

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**45S5 BİLEŞİMİNE SAHİP VE BAKIR KATKILI BİYOAKTİF CAMLARDAN
ÜÇ BOYUTLU KOMPOZİT YAPI İSKELESİ ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nuray YERLİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

HAZİRAN 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**45S5 BİLEŞİMİNE SAHİP VE BAKIR KATKILI BİYOAKTİF CAMLARDAN
ÜÇ BOYUTLU KOMPOZİT YAPI İSKELESİ ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Nuray YERLİ
(506121023)**

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sadriye KÜÇÜKBAYRAK

HAZİRAN 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506121023 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Nuray YERLİ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**45S5 BİLEŞİMİNE SAHİP VE BAKIR KATKILI BİYOAKTİF CAMLARDAN ÜÇ BOYUTLU KOMPOZİT YAPI İSKELESİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Sadriye KÜÇÜKBAYRAK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Sevil YÜCEL**
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Melek EROL TAYGUN
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **4 Mayıs 2015**
Savunma Tarihi : **3 Haziran 2015**

ÖNSÖZ

Öncelikle, tez araştırma sürem boyunca, her türlü bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren, birlikte çalışmaktan onur duyduğum saygı değer hocam Prof. Dr. Sadriye KÜÇÜKBAYRAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tüm aşamalarında değerli fikirleriyle beni aydınlatan, tecrübeleriyle bana yol gösteren, zorlu tez süresince beni motive eden, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, çok özel ve değerli hocam Doç. Dr. Melek EROL TAYGUN'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, deneysel çalışmalarına büyük katkı sağlayan ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Kimya Yüksek Mühendisleri Seza Özge GÖNEN ve Ayşen AKTÜRK'e sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, deneysel çalışmalarımın analizlerinde yardımlarından dolayı Kimya Mühendisi Sevgin TÜRKEİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri ile bugünlere gelmem de büyük emekleri olan ve varlıkları ile bana güven veren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2015

Nuray YERLİ
(Kimya Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. BİYOAKTİF CAMLAR VE CAM SERAMİKLER	5
2.1 Biyoaktif Camların Özellikleri.....	8
2.1.1 Mekanik özellikler	8
2.1.2 Yüzey reaksiyonları ve doku bağlanması	8
2.2 Biyoaktif Cam Üretim Yöntemleri	10
2.2.1 Klasik ergitme yöntemi	10
2.2.2 Sol-jel yöntemi.....	11
2.3 Biyoaktif Camların Kullanım Alanları.....	11
2.4 Bakır Katkılı Biyoaktif Camlar	12
3. BİYOPOLİMERLER	15
3.1 Doğal Biyopolimerler	15
3.1.1 Nişasta	15
3.1.2 Kitosan	16
3.1.3 Kolajen	17
3.1.4 Fibrin	17
3.1.5 Hiyolüranik asit.....	17
3.1.6 Elastin.....	18
3.1.7 Jelatin	18
3.1.8 Aljinat.....	18
3.1 Sentetik Biyopolimerler	19
3.1.1 Doygun alifatik poliestерler	19
3.1.2 Polipropilen fumarat(PPF)	20
3.1.3 Poli (vinil alkol)	20
3.1.4 Polihidroksialkanoatlar (PHB, PHBV, P4HB, PHBHHx, PHO).....	21
3.1.5 Yüzey biyoaşınma polimerleri	21
4. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILAN YAPI İSKELELERİ	23
4.1 İdeal Bir Yapı İskelesinin Sahip Olması Gereken Özellikler	24
4.2 Yapı İskelesi Üretim Yöntemleri	26
4.2.1 Sol-jel prosesi.....	26
4.2.2 Sünger kopyalama yöntemi.....	26
4.2.3 Polimer kaplı biyocam yapı iskeleleri.....	27
4.2.4 Çözücü döküm yöntemi	28

