskelesi b) Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi c) Riboflavin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi

3.1.2 Sinkrotron Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (sFTIR) Spektroskopisi

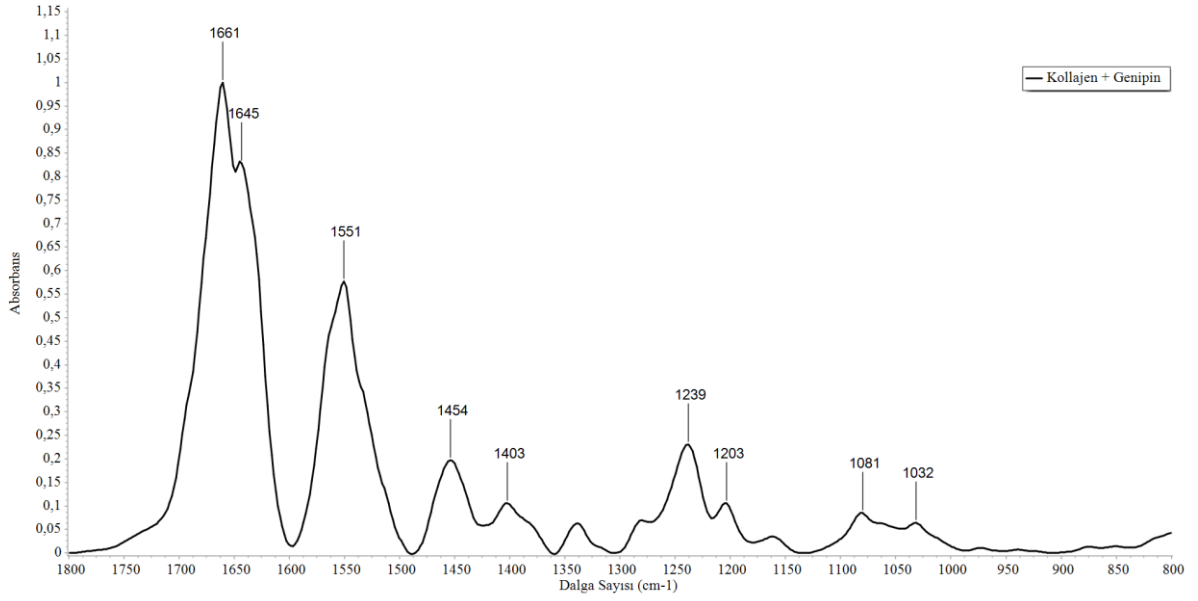
İki farklı kimyasalla çapraz bağlanmış ve çapraz bağlanmamış kollajen yapı iskelelerinin, kimyasal yapısı sFTIR spektroskopisi ile ölçülmüştür. Yapı iskeleleri basımı yapıldıktan sonra laboratuvar sıcaklığında kurutulmuştur ve kuru örnekler üzerinden ölçümler alınmıştır.

Kazancı ve ark. 2021’de yaptığı çalışmada sFTIR spektroskopisi ile kollajenin toz halindeki ölçümlerini almışlardır (Kazancı vd., 2021). Bu çalışmada ticari toz kollajenin, amid I (C=O), amid II (C-N), CH₂ bağı ve amid III (N-H) bölgesi ana bant noktaları sırasıyla 1656 cm⁻¹, 1552 cm⁻¹, 1455 cm⁻¹ ve 1239 cm⁻¹ noktalarında olduğu belirtilmiştir. Ekstrakte edilen kollajen kaynaklı yapı iskelesi sFTIR ölçümlerinde, kollajenin parmak izi olarak belirlenen amid II, amid III ve CH₂ bant noktalarında farklılık görülmemiştir. Ekstraktı yapılan kollajenin amid I bölgesindeki pik değeri ise ticari kollajene yakın olarak görülmüştür. Kollajene ait karakteristik piklerin hepsinin görülmesiyle ekstraktı yapılan ve yapı iskelesi olarak biyobasımı yapılan kollajenin yapısının bozulmadığı doğrulanmıştır. 1082 cm⁻¹ ve 1034 cm⁻¹ bant noktalarındaki pikler karbonhidrat bölgesinin C-OH gerilme titreşimlerinden gelmektedir (Petibois vd., 2006).



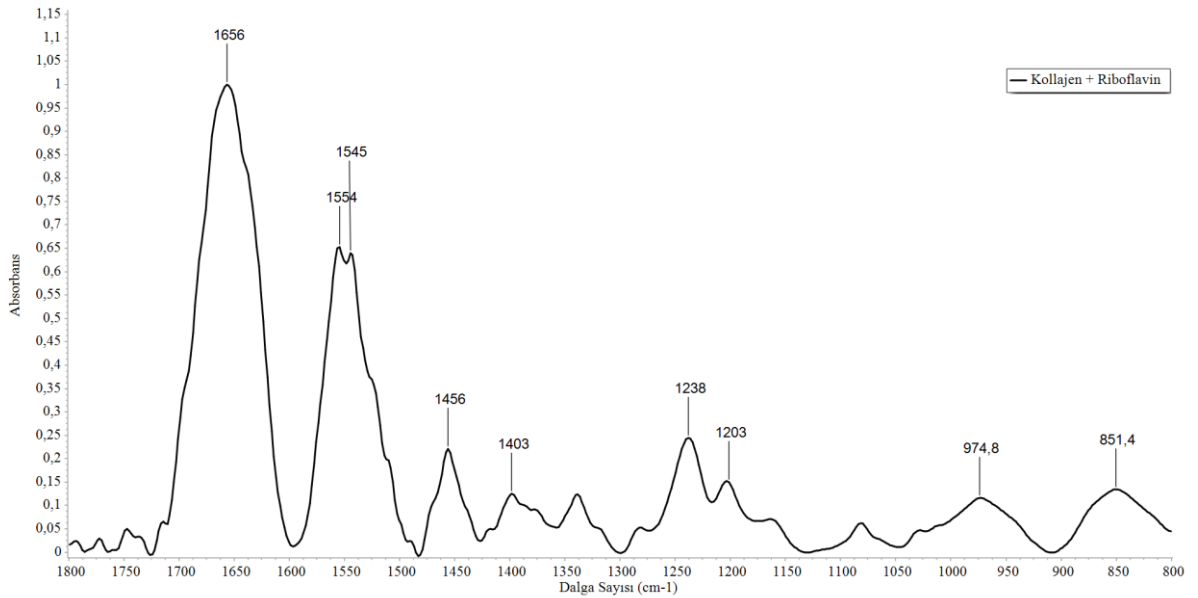
Şekil 34. Kollajen yapı iskelesinin sFTIR ölçümü

Genipinin karakteristik FTIR pikleri C=O gerilme titreşimleriyle 1680 cm^{-1} bant noktasında ve C=C titreşimleriyle 1622 cm^{-1} bant noktasında görülmektedir (Kahoush vd., 2021). Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi ölçümlerinde, amid III ve CH₂ bölgesi bant noktalarındaki piklerde değişiklik bulunmamaktadır. 1081 cm^{-1} ve 1032 cm^{-1} noktalarındaki piklerin absorbans değerlerinde azalma olmuştur. Genipin, kollajenin amin grubuyla bağlanma yapması o bölgeden gelen sinyallerin azalmasına neden olmuştur. Kollajenin amid I bölgesinde bulunan omuz, genipin ile çapraz bağlanmış kollajende ayrı pik olarak belirmiştir. 1645 cm^{-1} bant noktasındaki bu durum genipinin amin gruplarını çapraz bağlaması sonucu oluşmuştur. 1551 cm^{-1} bant noktasında, çapraz bağlanmamış kollajen ile kıyaslandığında omuz ortaya çıktığı görülmektedir. Bu çıkıntıdan dolayı kollajen fibrillerinin, genipin ile çapraz bağlanması sonucu üçüncül bir amin olduğu düşünülmektedir (Sundararaghavan vd., 2008; Zhang vd., 2016).



Şekil 35. Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesinin sFTIR ölçümü

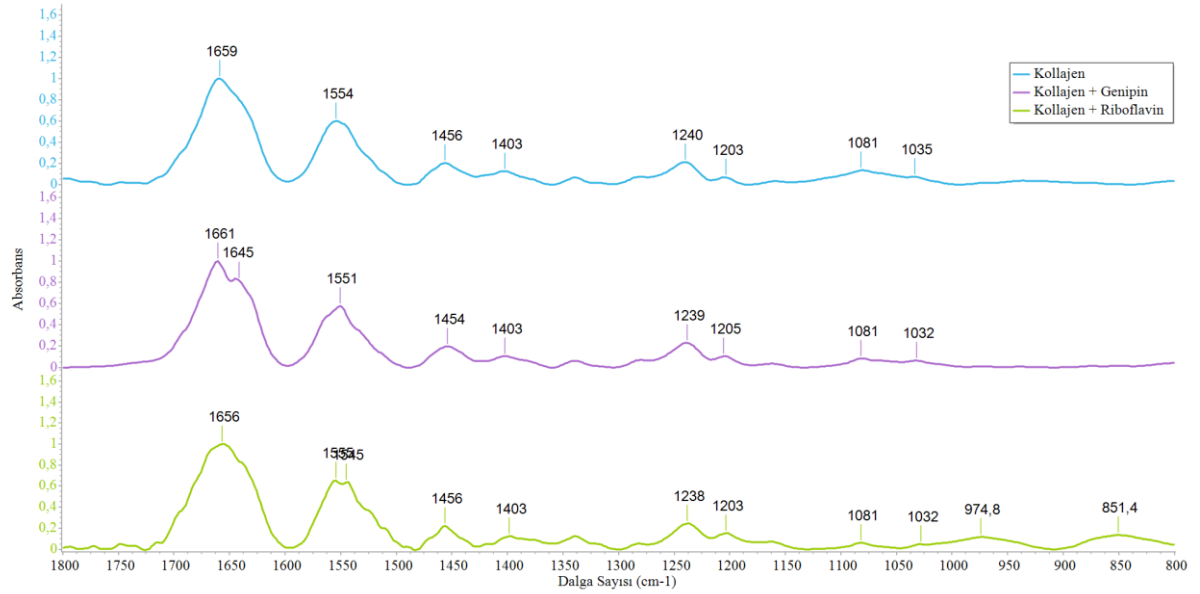
Riboflavin karakteristik ana bant pikleri 1576 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} ve 1728 cm^{-1} noktalarında bulunmaktadır. 1728 cm^{-1} bant noktasındaki pik C=O gerilim titreşimi, 1576 cm^{-1} ve 1652 cm^{-1} bant noktalarındaki pikler aromatik C=C titreşimleri ve 1240 cm^{-1} bant noktasındaki pik C-N titreşimlerinden gelmektedir (Alqerban, 2021).



Şekil 36. Riboflavin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesinin sFTIR ölçümü

Riboflavin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskeleleri FTIR spektroskopisiyle incelendiğinde, amid II bölgesinde en belirgin değişiklik gözlemlenmiştir. 1545 cm^{-1} bant noktasındaki bu değişiklik NH bükülme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu etki riboflavinin amin gruplarını kovalent bağlamasından dolayı olmaktadır (Melcher vd.,

2018). NH_2 bükülme titreşimlerinden kaynaklı olarak amid I bölgesinde 1656 cm^{-1} bant noktasında kayma meydana gelmiştir. 1203 cm^{-1} bant noktasında $\text{C}=\text{N}$ gerilmesinden kaynaklı çapraz bağlama sonrası artış olmuştur (Kang vd., 2021). Kollajenin karakteristik piki olan CH_2 bant noktasında riboflavinle çapraz bağlamanın bir etkisi olmamıştır. 974 cm^{-1} (P-OH titreşimleri) ve 851 cm^{-1} (HPO_4 titreşimleri) bant noktalarından gelen pik değerleri riboflavin içerisinde bulunan fosfat bağlarından gelmektedir (Elzinga ve Sparks, 2007; Parikh ve Chorover, 2006).

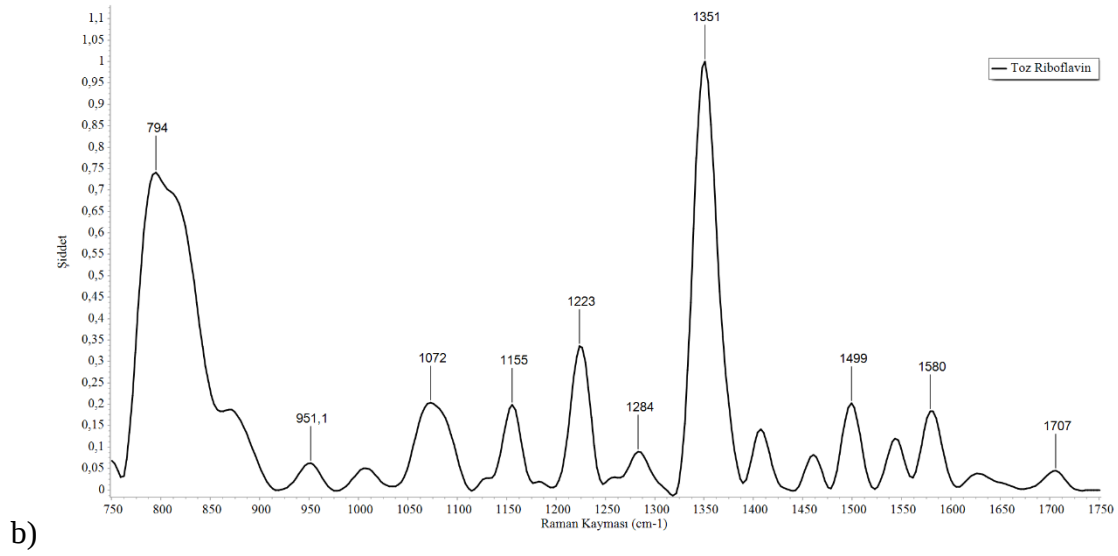
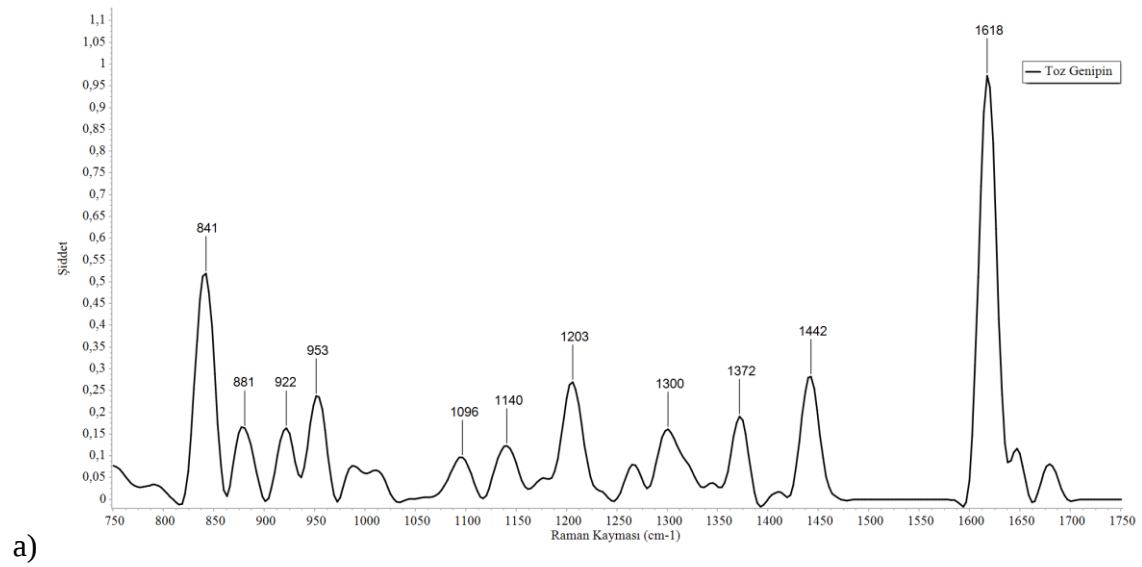


Şekil 37. Çapraz bağlanmamış kollajen ve riboflavin ve genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelelerinin sFTIR spektroskopi ölçümleri

3.1.3 Raman Spektroskopisi

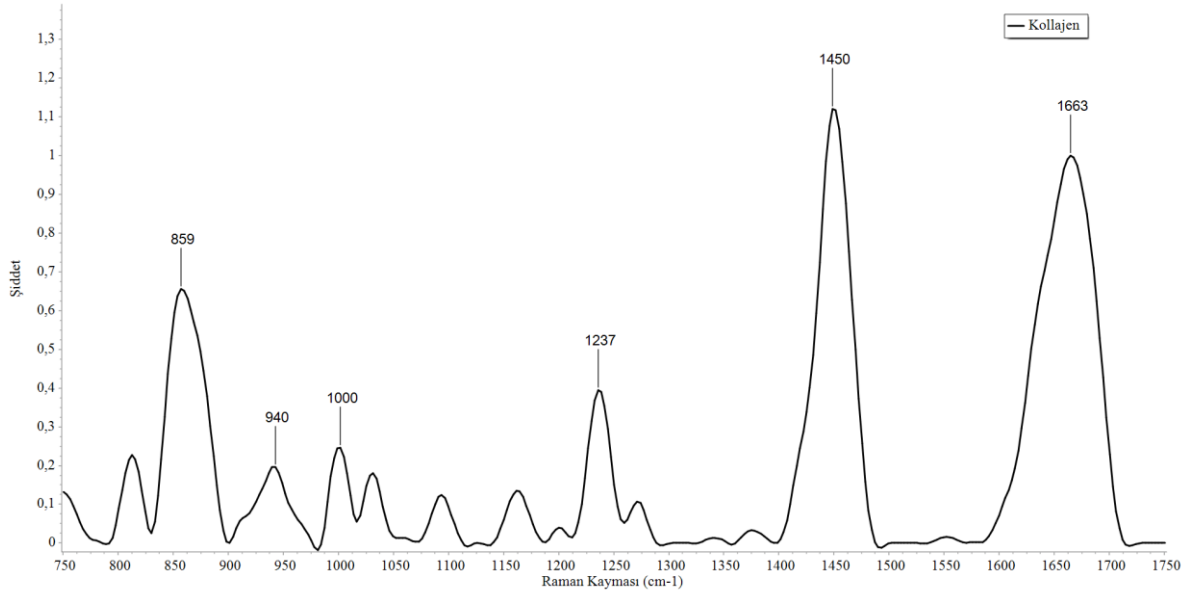
3.1.3.1 Kollajenin Raman Ölçümleri

Çapraz bağlayıcıların yapıya olan etkisini görmek için genipin ve riboflavinin toz hali Raman spektroskopisinde ölçülmüştür.



Şekil 38. a) Toz genipinin Raman spektrum ölçümü b) Toz riboflavinin Raman spektrum ölçümü

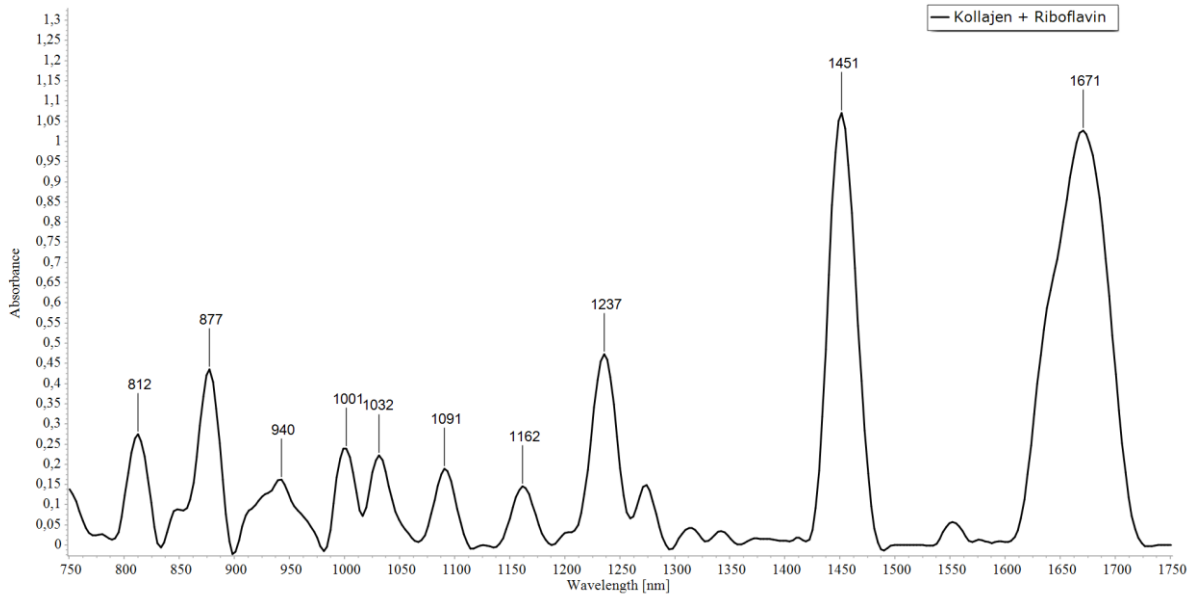
Kollajen yapı iskelesinin Raman spektrumu ölçümlerinde, kollajenin yapısının belirlenmesinde karakteristik olan amid I (C=O) ve amid III (N-H) bantları 1665 cm^{-1} ve 1237 cm^{-1} bant noktalarında görülmektedir. 1450 cm^{-1} bant noktasında güçlü sinyal olarak görülen pik CH_2 bağından gelmektedir. 1032 cm^{-1} ve 1001 cm^{-1} bant noktalarında görülen pikler fenilalaninden gelen piklerdir. 859 cm^{-1} ve 930 cm^{-1} bant noktalarında kollajenin yapısında bulunan prolinin CC halka ve C-C iskelet yapısından gelen titreşimler görülmektedir (Cárcamo vd., 2012).



Şekil 39. Kollajen yapı iskelesinin Raman spektrum ölçümü

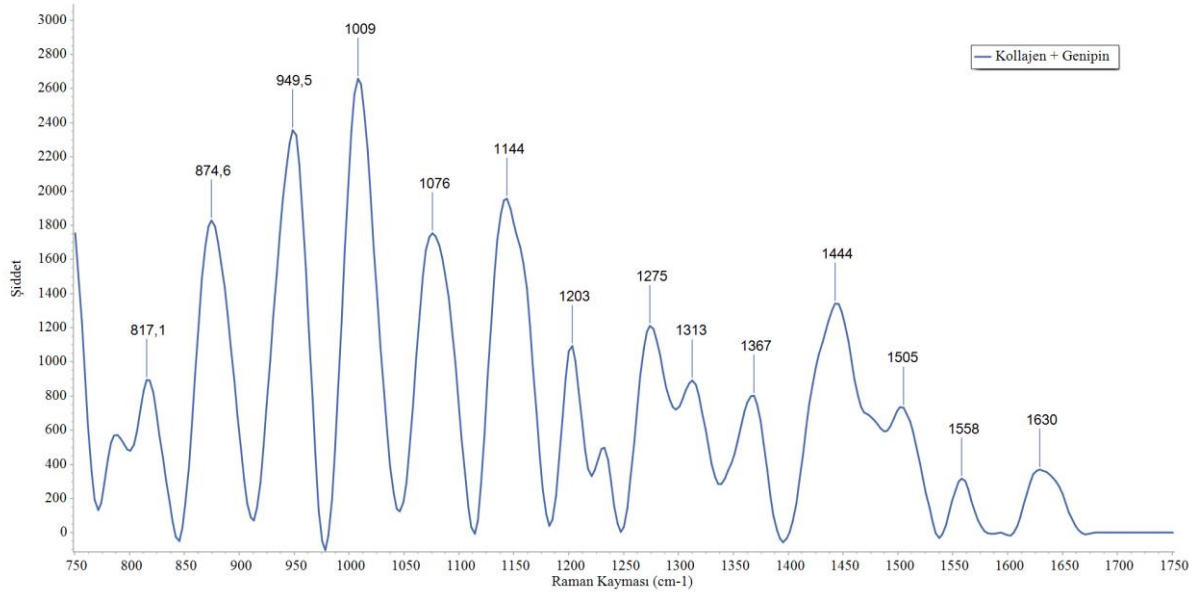
Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan riboflavin, Raman spektroskopisinde incelendiğinde, Şekil 38b’de görüldüğü gibi, en belirgin bant 1351 cm^{-1} noktasında olmak üzere, 1580 cm^{-1} , 1499 cm^{-1} , 1223 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} ve 1072 cm^{-1} titreşim bantlarında belirgin pikler görülmüştür. 794 cm^{-1} noktasında o bölgede bulunan birden fazla pikin birleşimi halinde bir pik olduğu görülmüştür. 1351 cm^{-1} noktasındaki en yoğun pik, riboflavinin karakteristik pirazin halkasından gelen C-C ve C-N gerilme titreşiminden gelmektedir. 1499 cm^{-1} ve 1580 cm^{-1} bant noktalarındaki pikler C-C gerilim titreşimlerinden kaynaklı görülmektedir. 1223 cm^{-1} ve 1155 cm^{-1} bant noktalarındaki pikler yapının diğer halkasından C-N ve CH_3 gerilme titreşimlerinden gelmektedir (Liu vd., 2012).