4.2.5 Çözücü döküm/tanecik uzaklaştırma yöntemi	28
4.2.6 Çözücü döküm/tanecik uzaklaştırma ve mikroküre dolgulama	29
4.2.7 Mikroküre sinterleme	29
4.2.8 Isıl etkiyle faz ayrımı (TIPS)/dondurarak kurutma	29
4.2.9 Polimerik sünger inorganik kaplama.....	30
4.2.10 Katı serbest form (SFF) (hızlı prototipleme yöntemi)	30
4.3 Yapı İskelesi Üretimi İle İlgili Literatürde Yapılan Çalışmalar	31
5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	37
5.1 Çalışma Programı	37
5.2 Numunelerin Hazırlanması	38
5.2.1 Ergitme yöntemi ile biyoaktif camların üretim	38
5.2.2 Polimer sünger kopyalama yöntemi ile yapı iskelesi üretimi	38
5.2.3 Yapı iskelelerinin aljinat ile kaplanması ve 45S5 camı ile üretilen yapı iskelelerine çapraz bağlama yapılması	39
5.3 Biyoaktif Cam Numunelerinin ve Yapı İskelelerinin Karakterizasyonu	40
5.3.1 Üretilen biyoaktif cam numunelerine DTA (Diferansiyel Termal Analiz) uygulanması.....	40
5.3.2 İn vitro biyoaktivite analizleri	40
5.3.2.1 Yapay vücut sıvısının (SBF) hazırlanması	40
5.3.2.2 X-Işını Difraktometresi (XRD) analizleri.....	41
5.3.2.3 Fourier Kızılötesi Dönüşüm Spektroskopisi (FTIR) analizleri	42
5.3.2.4 Mikroyapı (SEM) analizleri	42
5.3.2.5 Bakır iyonu salımı analizleri	42
5.3.2.6 Biyobozunurluk çalışmaları	43
6. DENEYSEL ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI VE DEĞERLENDİRİLMESİ	45
6.1 Biyoaktif Cam Numunelerinin DTA Sonuçları	45
6.2 Biyoaktif Cam Numunelerinin XRD Sonuçları	46
6.3 Biyoaktif Cam Numunelerinin FTIR Sonuçları	47
6.4 Yapı İskelesi Numunelerinin Karakterizasyonları	48
6.4.1 Yapı iskelesi numunelerinin XRD analizleri	48
6.4.2 Yapı iskelesi numunelerinin FTIR analizleri	51
6.4.3 Yapı iskelesi numunelerinin SEM analizleri.....	58
6.4.4 Yapı iskelesi numunelerinin bakır iyonu salımı analizleri.....	63
6.4.5 Yapı iskelesi numunelerinin in vitro biyobozunurluk çalışmaları	65
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	69
7.1 Sonuçlar.....	69
7.2 Öneriler.....	71
KAYNAKLAR.....	73
EKLER.....	79
ÖZGEÇMİŞ	85

KISALTMALAR

AES	: Atomik Emisyon Spektroskopisi
ALP	: Alkalın Fosfat Aktivitesi
CAD	: Bilgisayar Destekli Program
DTA	: Diferansiyel Termal Analiz
ECM	: Ekstrasellüler matris
EPD	: Elektroforetik Kaplama
FAAS	: Alevli Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FDM	: Eriterek Kaplama
FTIR	: Fourier Kızılötesi Dönüşüm Spektroskopisi
HA	: Hidroksiapatit
HCA	: Hidroksikarbonat apatit
HUVECs	: İnsan göbek bağı damar hücreleri
ICP	: İndüktif Eşleşmiş Plazma
ISO	: Uluslararası Standartlar Örgütü
PCL	: Poli(ϵ -kaprolakton)
PGA	: Poli(glikolik asit)
PHA	: Polihidroksialkanoatlar
PHB	: Poli (hidroksi bütirat)
PLA	: Poli(laktik asit)
PPF	: Poli(propilen fumarat)
PVA	: Poli(vinil alkol)
SBF	: Yapay Vücut Sıvısı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SFF	: Katı Serbest Form
SLS	: Seçici Lazer Sinterleme
TEOS	: Tetraetil ortosilikat
TEP	: Trietil fosfat
TIPS	: Isıl Etkiyle Faz Ayrımı
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
XRD	: X-Işın Difraktometresi
3DP	: Üç Boyutlu Baskı