Riboflavin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi Raman spektroskopisi altında incelendiğinde, en büyük değişim 859 cm^{-1} bant noktasında görülmüştür. Riboflavin amino gruplarını çapraz bağladığı için yapıya katıldığında prolinden gelen CC halka titreşimlerde azalma olmuş ve aynı zamanda kayma meydana gelmiştir. Amid III, 1237 cm^{-1} noktasındaki artış, riboflavin amin gruplarını kovalent bağlaması sonucunda N-H grubundan gelen titreşimleri güçlendirmesinden kaynaklıdır. Riboflavin amid III bölgesindeki arttırımı ancak NH_2 gerilme titreşimlerinden kaynaklı olarak amid I bölgesindeki pikin kaymasına neden olmuştur (Uemura vd., 2019). Yapılan Raman spektrum analizlerinde, riboflavinin başarılı bir şekilde kollajeni çapraz bağladığı görülmektedir.



Şekil 40. Riboflavin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi Raman spektrum ölçümü

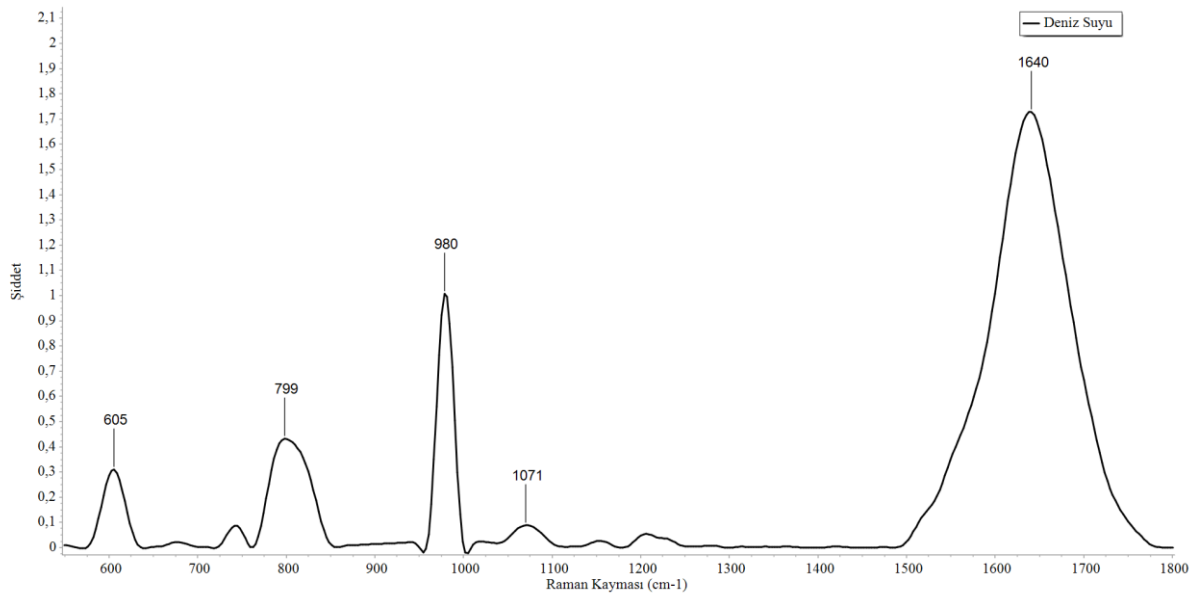
Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelelerinin Raman sonuçları, genipin Raman bantları ve kollajen Raman bantlarının bir karışımını göstermektedir. Aynı bölgede Raman aktif bantlara sahip olan iki farklı molekül Raman spektrumları genel olarak birbiriyle çapraz bağlama yaptıklarını gösterir nitelikte olup, her bir molekül ayrı ayrı incelendiğinde elde edilen bantların belirli miktarda kayma gösterdiği görülmektedir. Hem polisakkarit moleküllerden hem de protein moleküllerinden gelen Raman bantlarını aynı spektrumda görmek mümkündür. 1050 cm^{-1} öncesi C-C kemik bağı titreşim modüllerine $1050\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ arası polisakkarit titreşim modüllerine, $1400\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ arası genel olarak kollajen molekülünden gelen titreşim modüllerini gösterdiğini söyleyebiliriz. Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelelerinin Raman spektrumları şekil 41’de verilmiştir.



Şekil 41. Genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi Raman spektrum ölçümü

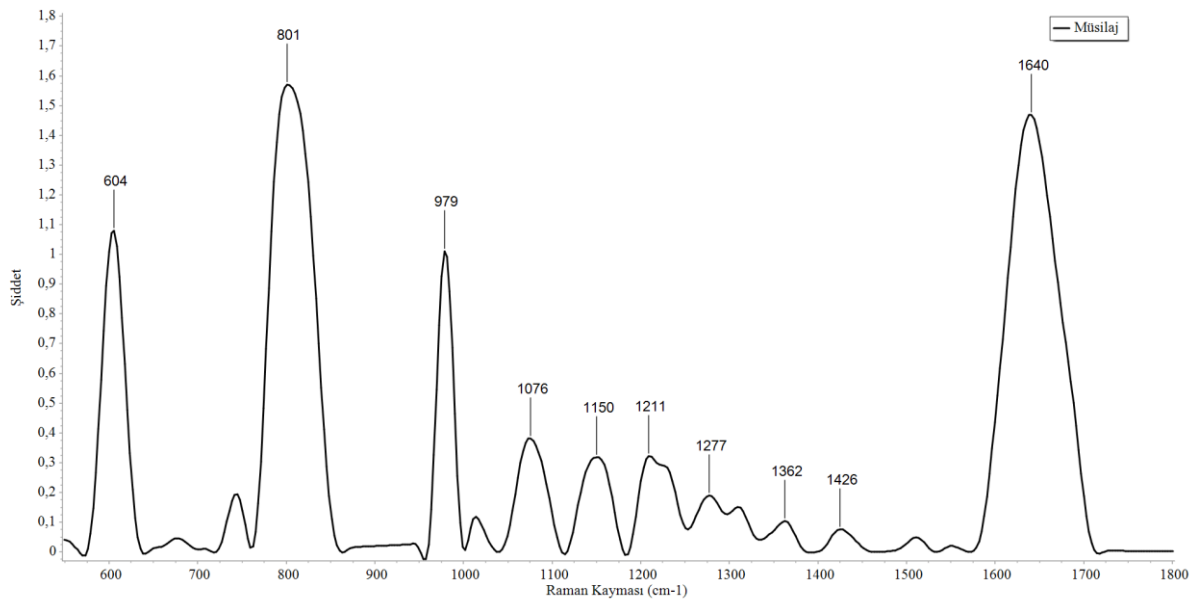
3.1.3.2 Müsilajın Raman Ölçümleri

Müsilajın Raman ölçüm analizi 550-1800 cm^{-1} Raman kayması (Raman shift) aralığında incelenmiştir. %0,05 (a/h) konsantrasyonunda deniz suyu içerisindeki müsilaj örnekleri kuvars küvet içerisinde 3 ml hacimde küvete koyulmuştur. Müsilaj Raman ölçüm konsantrasyonu mueller polarimetri ölçümlerinde kullanılan konsantrasyonla aynı olacak şekilde seçilmiştir. Müsilaj yapısının herhangi bir değişikliğe uğramadığından emin olmak için 17 °C’de Raman ölçümleri alınmıştır. Müsilaj ölçümlerinden önce 0,22 μm filtreden geçirilmiş deniz suyu 17 °C’de ölçülmüştür.



Şekil 42. Deniz suyu Raman spektrum ölçümü

Deniz suyunun Raman ölçümlerine göre $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ görülen bant OH eğilme titreşim hareketinden gelen ölçümdür. $\sim 979 \text{ cm}^{-1}$ bandından gelen değer deniz suyunda bulunan sülfat bandından gelmektedir (Pasteris vd., 2004). $\sim 604 \text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 799 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen bant pikleri ise kuvars küvetten gelen titreşimlerdir.



Şekil 43. Müsilajın Raman spektrum ölçümü

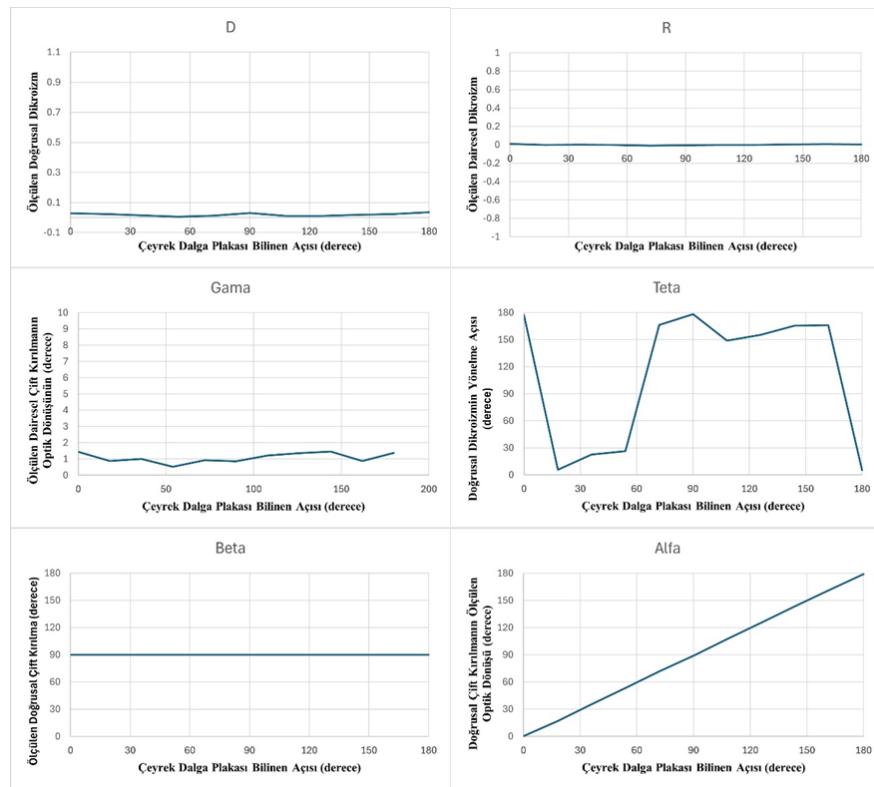
Müsilaj çözeltisinin Raman ölçümlerinde $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 979 \text{ cm}^{-1}$ bantlarındaki ölçümler deniz suyundan $\sim 604 \text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 801 \text{ cm}^{-1}$ bantlarındaki ölçümler ise kuvars küvetten gelmektedir. $\sim 1080/1050 \text{ cm}^{-1}$ bant aralığında monosakkarit olan galaktoza ait bant spektrumu görülmektedir (Reis vd., 2020). Monosakkaritlerden olan glukozun Raman ölçümünde ana bant noktası $\sim 1125 \text{ cm}^{-1}$ 'de bulunmaktadır. Ekstrakte edilen müsilajda ise glukozu ait bu spektrumda $\sim 1150 \text{ cm}^{-1}$ bant noktasına kaydığı görülmüştür (Shao vd., 2012). $\sim 1277 \text{ cm}^{-1}$ bant noktası ise fruktoz monosakkarite ait titreşimden gelmektedir (Camerlingo vd., 2017). 1013 cm^{-1} , 1211 cm^{-1} , 1310 cm^{-1} ve 1364 cm^{-1} bantları polisakkarit içeriğinde bulunan farklı gruplara aittir. Raman spektroskopisi sonuçlarına göre müsilaj ekstraksiyonu ile polisakkaritlerin elde edildiği görülmektedir. Raman ölçümlerinde müsilaj çözeltisinin konsantrasyonu düşük olduğu için bant şiddetleri düşük çıkmıştır.

3.1.4 Mueller Polarimetri Ölçüm Sonuçları

3.1.4.1 Mueller Polarimetrimin Çalışma İspatı

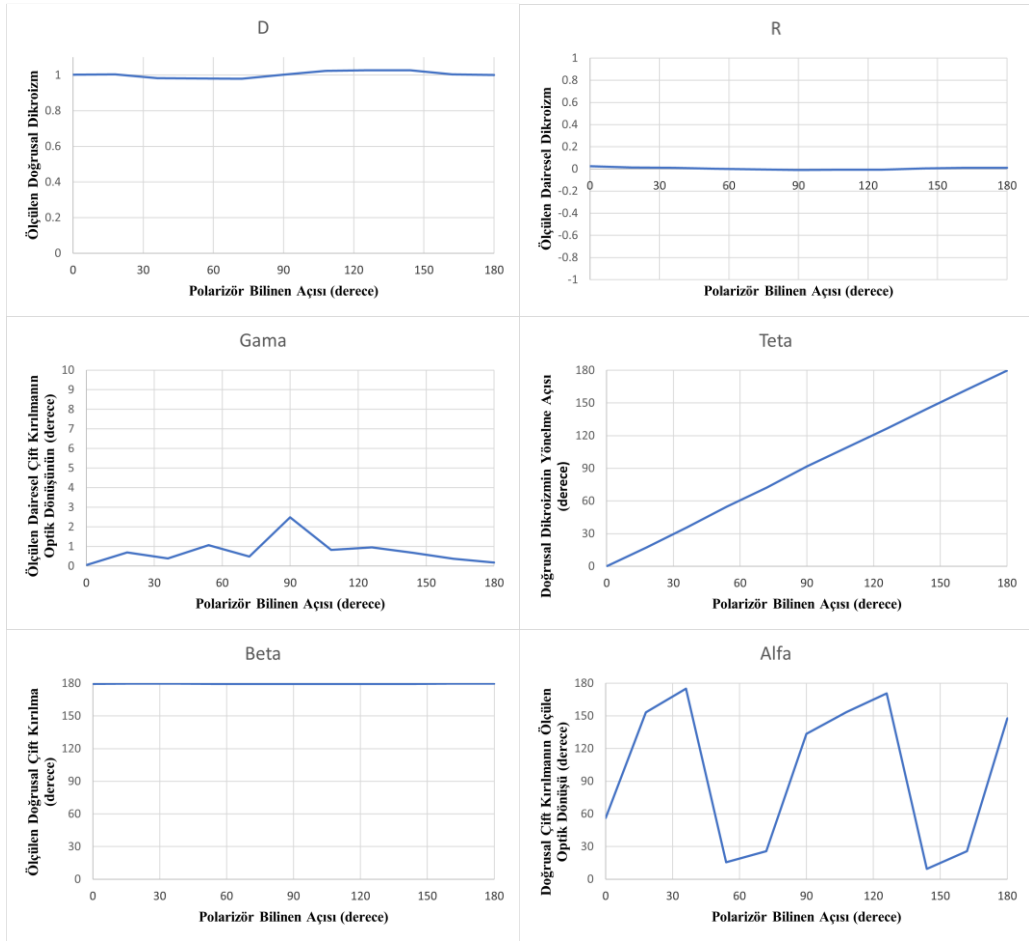
Mueller polarimetri cihazı tasarımı ve kurulumu bittikten sonra, çeyrek dalga plakası, polarizör ve d-glukoz örnekleri kontrol amacıyla ölçülmüştür. Çeyrek dalga plakası ve polarizörün ölçümleri 0 dereceden 180 dereceye kadar 18'er derece arttırılarak alınmıştır. D-glukoz ölçümleri ise 0 molardan (saf su) 1 molar kadar 0,2 molar arttırılarak alınmıştır. Çeyrek dalga plakası doğrusal çift kırılmaya, polarizör doğrusal dikroizme ve d-glukoz ise dairesel çift kırılmaya örnek olarak kullanılmıştır.

Çeyrek dalga plakası örnek olarak ölçüldüğünde; sonuçlarda beklenildiği gibi doğrusal dikroizm(D), dairesel çift kırılmanın optik değeri (gama) ve dairesel dikroizm (R) sonuçları sıfıra yakındır. Doğrusal dikroizmin yönelme açısı (teta), doğrusal dikroizm değeri sıfıra yakın olduğu için rastgele değişim göstermektedir. Doğrusal çift kırılmanın dönüş açısı (alfa) çeyrek dalga plakasının değişim açısıyla doğru orantıda değişmektedir. Doğrusal çift kırılma (beta) değerleri plakanın ışığı kırma açısıyla aynı ve 90 derecede sabit durmaktadır (Pham ve Lo, 2012a).



Şekil 44. Çeyrek dalga plakasının optik parametre değerleri

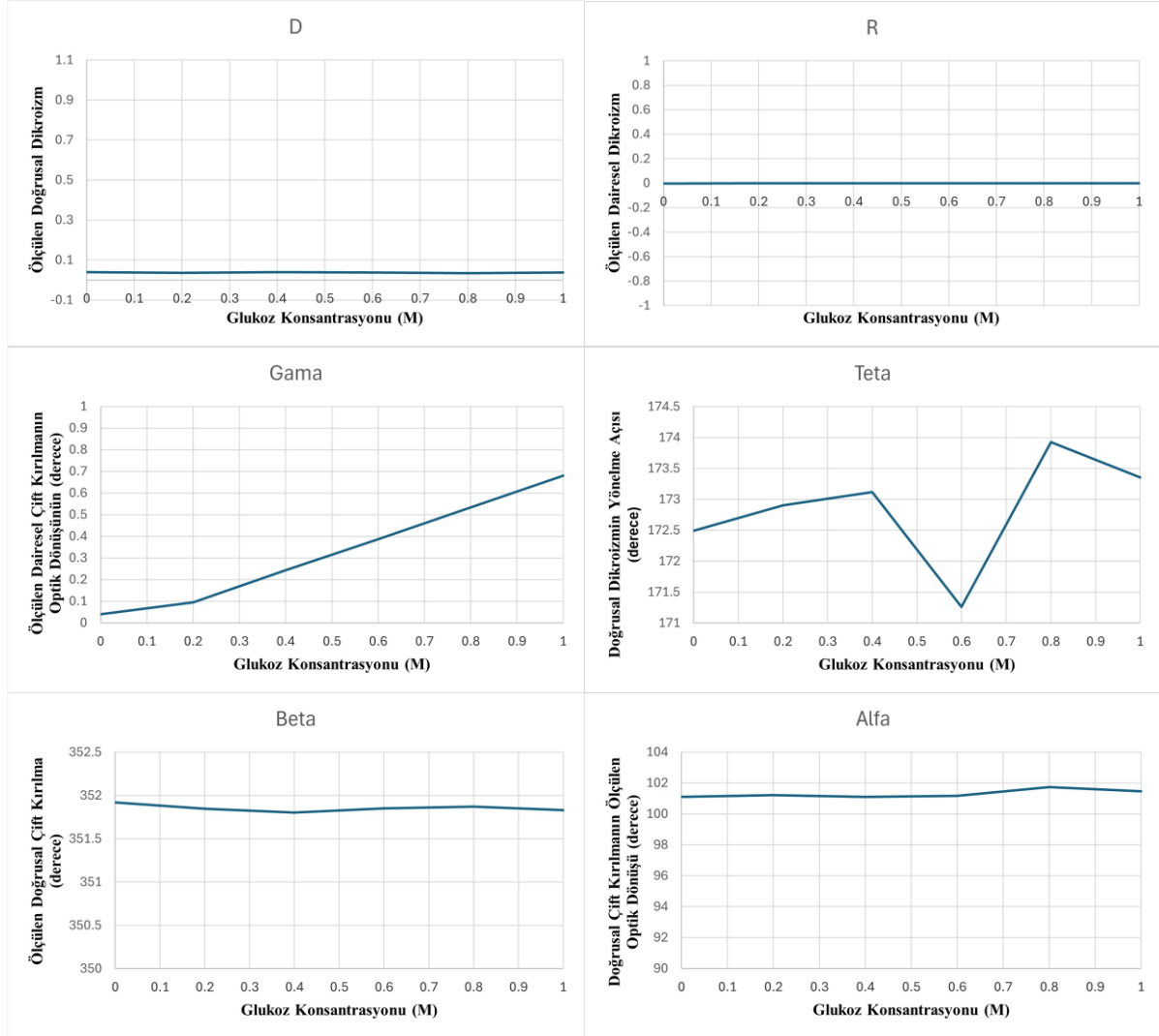
Polarizör ile kurulan sistemde doğrusal dikroizm değerlerinin doğruluğu ölçülmüştür. Polarizörde çift kırılma olmadığı için dairesel çift kırılma (gama) değerleri sıfıra yakın ve doğrusal çift kırılma (beta) değerleri ise 180 dereceye yakın bir değer çıkmıştır. Polarizör ve dalga plakaları her 180 derece bir kendilerini tekrar ederler ve 180 derecedeki sonuçla 0 derece sonuç aynıdır. Bu göz önünde bulundurularak beta değerleri 0 kabul edilebilir. Doğrusal çift kırılmanın optik açı (alfa) değerleri çift kırılma özelliği olmadığı için rastgele değişim göstermiştir. Bir örneğin doğrusal dikroizm değeri varsa $D = 1$ sonucunu vermektedir (Chen vd., 2009), polarizör ölçümlerinde de D (doğrusal dikroizm) değeri 1'e yakın bir sonuç olarak ölçülmüştür. Doğrusal dikroizm optik dönüş açısının (teta) polarizör açısıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Bu ölçümlerle sistemin dikroizm gösteren örneklerin doğru ölçülebildiğini göstermektedir.



Şekil 45. Polarizörün optik parametre değerleri

D-glukoz kiral bir molekül olduğu için doğrusal dikroizm (D ve teta) değerlerinde küçük değişimler olmuştur, dairesel dikroizm değeri (R) ise sıfıra yakın çıkmıştır (Pham vd.,

2023). Glukozda doğrusal çift kırılma (alfa ve beta) değerleri ölçülse de konsantrasyona bağlı olarak bir değişim göstermemektedir. Dairesel çift kırılma değerleri de konsantrasyona bağlı olarak orantılı artış göstermiştir. D-glukoz ile yapılan optik parametre ölçümleri kurulan sistemde dairesel çift kırılmanın ölçülebildiği doğrulanmıştır.



Şekil 46. D-glukoz optik parametre değerleri

Yapılan kontrol ölçümleriyle kurulmuş olan mueller polarimetri karakterizasyon cihazı doğruluğu saptanmıştır.

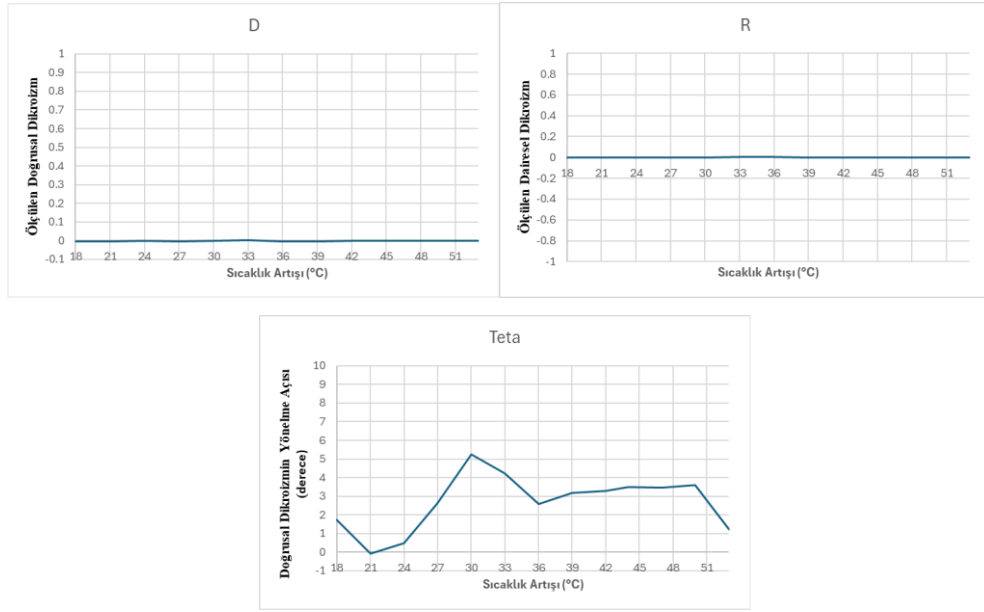
3.1.4.2 Kollajenin Mueller Polarimetri ile Ölçümleri

Kollajenin sıcaklığa bağlı yapısal değişimlerinin ölçülmesi için örnek çözelti küvette ışığın geçtiği seviyenin üzerinde kalacak şekilde sıvı olarak eklenmiştir. Eklenen kollajen çözeltinin konsantrasyonu arttıkça çözeltiden geçen ışığın şiddetinde azalma ve saçılma meydana geldiği için düşük konsantrasyonda seçilmiştir. Isıtma soğutma sisteminde 17 °C'den düşük sıcaklık değerlerinde kuvvet üzerinde buğu oluştuğu ve lazer ışığını etkilediği için başlangıç sıcaklık değeri 17 °C olarak belirlenmiştir. Sıcaklık artış hassasiyeti 3 °C'nin altında olduğunda sıcaklık değerlerinin artışında sapmalar ve doğru orantılı artmadığı için 3 °C artış seçilmiştir.

Kollajen ölçümlerinde kollajen değerlerinin ölçüldüğünden emin olunması için 17 °C'de duran asetik asit optik parametreleri kör ölçüm olarak alınmıştır. Kör ölçümün sonuç değerleri kollajen çözeltisinin ölçüm değerlerinden çıkartılarak kollajenin sıcaklığa bağlı olarak optik parametreleri elde edilmiştir.