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Yoğun ve gözenekli hidroksiapatit, 45S5 Biyocam [®] , A/W cam seramik ve insan kortikal kemiğinin mekanik özellikleri.....	8
Çizelge 5.1 : Yapay vücut sıvısının hazırlanmasında kullanılan kimyasal bileşikler.....	41

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Biyoinert, biyoaktif ve biyobozunur olarak sınıflandırılan biyoseramik çeşitleri.....	5
Şekil 2.2 : Kemik bağlanması için bileşimsel diyagram.....	7
Şekil 2.3 : Doku ve biyoaktif camlar arasında kemik oluşumunu içeren ara yüzey tepkimeleri.....	9
Şekil 2.4 : Yumuşak doku yenilenmesinde biyoaktif cam uygulamaları.....	12
Şekil 4.1 : Yapı iskelesi esaslı doku mühendisliğinin şematik gösterimi.....	24
Şekil 4.2 : Kemik doku mühendisliğinde ideal yapı iskelesinin sahip olması gereken en önemli özellikler.....	25
Şekil 4.3 : Polimer sünger kopyalama yönteminin şematik gösterimi.....	27
Şekil 4.4 : Polimer çözeltisine daldırma yöntemi.....	28
Şekil 4.5 : Elektroforetik kaplama (EPD) yönteminin şematik gösterimi.....	30
Şekil 6.1 : 45S5 biyoaktif cam numunesinin DTA eğrisi.....	45
Şekil 6.2 : Bakır katkılı biyoaktif cam numunesinin DTA eğrisi.....	46
Şekil 6.3 : Bakır katkılı biyoaktif cam numunesinin XRD grafiği.....	47
Şekil 6.4 : 45S5 biyoaktif cam numunesinin FTIR grafiği.....	48
Şekil 6.5 : Bakır katkılı biyoaktif cam numunesinin FTIR grafiği.....	48
Şekil 6.6 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelesinin XRD grafiği.....	49
Şekil 6.7 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelesinin XRD grafiği.....	50
Şekil 6.8 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlanmış ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelesinin XRD grafiği.....	50
Şekil 6.9 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelesinin XRD grafiği.....	51
Şekil 6.10 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelesinin XRD grafiği.....	51
Şekil 6.11 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelesinin FTIR grafiği.....	52
Şekil 6.12 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelesinin FTIR grafiği.....	53
Şekil 6.13 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelesinin FTIR grafiği.....	54
Şekil 6.14 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelesinin FTIR grafiği.....	54
Şekil 6.15 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	55
Şekil 6.16 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	55
Şekil 6.17 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	56
Şekil 6.18 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır ile çapraz bağlanmış ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	57
Şekil 6.19 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	57