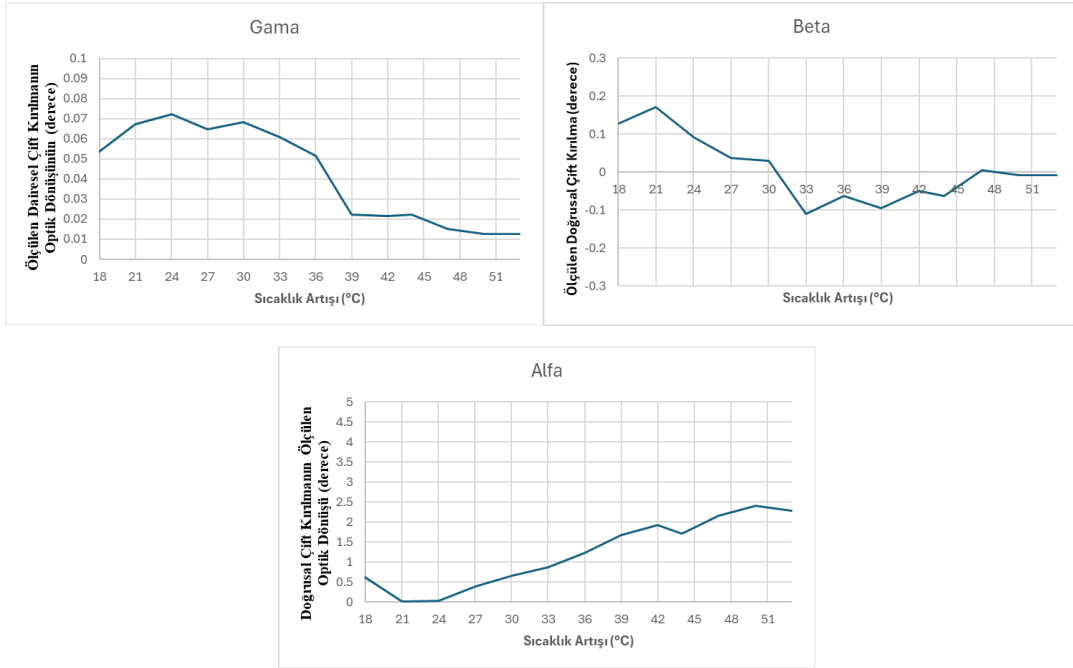
Kollajenin sıcaklığa bağlı değişim ölçümlerinde dikroizm değerleri sonuçları sıfıra yakın çıkmıştır ve kollajenin ışığa olan etkisinde dikroizme neden olmadığı görülmüştür (Şekil 47a). Kollajenin fibril yapısı nedeniyle çift kırılma özelliği vardır (Sharma vd., 2008). Kollajenin mueller ölçümlerinde çift kırılmayı gösteren optik parametre değerleri artan sıcaklık değerleriyle değişiklik göstermektedir.

Dairesel çift kırılma (gama) değerlerine bakıldığında kollajen çözeltisi 30 °C'ye kadar neredeyse sabit değerlerde kalmıştır. 30 °C'ye ulaştığında kollajenin yapısındaki değişiklik başladığı ve üçlü sarmal yapıda açılmalar meydana geldiği için dairesel çift kırılma açısında azalma görülmektedir. 36 °C ve 39 °C sıcaklık arasında kollajenin yapısı tamamen bozulmasıyla dairesel çift kırılma değerinde birden azalma görülmüştür. Sarmal yapının açılmasıyla doğrusal çift kırılma değerlerinde de (beta) azalma meydana gelmiş 30 °C sıcaklık değerinden sonra 42 °C sıcaklık aralığında sabit dururken 45 °C'den sonra 0 değerine yaklaşmıştır. Sıcaklık artışıyla üçlü yapı açılmış aynı zamanda da sıcaklığın verdiği enerjiyle yapıda hareketlenme olmuştur. Bu hareketlenmeyle doğrusal çift kırılmanın yönelimi alfa değeriyle ölçülmüştür. Optik parametre ölçümlerine göre kollajenin yapısı yaklaşık 39 °C'de tamamen açılmış ve yapı bozulmuştur. Bürck ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dairesel dikroizm ölçümleri de kollajenin yapısının 30 °C'de jelleşmeye ve yapının açılmaya başlamaktadır (Bürck vd., 2013).



a)

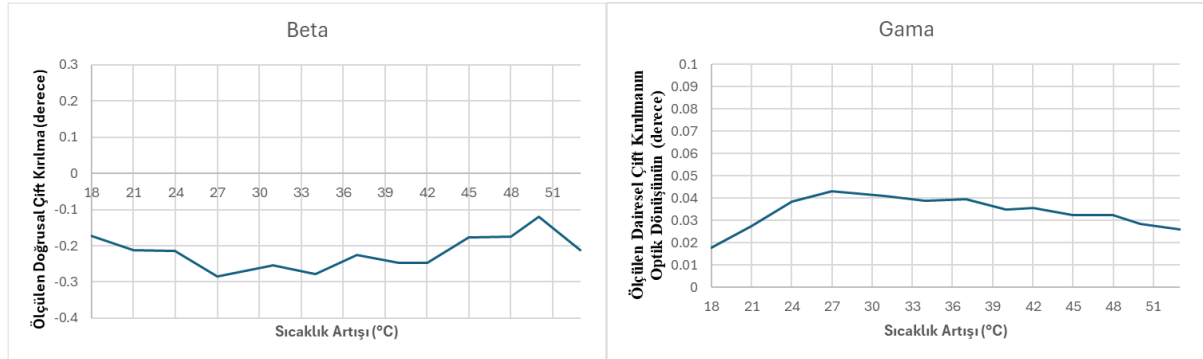
b)



Şekil 47. a) Kollajen yapısının sıcaklığa bağlı dikroizm optik parametre sonuçları b) Kollajen yapısının sıcaklığa bağlı çift kırılma optik parametre sonuçları

Hazırlanan kollajen çözeltisinin yapısı ısıtılarak tamamen bozulmuştur. Aynı solüsyon oda sıcaklığına soğutulduktan sonra tekrar ısıtılarak kontrol ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümlerde beta ve gama değerleri karşılaştırılmıştır. Yapılan bu karşılaştırmada kollajenin yapısı bozulmadan önceki ölçümlerdeki gama değerlerindeki yükseklik, aynı solüsyonun soğutulup tekrar ısıtılmasında gözlemlenmemiştir. Bu farklılık, ısıtılma

kaynaklı olup kollajenin üçlü sarmal yapısının bozulduğunu ve tekrar eski haline gelmediğini kanıtlamıştır. Kollajenin sarmal yapısı açıldıktan sonra çift kırılma özelliklerinde sıcaklıkla ilgili bir değişiklik ölçülmemiştir.



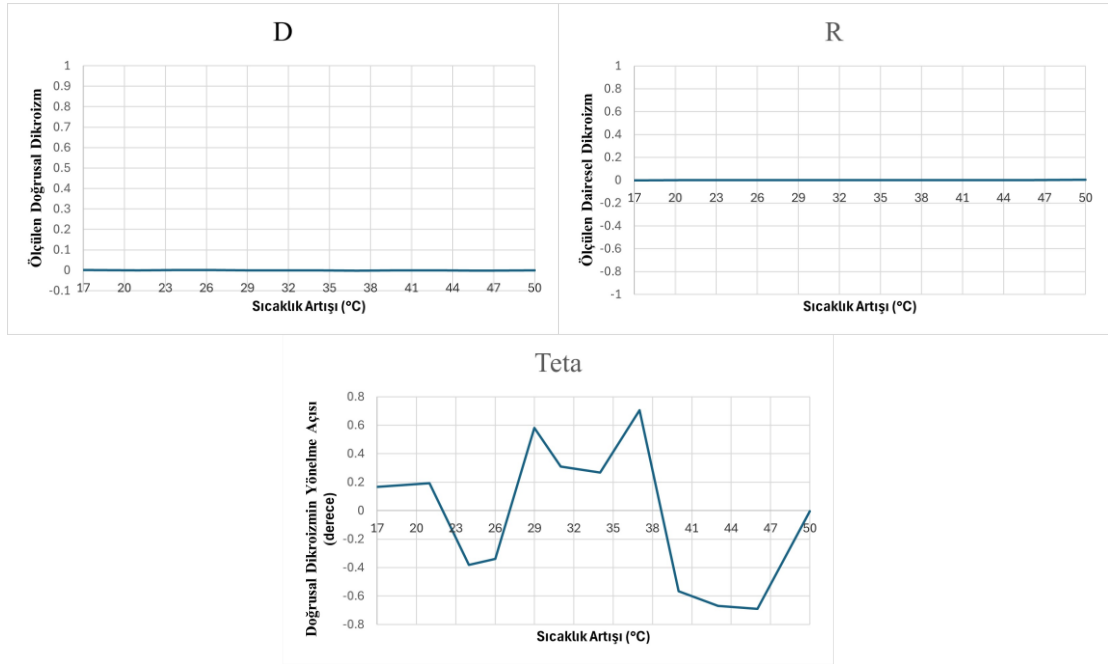
Şekil 48. Kollajen ısıtıldıktan sonra tekrar sıcaklığa bağlı olarak optik parametre değişimleri

3.1.4.3 Müsilajın Mueller Polarimetri ile Ölçümleri

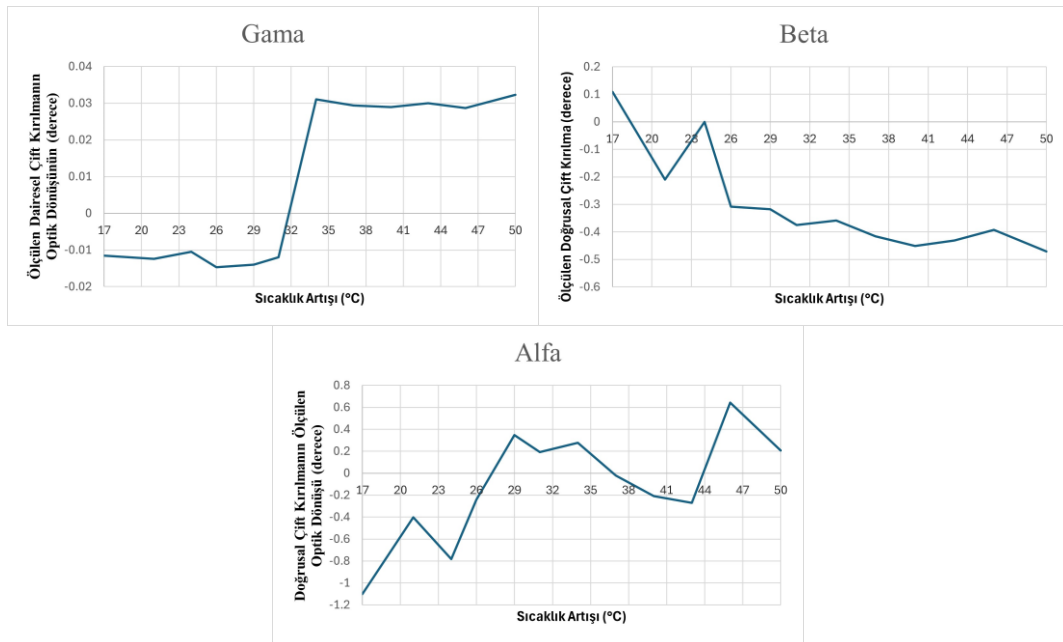
Mueller polarimetri ölçümlerinde müsilajın konsantrasyonu, kollajenin konsantrasyonu ile aynı olacak şekilde %0,05 (a/h) konsantrasyonda seçilmiştir. Müsilajın çözücüsü olarak kullanılan filtrelenmiş deniz suyu ışığı etkilemediği için optik parametreler üzerinde bir etkisi görülmemiştir. Ölçümler ısıtma soğutma sistemi ile müsilaj çözeltisi 17 °C'den 50 °C'ye ısıtılarak alınmıştır. Ölçüm sonuçlarında dairesel ve doğrusal dikroizm değerleri sıfıra yakın çıkmıştır ve teta değeri dikroizm etkisi olmadığı için rastgele değerler göstermiştir (Şekil 49a).

Müsilajın içeriğinde bulunan polisakkaritler kiral moleküller olduğu için, kiral moleküllerden etkilenen gama değerlerinde sıcaklığa bağlı olarak değişim olduğu gözlemlenmiştir (Bui vd., 2021). Müsilajın yapısındaki polisakkarit zincirinin dairesel çift kırılma açısı 30 °C'de keskin bir şekilde artış göstermiştir. Bu sıcaklık değeri aynı zamanda müsilaj oluşumu esnasında deniz suyunun sahip olduğu sıcaklık değeridir. Dairesel çift kırılma keskin bir şekilde artsa da doğrusal çift kırılma değeri yavaş bir şekilde azalmaktadır. Bu da yapı içerisinde düz zincirlerin azaldığı anlamına da gelmektedir. Gama ve beta değerlerindeki bu değişimlerin sonucunda polisakkarit zincirlerinin grup halinde bir araya toplanmasının neden olduğu düşünülmektedir (Kreitschitz ve Gorb, 2018). Doğrusal çift kırılmanın azalmasından kaynaklı olarak,

doğrusal çift kırılmanın optiksel dönüş değerlerinde rastgele değişimler meydana geldiği gözlemlenmiştir.



a)



b)

Şekil 49. a) Müsilajın sıcaklığa bağlı dikroizm optik parametre sonuçları b) Müsilajın sıcaklığa bağlı çift kırılma optik parametre sonuçları

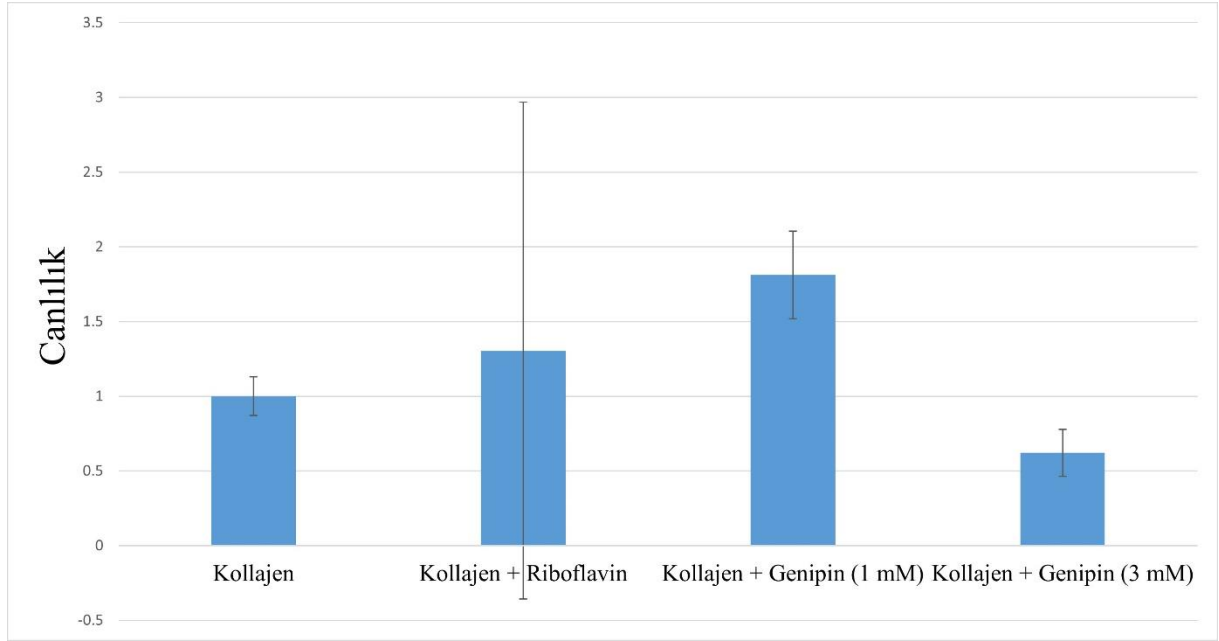
3.1.5 Hücre Kültürü Canlılık Testi Sonuçları

Hücre canlılık testlerinden önce, hücre tutunmalarında ideal yapı iskelesi parametrelerinin belirlenmesi için üç farklı kata sahip yapı iskeleleri üretilmiştir. Üretilen yapı iskeleleri, hücre ortamını, tutunmasını veya canlılığını etkilememesi için PBS ile yıkanmışlardır. Bir, iki ve üç katlı yapı iskelelerine hücre eklenerek 48 saatin sonunda, ters mikroskop ile incelenmişlerdir. Görsel inceleme sonucunda iki katlı yapı iskelelerinde daha fazla hücre tutunmasının gerçekleştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 50. a) Bir katlı b) İki katlı c) üç katlı yapı iskelelerinin hücre tutunmaları

Kollajen yapı iskelelerinin ideal kat sayısı belirlendikten sonra genipin çapraz bağlayıcının konsantrasyonunun belirlenmesi için hücre tutunma testleri yapılmıştır. İçerisindeki genipin miktarı 1mM, 3mM ve 5mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda çapraz bağlanmış yapı iskeleleri üretilmiştir. Hücre tutunması durumu incelendiğinde 5 mM konsantrasyona sahip genipin ile çapraz bağlanmış yapı iskelesinde tutunmanın diğerlerine göre daha az olduğu görülmüştür. Çapraz bağlayıcıların hücre canlılığına olan etkisinin karşılaştırılması için kullanılacak genipin miktarı 1 mM ve 3 mM olarak belirlenmiştir. Riboflavin konsantrasyonu ise Kang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada belirtilen en yüksek esnekliğe sahip konsantrasyonda (%0,05(a/h) oranında) seçilmiştir (Kang vd., 2021). Çapraz bağlayıcıların hücre canlılığına olan etkisini kıyaslamasında kontrol olarak çapraz bağlanmamış kollajen yapı iskelesi kullanılmıştır. Hücre canlılık testleri CCK-8 protokolüne uygun yapılmıştır.



Şekil 51. Hücre canlılık testi sonuçları

Hücre canlılık test sonuçlarına bakıldığında, çapraz bağlamada kullanılan iki farklı kimyasalın hücre canlılığına olan etkisi görülmektedir. Riboflavin ile çapraz bağlanmış yapı iskelesinde, çapraz bağlama olmayan yapı iskelesine göre daha fazla hücre canlılığı gözlemlenmiş ancak yüksek standart sapma değerine sahip olduğu da görülmüştür. Riboflavinin spektroskopi ölçümlerinde, 450 nm dalga boyunda absorbans piki göstermektedir. Absorbans ölçümlerinde riboflavinden gelen etkiyi engellemek amacıyla hücre ekilmemiş riboflavin çapraz bağlı yapı iskelelerinin de ölçümleri alınmıştır. Ancak yine de hücre canlılık ölçümlerinde absorbans değerinin standart sapmasının fazla çıkması engellenememiştir (Orlowska vd., 2013).

Sundararaghavan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre, kollajen içerisinde bulunan genipin miktarı arttıkça sitotoksik özellik göstermekte ve hücre ölümlerine neden olmaktadır. Fessel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da genipin miktarı arttıkça hücre canlılığında azalma meydana geldiği görülmektedir (Fessel vd., 2014; Sundararaghavan vd., 2008). Bu çalışmalar ışığında, genipin ile çapraz bağlanmış yapı iskelelerinde de benzer sonuç görülmüştür. Yapı iskelesi içerisinde bulunan genipin miktarı arttıkça hücre canlılığı olumsuz etkilenmiş ve hücre ölümlerine neden olmuştur. 1 mM genipin ile çapraz bağlanmış yapı iskeleleri, çapraz bağlama yapılmayan kollajen yapı iskelelerinden 1,5 kat daha fazla hücre canlılığına sahip olduğu ölçülmüştür.

4. SONUÇ

Yaptığımız çalışma, biyoyazıcı üretimi, doğal malzeme ekstraksiyonu, yapı iskelesi üretimi, Mueller cihazı üretimi ve karakterizasyonlar olmak üzere beş kısımdan oluşmaktadır.

4.1 3D Biyoyazıcının Üretimi

Doku mühendisliği alanında yapı iskeleleri üretiminde kullanılan 3D biyoyazıcıların ticari olarak alınmak istendiğinde günümüz ekonomik şartlarında pek mümkün değildir. Yaptığımız çalışmada bir 3D biyoyazıcı üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışma prensipleri benzer olduğu için biyoyazıcı üretimi, 3D yazıcının dönüştürülmesiyle yapılmıştır. İlk önce, ticari 3D yazıcının ısıtıcı parçaları çıkartılmış ve yerine basımda kullanılacak malzemeyi sıcaklık olarak etkilemeyecek parçalar ile değiştirilmiştir. Yazıcının plastik parçalarından kaynaklı olan esnekliğini gidermek için ise daha sert bir malzeme olan alüminyum profillerle değiştirilmiştir. Yapılan bu değişiklikler hem ucuz hem de istenilen özelliklere göre daha sonra değiştirilebilir şekilde yapılmıştır. Dijital ortamda tasarlanan üç boyutlu şekil biyoyazıcıya, ticari 3D yazıcının kendi programı ile aktarıldığından herhangi bir kodlama işlemi yapılmasına gerek kalmamıştır. Yaptığımız çalışma göstermektedir ki, ekstrüzyon tabanlı 3D biyoyazıcı, herhangi bir ticari 3D yazıcının istenilen özelliklere uygun olarak parçalarının değiştirilmesiyle ucuz ve kolay bir şekilde üretilmektedir. Farklı yoğunluklardaki hidrojellerin kullanılmasıyla yapılan basımlar, üretilen 3D biyoyazıcının doku mühendisliği alanı için yapı iskelesi üretmeye uygun olduğunu da göstermektedir.

4.2 Doğal Malzemelerin Ekstraksiyonu

3D biyoyazıcı ile yapı iskelesi üretiminde kullanılan hidrojellerin ham maddeleri olarak doğal polimer malzemeler kullanılmıştır. Yapı iskeleleri için ihtiyaç duyulan doğal polimerlerin ticari olarak satın alınması maddi olarak zorluk yaratacağından dolayı doğal atıklardan üretilmesi tercih edilmiştir. Hidrojellerin üretiminde kullanılan kollajenin ekstraksiyonu için araştırmalarda en çok karşılaşılan sıçan kuyruğu ve sığır derisi hayvansal kaynak olarak kullanılmıştır. Her iki kaynaktan da başarılı bir şekilde kollajen ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sıçan kuyruğundan ekstrakte edilen kollajen, sığır derisinden ekstrakte edilen kollajene nazaran daha verimli olmuş, aynı zamanda

ekstraksiyon işlemleri daha kısa sürmüştür. Bu nedenden dolayı sıçan tendonu kollajen kaynağı olarak, zamansal ve kolaylık açısından tercih edilebilir. Çalışmada ekstrakte edilen diğer polimerik malzeme ise deniz müsilağıdır. Deniz müsilağının ekstraksiyon verimi çok düşük kalmıştır ve yapı iskelesinde kullanılacak miktarda üretimi için çok fazla malzeme harcamak gerekeceğinden yapı iskelesi üretiminde kullanılamamıştır.

4.3 Yapı İskelelerinin Üretimi ve Çapraz Bağlama

3D biyoyazıcı ile üretilen kollajen yapı iskeleleri biyobasım esnasında yapısal formunu korusa da doku ve organlar için yeterli dayanıma sahip değildir. Bu yüzden farklı kimyasallar ile kollajenin çapraz bağlanması yapılarak yapısal dayanımı sağlanması hedeflenmiştir. Çapraz bağlamada kullanılan kimyasallar, hücre canlılığını etkilemeyen malzemelerden seçilmiş ve bu malzemelerin konsantrasyonları yapılan çalışmalara göre seçilmiştir. Yaptığımız çalışmada genipin ve riboflavin kimyasalları çapraz bağlayıcı olarak tercih edilmişlerdir. Genipin, miktarına bağlı olarak hidrojelini rengini önce sarı sonra açık maviden koyu maviye doğru değiştirdiği için görsel olarak çapraz bağlama durumu kontrol edilebilmiştir. Riboflavin ise hidrojel ile karıştırıldığında rengini sarıya çevirmiştir. Her iki kimyasalda da farklı renklere neden olmalarından dolayı görsel olarak çapraz bağlama durumları kontrol edilebilmiştir.

4.4 Mueller Polarimetri Cihazının Üretimi

Biyomalzemelerin optik karakterizasyonu olarak kullanılan cihazlardan biri Mueller polarimetri cihazıdır. Ülkemizde ticari olarak bir Mueller polarimetri cihazı satılmamaktadır, yurt dışından alınmak istendiğinde ise oldukça pahalıya denk gelmektedir. Aynı zamanda ticari olarak satın alınacak olan Mueller polarimetri cihazı kapalı bir sistem olacağından ölçümü yapılacak olan numune türüne göre de değişiklik yapılamayacaktır. Ölçümü yapılacak malzeme türüne göre istenilen değişikliğin yapılabilmesi amacıyla, Mueller polarimetri cihazı laboratuvarında açık bir sistem olarak üretilmiştir. İlk prototip üretimindeki ölçümler havadaki tozlardan, ortam aydınlatmasından ve ortam sıcaklığından etkilenmiştir. Bunun önüne geçmek için sistem kapalı bir kutunun içerisine koyulmuştur. Kapalı bir kutu içerisine konulan cihaz ile yapılan ölçümler daha stabil sonuçlar vermiştir. Yapılan optimizasyon ölçümleriyle, sistemde kullanılan yöntemin ve hesaplamaların doğruluğu kontrol edilmiştir. Sonuçların

literatürle uyumlu çıkmış ve başarılı bir şekilde Mueller polarimetri cihazının üretildiğini göstermiştir.