Şekil 6.20 : 45S5 biyoaktif camından üretilen kaplama yapılmamış yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.....	58
Şekil 6.21: 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlanmış ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.....	59
Şekil 6.22 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlanmış ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de bekletilmeden önce (yakınlaştırılmış görüntü) (c) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.....	60
Şekil 6.23 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlanmış ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.....	60
Şekil 6.24 : Bakır katkılı camdan üretilen kaplama yapılmamış yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.....	61
Şekil 6.25 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de bekletilmeden önce (yakınlaştırılmış görüntü) (c) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.....	62
Şekil 6.26: Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.....	62
Şekil 6.27 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.....	63
Şekil 6.28 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlı aljinat kaplı yapı iskelelerinin SBF çözeltisindeki bakır derişiminin zamana bağlı değişimi.....	64
Şekil 6.29 : Bakır katkılı biyoaktif camdan üretilen yapı iskelelerinin SBF çözeltisindeki bakır derişiminin zamana bağlı değişimi.....	65
Şekil 6.30 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % ağırlık kayıpları.....	66
Şekil 6.31 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlı aljinat kaplı yapı iskelelerinin zamana bağlı % ağırlık kayıpları.....	66
Şekil 6.32 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % ağırlık kayıpları.....	67
Şekil 6.33 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % su absorpsiyonları.....	68
Şekil 6.34 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % su absorpsiyonları.....	68
Şekil A.1 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	80
Şekil A.2 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır ile çapraz bağlanmış ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	80
Şekil A.3 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	81
Şekil A.4 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	81

Şekil A.5 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır ile çapraz bağlanmış ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	82
Şekil A.6 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.....	82
Şekil B.1 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.....	83

45S5 BİLEŞİMİNE SAHİP VE BAKIR KATKILI BİYOAKTİF CAMLARDAN ÜÇ BOYUTLU KOMPOZİT YAPI İSKELESİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Kemik doku mühendisliği; hastalık, kaza ve travma gibi herhangi bir nedenle hasar görmüş organ ve dokuların onarılması, değiştirilmesi ya da yenilenmesini amaçlayan bir bilim dalıdır. Kemik dokunun onarılması ve fonksiyonel hale getirilmesi amacıyla kemik mineralinin yapısını taklit eden ve hücreye uyum sağlayan üç boyutlu yapı iskeleleri hazırlanmaktadır. Yapı iskelelerinin üretiminde biyomalzemeler, metaller, seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler kullanılmaktadır. Bunlar arasında biyolojik olarak kullanılan seramikler (biyoseramikler) sınıfına giren biyoaktif camlar dikkat çekmektedir. Bileşiminde temel olarak silisyum, sodyum, kalsiyum ve fosfat bulunan biyoaktif camlar biyouyumluluğu, biyoaktivitesi, osteoüretkenliği ve osteokondüktifliği yüksek olan biyomalzemelerdir. Biyoaktif camlardan üretilen yapı iskeleleri, canlı vücuda yerleştirildiğinde yüzeylerinde hidroksiapatit tabakası oluşturarak kemik dokusunun etrafında güçlü bağlar kurabilmektedir. Biyoaktif camların yapılarına bakır (Cu^{+2}), stronsiyum (Sr^{+2}), magnezyum (Mg^{+2}), çinko (Zn^{+2}) ve gümüş (Ag^{+1}) gibi iyonlar katılarak fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi ve geliştirilmesi amacıyla çok çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar arasında bakır, kemik oluşumunu ve anjiyogenez kapasitesini artırdığı bilinen, düşük fiyatlı kemik doku mühendisliği için dikkat çeken önemli bir iyondur.