4.5 Karakterizasyon Sonuçları

Mueller polarimetriyle, doğal malzemelerin yapısal karakterizasyon analizleri yapılmış ve bu malzemelerin sıcaklık artışıyla moleküllerindeki değişim hesaplanabilmiştir. Yapılan analizlerin sonuçlarına göre kollajenin moleküler yapısı yaklaşık 39 °C’de açılmakta ve tamamen bozulmakta, müsilağın yapısı ise yaklaşık 30 °C’de moleküler zincirler toplanarak daha büyük yığınlar haline gelmektedir.

Ekstrakte edilen müsilağ örnekleri Raman spektroskopisiyle incelendiğinde, müsilağın yapısında bulunan polisakkaritlerin olduğu görülmüştür. Bu müsilağ ekstraksiyonunun başarılı olarak gerçekleştiğini göstermektedir.

Çapraz bağlayıcı kimyasalların, kollajen yapı iskelesine olan etkisini incelemek için Raman spektroskopi cihazı ve sFTIR spektroskopi cihazı kullanılmıştır. sFTIR spektroskopisi, normal bir FTIR spektroskopi cihazına göre 1000 kat daha iyi çözünürlükte sonuç verdiği için tercih edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda çapraz bağlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Aynı zamanda yapı iskelelerinin hücre canlılık testleri yapıldığında, en yüksek hücre canlılığı genipin ile çapraz bağlanan yapı iskelesinde görülmüştür. Hidrojel içerisindeki genipin konsantrasyonu arttığı zaman hücre ölümlerine neden olduğundan hücre canlılığı için en ideal yapı iskelesi, 1mM konsantrasyonda genipin ile çapraz bağlanmış kollajen yapı iskelesi olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

5. KAYNAKLAR

- Abdelaziz, A. G., Nageh, H., Abdo, S. M., Abdalla, M. S., Amer, A. A., Abdal-Hay, A., & Barhoum, A. (2023). A review of 3D polymeric scaffolds for bone tissue engineering: principles, fabrication techniques, immunomodulatory roles, and challenges. *Bioengineering*, 10(2), 204.
- Adamiak, K., & Sionkowska, A. (2020). Current methods of collagen cross-linking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 550-560.
- Ahmad, I., Khaliq, A., Iqbal, M., & Khan, S. (2020). Mueller matrix polarimetry for characterization of skin tissue samples: A review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 30, 101708.
- Alpizar-Reyes, E., Carrillo-Navas, H., Gallardo-Rivera, R., Varela-Guerrero, V., Alvarez-Ramirez, J., & Pérez-Alonso, C. (2017). Functional properties and physicochemical characteristics of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed mucilage powder as a novel hydrocolloid. *Journal of Food Engineering*, 209, 68-75.
- Alqerban, A. (2021). Effectiveness of riboflavin and rose Bengal photosensitizer modified adhesive resin for orthodontic bonding. *Pharmaceuticals*, 14(1), 48.
- Andrea, O., & Bill, T. (2024). A review on biopolymer-based bioinks for 3D bioprinting. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 11(2), 43-52.
- Brennan-Pierce, E. P., MacAskill, I., Price, R. B., & Lee, J. M. (2014). Riboflavin-sensitized photo-crosslinking of collagen using a dental curing light. *Bio-medical materials and engineering*, 24(4), 1659-1671.
- Bui, C. V., Rosenau, T., & Hettegger, H. (2021). Polysaccharide-and β -Cyclodextrin-based chiral selectors for enantiomer resolution: recent developments and applications. *Molecules*, 26(14), 4322.
- Bumrah, G. S., & Sharma, R. M. (2016). Raman spectroscopy–Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), 209-215.
- Bürck, J., Heissler, S., Geckle, U., Ardakani, M. F., Schneider, R., Ulrich, A. S., & Kazanci, M. (2013). Resemblance of electrospun collagen nanofibers to their native structure. *Langmuir*, 29(5), 1562-1572.
- Camerlingo, C., Portaccio, M., Tatè, R., Lepore, M., & Delfino, I. (2017). Fructose and pectin detection in fruit-based food products by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sensors*, 17(4), 839.
- Cárcamo, J. J., Aliaga, A. E., Clavijo, R. E., Brañes, M. R., & Campos-Vallette, M. M. (2012). Raman study of the shockwave effect on collagens. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 86, 360-365.
- Cavallo, A., Al Kayal, T., Mero, A., Mezzetta, A., Pisani, A., Foffa, I., Vecoli, C., Buscemi, M., Guazzelli, L., & Soldani, G. (2023). Marine collagen-based bioink for 3D bioprinting of a bilayered skin model. *Pharmaceutics*, 15(5), 1331.
- Chen, P.-C., Lo, Y.-L., Yu, T.-C., Lin, J.-F., & Yang, T.-T. (2009). Measurement of linear birefringence and diattenuation properties of optical samples using polarimeter and Stokes parameters. *Optics express*, 17(18), 15860-15884.
- Chen, X., Anvari-Yazdi, A. F., Duan, X., Zimmerling, A., Gharraei, R., Sharma, N., Sweilem, S., & Ning, L. (2023). Biomaterials/bioinks and extrusion bioprinting. *Bioactive Materials*, 28, 511-536.
- Chung, S., & King, M. W. (2011). Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and applied biochemistry*, 58(6), 423-438.
- Daly, A. C., Prendergast, M. E., Hughes, A. J., & Burdick, J. A. (2021). Bioprinting for the Biologist. *Cell*, 184(1), 18-32.

- Drzewiecki, K. E., Malavade, J. N., Ahmed, I., Lowe, C. J., & Shreiber, D. I. (2017). A thermoreversible, photocrosslinkable collagen bio-ink for free-form fabrication of scaffolds for regenerative medicine. *Technology*, 5(04), 185-195.
- Du, X., Dehghani, M., Alsaadi, N., Nejad, M. G., Saber-Samandari, S., Toghraie, D., Su, C.-H., & Nguyen, H. C. (2022). A femoral shape porous scaffold bio-nanocomposite fabricated using 3D printing and freeze-drying technique for orthopedic application. *Materials Chemistry and Physics*, 275, 125302.
- Elzinga, E. J., & Sparks, D. L. (2007). Phosphate adsorption onto hematite: An in situ ATR-FTIR investigation of the effects of pH and loading level on the mode of phosphate surface complexation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 308(1), 53-70.
- Embafrash Berhe, H., Tesfay Mezgebo, D., Abrha, S., Gebremeskel Haile, T., & Molla, F. (2023). Extraction, Characterization, and Evaluation of *Lepidium sativum* Linn. Mucilage as a Mucoadhesive Polymer. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2023.
- Fatimi, A., Okoro, O. V., Podstawczyk, D., Siminska-Stanny, J., & Shavandi, A. (2022). Natural hydrogel-based bio-inks for 3D bioprinting in tissue engineering: a review. *Gels*, 8(3), 179.
- Fessel, G., Cadby, J., Wunderli, S., van Weeren, R., & Snedeker, J. G. (2014). Dose- and time-dependent effects of genipin crosslinking on cell viability and tissue mechanics—toward clinical application for tendon repair. *Acta biomaterialia*, 10(5), 1897-1906.
- Gao, G., Kim, B. S., Jang, J., & Cho, D.-W. (2019). Recent strategies in extrusion-based three-dimensional cell printing toward organ biofabrication. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(3), 1150-1169.
- Garcia-Villen, F., Guembe, A., José, M. R., Zúñiga, T., Ruiz-Alonso, S., Saenz-del-Burgo, L., Jesús, M. I., José, I. R., & Pedraz, J. L. (2023). Characterization and assessment of new fibrillar collagen inks and bioinks for 3D printing and bioprinting. *International Journal of Bioprinting*, 9(3).
- Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1531-1546.
- Glowacki, J., & Mizuno, S. (2008). Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 89(5), 338-344.
- González-Masís, J., Cubero-Sesin, J. M., Corrales-Ureña, Y. R., González-Camacho, S., Mora-Ugalde, N., Baizán-Rojas, M., Loaiza, R., Vega-Baudrit, J. R., & Gonzalez-Paz, R. J. (2020). Increased fibroblast metabolic activity of collagen scaffolds via the addition of propolis nanoparticles. *Materials*, 13(14), 3118.
- González-Masís, J., Cubero-Sesin, J. M., Guerrero, S., González-Camacho, S., Corrales-Ureña, Y. R., Redondo-Gómez, C., Vega-Baudrit, J. R., & Gonzalez-Paz, R. J. (2020). Self-assembly study of type I collagen extracted from male Wistar Hannover rat tail tendons. *Biomaterials Research*, 24(1), 19.
- Groll, J., Burdick, J., Cho, D., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S., Jüngst, T., Malda, J., Mironov, V., & Nakayama, K. (2018). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*, 11 (1): 013001. In.
- Heo, J., Koh, R. H., Shim, W., Kim, H. D., Yim, H.-G., & Hwang, N. S. (2016). Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug delivery and translational research*, 6, 148-158.

- Hosseinkhani, M., Mehrabani, D., Karimfar, M. H., Bakhtiyari, S., Manafi, A., & Shirazi, R. (2014). Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine. *World journal of plastic surgery*, 3(1), 3.
- Ibrahim, N. I., Oslan, S. N. H., Shapawi, R., Mokhtar, R. A. M., Noordin, W. N. M., Nurdiani, R., & Huda, N. (2023). Isolation and Characterization of Acid-Soluble Collagens from the Bone and Fins of the Barracuda (*Sphyraena* spp.) as Marine Collagen Sources. *International Journal on Advanced Science, Engineering & Information Technology*, 13(2).
- Ignatenko, D. N., Shkirin, A. V., Lobachevsky, Y. P., & Gudkov, S. V. (2022). Applications of Mueller matrix polarimetry to biological and agricultural diagnostics: a review. *Applied Sciences*, 12(10), 5258.
- Islam, M. M., AbuSamra, D. B., Chivu, A., Argüeso, P., Dohlman, C. H., Patra, H. K., Chodosh, J., & González-Andrades, M. (2021). Optimization of collagen chemical crosslinking to restore biocompatibility of tissue-engineered scaffolds. *Pharmaceutics*, 13(6), 832.
- Jafari, H., Lista, A., Siekapen, M. M., Ghaffari-Bohlouli, P., Nie, L., Alimoradi, H., & Shavandi, A. (2020). Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. *Polymers*, 12(10), 2230.
- Jeong, H.-J., Nam, H., Jang, J., & Lee, S.-J. (2020). 3D bioprinting strategies for the regeneration of functional tubular tissues and organs. *Bioengineering*, 7(2), 32.
- Jiang, Y.-H., Lou, Y.-Y., Li, T.-H., Liu, B.-Z., Chen, K., Zhang, D., & Li, T. (2022). Cross-linking methods of type I collagen-based scaffolds for cartilage tissue engineering. *American journal of translational research*, 14(2), 1146.
- Kahoush, M., Behary, N., Guan, J., Cayla, A., Mutel, B., & Nierstrasz, V. (2021). Genipin-mediated immobilization of glucose oxidase enzyme on carbon felt for use as heterogeneous catalyst in sustainable wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105633.
- Kamel, G., Lefrancois, S., Moreno, T., Al-Najdawi, M., Momani, Y., Abbadi, A., Paolucci, G., & Dumas, P. (2021). The first infrared beamline at the Middle East SESAME synchrotron facility. *Journal of Synchrotron Radiation*, 28(6), 1927-1934.
- Kamel, G., Lefrançois, S., Al-Najdawi, M., Abu-Hanieh, T., Saleh, I., Momani, Y., & Dumas, P. (2017). EMIRA: the infrared synchrotron radiation beamline at SESAME. *Synchrotron Radiation News*, 30(4), 8-10.
- Kang, Y., Kim, J. H., Kim, S. Y., Koh, W.-G., & Lee, H. J. (2021). Blue light-activated riboflavin phosphate promotes collagen crosslinking to modify the properties of connective tissues. *Materials*, 14(19), 5788.
- Kazanci, M., Haciosmanoglu, S. K., & Kamel, G. (2021). Synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy (sFTIRM) analysis of unfolding behavior of electrospun collagen nanofibers. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 251, 119420.
- Kizil, R., & Irudayaraj, J. (2018). Spectroscopic Technique: Fourier Transform Raman (FT-Raman) Spectroscopy. In *Modern techniques for food authentication* (pp. 193-217). Elsevier.
- Kolan, K. C., Semon, J. A., Bromet, B., Day, D. E., & Leu, M. C. (2019). Bioprinting with human stem cell-laden alginate-gelatin bioink and bioactive glass for tissue engineering. *International Journal of Bioprinting*, 5(2.2).
- Koo, Y., Choi, E.-J., Lee, J., Kim, H.-J., Kim, G., & Do, S. H. (2018). 3D printed cell-laden collagen and hybrid scaffolds for in vivo articular cartilage tissue regeneration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 66, 343-355.

- Kreitschitz, A., & Gorb, S. N. (2018). The micro-and nanoscale spatial architecture of the seed mucilage—Comparative study of selected plant species. *PloS one*, 13(7), e0200522.
- Le, H.-M., Le, T. H., & Phan, Q. H. (2022). Mueller matrix imaging polarimetry technique for dengue fever detection. *Optics Communications*, 502, 127420.
- Litescu, S.-C., Teodor, E. D., Truica, G.-I., Tache, A., & Radu, G.-L. (2012). Fourier transform infrared spectroscopy—useful analytical tool for non-destructive analysis. *Infrared Spectrosc.-Mater. Sci. Eng. Technol*, 353-368.
- Liu, F., Gu, H., Lin, Y., Qi, Y., Dong, X., Gao, J., & Cai, T. (2012). Surface-enhanced Raman scattering study of riboflavin on borohydride-reduced silver colloids: Dependence of concentration, halide anions and pH values. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 85(1), 111-119.
- Lo, Y.-L., & Chen, P.-C. (2010). Characterization on five effective parameters of anisotropic optical material using Stokes parameters-Demonstration by a fiber-type polarimeter. *Optics express*, 18(9), 9133-9150.
- Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D.-H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology advances*, 34(4), 422-434.
- Masri, S., Maarof, M., Mohd, N. F., Hiraoka, Y., Tabata, Y., & Fauzi, M. B. (2022). Injectable crosslinked genipin hybrid gelatin–PVA hydrogels for future use as bioinks in expediting cutaneous healing capacity: physicochemical characterisation and cytotoxicity evaluation. *Biomedicines*, 10(10), 2651.
- Mecozzi, M., Pietroletti, M., & Conti, M. E. (2008). The complex mechanisms of marine mucilage formation by spectroscopic investigation of the structural characteristics of natural and synthetic mucilage samples. *Marine Chemistry*, 112(1-2), 38-52.
- Melcher, S., Spörl, E., Koch, E., & Steiner, G. (2018). Molecular processes of corneal collagen cross-linking in keratoconus therapy. *Current Directions in Biomedical Engineering*, 4(1), 489-492.
- Muehlethaler, C., Gueissaz, L., & Massonnet, G. (2013). Forensic paint analysis.
- Neves, M. I. L., Valdés, A., Silva, E. K., Meireles, M. A. A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2022). Study of the reaction between genipin and amino acids, dairy proteins, and milk to form a blue colorant ingredient. *Food Research International*, 157, 111240.
- Orlowska, M., Koutchma, T., Grapperhaus, M., Gallagher, J., Schaefer, R., & Defelice, C. (2013). Continuous and pulsed ultraviolet light for nonthermal treatment of liquid foods. Part 1: effects on quality of fructose solution, apple juice, and milk. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1580-1592.
- Osidak, E. O., Kozhukhov, V. I., Osidak, M. S., & Domogatsky, S. P. (2020). Collagen as bioink for bioprinting: A comprehensive review. *International Journal of Bioprinting*, 6(3).
- Parikh, S. J., & Chorover, J. (2006). ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. *Langmuir*, 22(20), 8492-8500.
- Pascolo, L., Bortot, B., Benseny-Cases, N., Gianoncelli, A., Tosi, G., Ruozi, B., Rizzardi, C., De Martino, E., Vandelli, M. A., & Severini, G. M. (2014). Detection of PLGA-based nanoparticles at a single-cell level by synchrotron radiation FTIR spectromicroscopy and correlation with X-ray fluorescence microscopy. *International Journal of Nanomedicine*, 2791-2801.
- Pasteris, J. D., Wopenka, B., Freeman, J. J., Brewer, P. G., White, S. N., Peltzer, E. T., & Malby, G. E. (2004). Raman spectroscopy in the deep ocean: successes and challenges. *Applied Spectroscopy*, 58(7), 195A-208A.

- Petibois, C., Gouspillou, G., Wehbe, K., Delage, J.-P., & Dél  ris, G. (2006). Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 386, 1961-1966.
- Pham, T.-T.-H., & Lo, Y.-L. (2012a). Extraction of effective parameters of anisotropic optical materials using a decoupled analytical method. *Journal of Biomedical Optics*, 17(2), 025006-025006.
- Pham, T.-T.-H., & Lo, Y.-L. (2012b). Extraction of effective parameters of turbid media utilizing the Mueller matrix approach: study of glucose sensing. *Journal of Biomedical Optics*, 17(9), 097002-097002.
- Pham, T.-T.-H., Phan, Q.-H., Le, T.-H., & Le, N.-B. (2023). Stokes–Mueller matrix polarimetry: effective parameters of anisotropic turbid media: theory and application. In *Optical Polarimetric Modalities for Biomedical Research* (pp. 47-76). Springer.
- Precali, R., Giani, M., Marini, M., Grilli, F., Ferrari, C. R., Pe  ar, O., & Paschini, E. (2005). Mucilaginous aggregates in the northern Adriatic in the period 1999–2002: typology and distribution. *Science of the Total Environment*, 353(1-3), 10-23.
- Rahmati, M., Mills, D. K., Urbanska, A. M., Saeb, M. R., Venugopal, J. R., Ramakrishna, S., & Mozafari, M. (2021). Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*, 117, 100721.
- Ravanbakhsh, H., Karamzadeh, V., Bao, G., Mongeau, L., Juncker, D., & Zhang, Y. S. (2021). Emerging technologies in multi-material bioprinting. *Advanced Materials*, 33(49), 2104730.
- Reis, S. E., Andrade, R. G. C., Accardo, C. M., Maia, L. F., Oliveira, L. F., Nader, H. B., Aguiar, J. A., & Medeiros, V. P. (2020). Influence of sulfated polysaccharides from *Ulva lactuca* L. upon Xa and IIa coagulation factors and on venous blood clot formation. *Algal research*, 45, 101750.
- Ren, P., Wei, D., Liang, M., Xu, L., Zhang, T., & Zhang, Q. (2022). Alginate/gelatin-based hybrid hydrogels with function of injecting and encapsulating cells in situ. *International Journal of Biological Macromolecules*, 212, 67-84.
- Rhee, S., Puetzer, J. L., Mason, B. N., Reinhart-King, C. A., & Bonassar, L. J. (2016). 3D bioprinting of spatially heterogeneous collagen constructs for cartilage tissue engineering. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(10), 1800-1805.
- Riacci, L., Sorriento, A., & Ricotti, L. (2021). Genipin-based crosslinking of jellyfish collagen 3D hydrogels. *Gels*, 7(4), 238.
- Rich, H., Odlyha, M., Cheema, U., Mudera, V., & Bozec, L. (2014). Effects of photochemical riboflavin-mediated crosslinks on the physical properties of collagen constructs and fibrils. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25, 11-21.
- Rider, P., Ka  arevi  ,   . P., Alkildani, S., Retnasingh, S., & Barbeck, M. (2018). Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *Journal of tissue engineering*, 9, 2041731418802090.
- Roseti, L., Cavallo, C., Desando, G., Parisi, V., Petretta, M., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2018). Three-dimensional bioprinting of cartilage by the use of stem cells: a strategy to improve regeneration. *Materials*, 11(9), 1749.
- Rostron, P., Gaber, S., & Gaber, D. (2016). Raman spectroscopy, review. *laser*, 21, 24.
- Scialla, S., Gullotta, F., Izzo, D., Palazzo, B., Scalera, F., Martin, I., Sannino, A., & Gervaso, F. (2022). Genipin-crosslinked collagen scaffolds inducing

- chondrogenesis: a mechanical and biological characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(7), 1372-1385.
- Seol, Y.-J., Kang, H.-W., Lee, S. J., Atala, A., & Yoo, J. J. (2014). Bioprinting technology and its applications. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 46(3), 342-348.
- Shao, J., Lin, M., Li, Y., Li, X., Liu, J., Liang, J., & Yao, H. (2012). In vivo blood glucose quantification using Raman spectroscopy. *PloS one*, 7(10), e48127.
- Sharma, S., Poddar, R., Sen, P., & Andrews, J. (2008). Effect of vitamin C on collagen biosynthesis and degree of birefringence in polarization sensitive optical coherence tomography (PS-OCT). *African Journal of Biotechnology*, 7(12).
- Sheraz, M. A., Kazi, S. H., Ahmed, S., Anwar, Z., & Ahmad, I. (2014). Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein Journal of organic chemistry*, 10(1), 1999-2012.
- Shirehjini, L. M., Sharifi, F., Shojaei, S., & Irani, S. (2022). Poly-caprolactone nanofibrous coated with sol-gel alginate/mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 103488.
- Simon, M., Grossart, H.-P., Schweitzer, B., & Ploug, H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic microbial ecology*, 28(2), 175-211.
- Sobczak-Kupiec, A., Drabczyk, A., Florkiewicz, W., Głąb, M., Kudłacik-Kramarczyk, S., Słota, D., Tomala, A., & Tyliszczak, B. (2021). Review of the applications of biomedical compositions containing hydroxyapatite and collagen modified by bioactive components. *Materials*, 14(9), 2096.
- Sundararaghavan, H. G., Monteiro, G. A., Lapin, N. A., Chabal, Y. J., Miksan, J. R., & Shreiber, D. I. (2008). Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 87(2), 308-320.
- Tosif, M. M., Najda, A., Bains, A., Kaushik, R., Dhull, S. B., Chawla, P., & Walasek-Janusz, M. (2021). A comprehensive review on plant-derived mucilage: characterization, functional properties, applications, and its utilization for nanocarrier fabrication. *Polymers*, 13(7), 1066.
- Uemura, R., Miura, J., Ishimoto, T., Yagi, K., Matsuda, Y., Shimizu, M., Nakano, T., & Hayashi, M. (2019). UVA-activated riboflavin promotes collagen crosslinking to prevent root caries. *Scientific Reports*, 9(1), 1252.
- Vanaei, S., Parizi, M., Saleemizadehparizi, F., & Vanaei, H. (2021). An overview on materials and techniques in 3D bioprinting toward biomedical application. *Engineered Regeneration*, 2, 1-18.
- Varkey, M., Visscher, D. O., Van Zuijlen, P. P., Atala, A., & Yoo, J. J. (2019). Skin bioprinting: the future of burn wound reconstruction? *Burns & trauma*, 7, s41038-41019-40142-41037.
- Veiga, A., Castro, F., Rocha, F., & Oliveira, A. L. (2022). An update on hydroxyapatite/collagen composites: What is there left to say about these bioinspired materials? *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110(5), 1192-1205.
- Vijayavenkataraman, S., Yan, W.-C., Lu, W. F., Wang, C.-H., & Fuh, J. Y. H. (2018). 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 132, 296-332.

- Wang, M., Lu, X., Yin, X., Tong, Y., Peng, W., Wu, L., Li, H., Yang, Y., Gu, J., & Xiao, T. (2015). Synchrotron radiation-based Fourier-transform infrared spectromicroscopy for characterization of the protein/peptide distribution in single microspheres. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(3), 270-276.
- Wang, Z., Liu, H., Luo, W., Cai, T., Li, Z., Liu, Y., Gao, W., Wan, Q., Wang, X., & Wang, J. (2020). Regeneration of skeletal system with genipin crosslinked biomaterials. *Journal of tissue engineering*, 11, 2041731420974861.
- Wei, Q., Yang, R., Sun, D., Zhou, J., Li, M., Zhang, Y., & Wang, Y. (2022). Design and evaluation of sodium alginate/polyvinyl alcohol blend hydrogel for 3D bioprinting cartilage scaffold: Molecular dynamics simulation and experimental method. *Journal of materials research and technology*, 17, 66-78.
- Wu, L., Li, X., Guan, T., Chen, Y., & Qi, C. (2020). 3D bioprinting of tissue engineering scaffold for cell culture. *Rapid Prototyping Journal*, 26(5), 835-840.
- Xia, Z., Jin, S., & Ye, K. (2018). Tissue and organ 3D bioprinting. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation*, 23(4), 301-314.
- Xu, S., Gu, M., Wu, K., & Li, G. (2021). Unraveling the interaction mechanism between collagen and alcohols with different chain lengths and hydroxyl positions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 199, 111559.
- Yang, B., Liu, H., Jiang, L., Zeng, Y., Han, Y., Sha, C., Xie, X., Li, H., Zhou, J., & Lin, W. (2023). 3D bioprinting of collagen-based materials for oral medicine. *Collagen and Leather*, 5(1), 23.
- Zhang, X., Chen, X., Yang, T., Zhang, N., Dong, L., Ma, S., Liu, X., Zhou, M., & Li, B. (2014). The effects of different crossing-linking conditions of genipin on type I collagen scaffolds: an in vitro evaluation. *Cell and tissue banking*, 15, 531-541.
- Zhang, Y., Wang, Q. S., Yan, K., Qi, Y., Wang, G. F., & Cui, Y. L. (2016). Preparation, characterization, and evaluation of genipin crosslinked chitosan/gelatin three-dimensional scaffolds for liver tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(8), 1863-1870.