Bu çalışmada, 45S5 (bileşimi ağırlıkça; %45 SiO_2 , %24.5 Na_2O , %6 P_2O_5 , %24.5 CaO) ve bakır katkı (bileşimi ağırlıkça; %45 SiO_2 , %24.5 Na_2O , %6 P_2O_5 , %22.5 CaO , %2 CuO) biyoaktif camlar esas alınarak üç boyutlu yapı iskelesi üretimi gerçekleştirilmiştir. Biyoaktif camların üretiminde klasik ergitme yöntemi kullanılmıştır. Üretilen camların, camsı geçiş ve kristalizasyon sıcaklıklarının tespit edilmesi için DTA, yapılarındaki amorf ve kristal fazların belirlenmesi için XRD ve sahip oldukları kimyasal bağların araştırılması için de FTIR analizleri uygulanmıştır. DTA analizi sonucunda tespit edilen kristalizasyon sıcaklıklarının yapı iskelesi üretimi için uygun olduğu belirlenmiştir. XRD ve FTIR analizleri sonucunda, camların amorf yapıda olduğu tespit edilmiş ve bakır katkısı ile camsı yapıda belirgin bir farklılık oluşmadığı gözlenmiştir. Üretilen camlardan, polimer sünger kopyalama yöntemi kullanılarak üç boyutlu yapı iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Biyoaktivite ve biyobozunurluk davranımlarının iyileştirilmesi için yapı iskeleleri doğal bir polimer olan aljinat (ağırlıkça %1, %2, %3) ile kaplanmış ve 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerinin bir kısmına bakır çözeltisi damlatılarak bakır ile aljinatın çapraz bağlanması sağlanmıştır. Fiziksel ve yüzey özelliklerinin incelenmesi için yapı iskelelerine çeşitli karakterizasyon işlemleri uygulanmıştır. SEM çalışmaları sonucunda, yapı iskelelerinin yüksek gözenekliliğe sahip olduğu ve gözenekler arasındaki bağlantılarının iyi durumda olduğu belirlenmiştir. Ayrıca,

FTIR ve SEM analizleri sonucunda, aljinatın gözenekleri tıkamadan homojen bir kaplama oluşturarak yapı iskelelerinin yüzeyine bağlandığı tespit edilmiştir. İn vitro koşullarda biyoaktivite ve biyobozunma davranımlarının araştırılması için yapı iskeleleri, belirli sürelerde (1, 7, 14 ve 28 gün) yapay vücut sıvısında bekletilmiştir. SEM, XRD ve FTIR analizleri ile, 28 gün süreyle yapay vücut sıvısında bekletilen numunelerin yüzeyinde belirgin bir şekilde hidroksiapatit tabakasının oluştuğu tespit edilmiştir. Yapı iskelelerinin in vitro koşullarda yapay vücut sıvısı içerisinde bakır salımlarını incelemek amacıyla yapılan ICP analizi sonucunda, aljinat ile bakırın çapraz bağlanması sonucunda üretilen numunelerin anjiyojenezi uyarma kapasitesinin bakır katkılı camdan üretilen numunelere göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda, üretilen tüm yapı iskelelerinin bakır iyonu salımının, bakırın vücutta sitotoksik etkiye neden olma sınırının (58 ppm) altında kaldığı saptanmıştır. Sonuçlar, üç boyutlu kompozit yapı iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için potansiyel adaylar olduğunu göstermiştir.

FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF THREE DIMENSIONAL COMPOSITE SCAFFOLDS FROM 45S5 AND COPPER DOPED BIOACTIVE GLASSES

SUMMARY

Tissue damage and degenerative diseases such as large bone defects are among the most human health issues which lead to organ failure and death all over the world. Traditional methods such as autografts, allografts or metallic implants suffer limitations for treatment of these injuries. For instance, autografts have limited availability of tissues and it has a long time for treatment of damages. Also, allografts have a very high cost and they may cause adverse reaction in human body. Therefore, tissue engineering emerges a promising approach to overcome these problems.

Bone tissue engineering is a science that aim to repair, replace or renew of damaged bones which caused by any reason such as illness, accident or trauma. Cells, biomolecules and scaffolds are three main components in tissue engineering approaches. In bone tissue engineering applications, scaffolds are mostly applied in the form of three dimensional porous structures. Three-dimensional scaffolds are prepared that mimic the structure of bone mineral and adjust with the cells to repair and refuction of bone tissue. Several fabrication methods such as sol gel process, foam replica technique, solvent casting with or without particule leaching, microsphere sintering, and solid free form fabrication, have been applied to produce these scaffolds for tissue engineering applications. Foam replica method is a simple process that provides to fabricate three dimensional porous scaffolds in a short time through these methods. Biomaterials, metals, ceramics, polymers and composite materials are used in production of these scaffolds. Among these materials, bioactive glasses which are in class of biological used materials (bioceramics), represent promising scaffolding materials for bone tissue regeneration.

Bioactive glasses have very high biocompatible, bioactive, osteoconductive and osteoproduative properties that can be used for the repair and reconstruction of damaged bone tissues. They are mainly composed of silicon, sodium, calcium and phosphate component. When they are implanted to human body, they are able to bind with bone through a layer of hydroxyapatite formed on their surfaces which react with the surrounding tissue to form a mechanically strong interfacial bond between a host tissue and an implant. Bioactive glasses can be produced by conventional melting and sol-gel methods. Conventional melting method is a simple method and also it provides to fabricate bioglasses in a short time.

Properties of bioactive glasses depend on their chemical structures and in order to enhance functional properties of them and improve bone production properties of these materials, different ions such as copper (Cu^{2+}), strontium (Sr^{2+}), magnesium (Mg^{2+}), zinc (Zn^{2+}) and silver (Ag^{1+}) can be incorporated in their structures. All of

these ions have essential biological effects. For instance, strontium accelerate bone healing processes and have positive effects on bone tissue repair. Among these ions, copper plays an active role in stimulating angiogenesis. Angiogenesis can be stimulated by delivery of the cells or growth factors such as endothelial growth factor (VEGF) from biodegradable scaffolds. However, these prices are very high and they have potential diverse effects in clinical applications. Copper ions are attractive for tissue engineering applications because of their low cost, high stability and potentially greater safety compared with recombinant proteins.

In recent years, scientists have been working on polymer coating of bioglass based scaffolds in order to improve mechanical properties. Also, bioactivity and biodegradability behavior can be enhanced with this way. For this purpose, different natural and synthetic polymers are used. Among these materials, natural polymers such as alginate, gelatin and chitosan are remarkable materials. Especially, alginate is a special polymer which is widely used for cell immobilization and encapsulation.

In this study, three dimensional scaffolds were fabricated based on 45S5 (composition in weight; %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %24.5 CaO) and copper doped (composition in weight; %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %24.5 CaO, %2 CuO) bioactive glasses. Conventional melting method was used to produce bioactive glasses. DTA analysis is applied to find glass transition and crystallization temperatures of the bioactive glass samples. Also, amorphous and crystalline phases of the glasses are determined with using XRD, and FTIR analysis was done to research chemical bonds. Crystallization temperatures of the glasses, which were found with DTA analysis, show that they were appropriate for sintering process in scaffold production. As a result of XRD and FTIR analysis, it was detected that glasses have fully amorphous structures. At the same time, it did not emerge a significant difference on the structure of glass with doping copper.

Three dimensional scaffolds were fabricated from bioactive glasses by the foam replica method. Then in order to improve bioactivity and biodegradability behavior of scaffolds, they were coated with polymer. With this aim alginate which is a natural polymer was used at different percentages (1, 2, 3 % weight). Copper ions were dropped on some coated scaffolds which were produced by 45S5 bioactive glass and thus cross-linking of the copper with alginate was provided. Physical and micro structural properties of the obtained scaffolds were determined with using different characterization methods. It was observed that scaffolds have a very high porous structure and there was a good pore interconnectivity in the scaffold microstructure from the SEM images. As a result of FTIR and SEM analysis, it was detected that alginate attached on the surface of the scaffolds without clogging of the pores and also it was provided that homogeneous coating on the surface of the samples.

The obtained scaffolds were immersed in simulated body fluid at different time points (1, 7, 14 and 28 day) to research of bioactivity and biodegradability behavior. As it was observed from the SEM images, it was seen that significantly hydroxyapatite layer formed on the surface of the scaffolds after immersion in SBF for 28 day. Furthermore, XRD patterns and FTIR spectra were verified this result. Characteristic chemical bonds which belongs to hydroxyapatite were obtained with

FTIR and degrees of hydroxyapatite was detected from the result of XRD analysis. Copper releasing of the scaffolds in simulated body fluid in vitro were investigated with ICP analysis. As a result of this analysis the samples coated with alginate cross linked with copper, have more potential in stimulating angiogenesis compared with samples which were produced with based on copper doped bioactive glasses. At the same time, all copper releasing values of scaffolds were remained below the limit of cytotoxic effects of copper (58 ppm) in human body. The results showed that three dimensional composite scaffolds could be promising candidates for bone tissue engineering applications.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik hasarları ve travma, rezeksiyon (bir organ ya da vücut kısmının kesilerek çıkarılması) ya da olağan dışı sebeplerden meydana gelen hasarlar, tüm dünyada kemik doku yenilenmesinde önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır [1]. Travma, enfeksiyonlar, tümörler ya da genetik nedenlerden dolayı oluşan, özellikle büyük kemik hasarları klinik tedavi uzmanlarının üzerinde durduğu önemli bir konudur [2]. Kemik hasarlarının onarımı için otojen kemik greftleri (hastanın kendisinden alınan doku), allogreftler (donörden alınan doku) ya da metalik implantlar gibi güncel yaklaşımlar önemli sınırlamalarla karşı karşıyadır [1,3]. Tedavi için altın standart olan otoplastiklerin, sınırlı doku ulaşılabilirliği, artan tedavi süresi ve donörün hastalıklı olması gibi sebeplerle kullanımı sınırlanmaktadır. Kemik greftinde en yaygın kullanılan allogreftler ise yüksek maliyet, kemiğin iyileşmesinde kesin sonuç vermemesi, hastalık bulaşma riskinin artması ve kişinin bünyesinde istenmeyen bağışıklık sistemi tepkimelerine yol açması nedeniyle sıkıntı oluşturmaktadır [3].

Son yıllarda travma, kazalar ve yaşlanma nedeniyle zarar görmüş dokuların ve organların onarılması ve yenilenmesi için kemik doku mühendisliği umut vaat eden bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Bu yaklaşım ile, dokuların yaşam süresinin uzatılması ve organ nakline uygun hale getirilmesi sağlanmakta, deri ve kemik gibi dokular başarılı bir şekilde yenilenebilmektedir. Osteoporoz, 10 milyon insanı etkilemektedir ve 2020 yılında bu sayının 14 milyonun üzerine çıkması beklenmektedir. Kemik kırıklarını iyileştirmek, kemik boşluklarını doldurmak ve hasarları onarmak için dünya üzerinde yıllık yaklaşık 2.2 milyon kemik greft yamaları yapılmaktadır [4].

Doku mühendisliği, yeni dokunun yenilenmesinde yapay yapılar oluşturmak için malzeme mühendisliği ve yaşam bilimlerinden faydalanmaktadır [5]. En yaygın yaklaşım olarak, iyi tanımlanmış yapıya sahip bir yapı iskelesi, hücreler için geçici bir yapı sağlamakta ve istenen doku ya da organ içinde hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için öncülük etmektedir. Doku ya da organ yenilenmesi esnasında hücresel fonksiyonların düzenlenmesine yardımcı olmak için, büyüme faktörleri ve

diğer biyomoleküller yapı iskelesi içerisine yerleştirilebilmektedir. Doku mühendisliği esaslı yapı iskelesi ile istenen şekil ve boyutta yeni dokunun sentezlenmesinde, doku oluşturma hücreleri için geçici yapısal destek sağlanabilmekte ve böylece güncel yaklaşımlardaki sınırlamaların üstesinden gelinmektedir [6].

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında, biyomalzeme olarak çeşitli doğal ve sentetik malzemeler kullanılmaktadır. Biyoaktif camlar ve cam-seramikler, kemik oluşumunu artırma ve canlı vücuda yerleştirildiğinde kemik dokusunun etrafında güçlü bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı, kemik onarımı ve yenilenmesinde dikkat çeken biyomalzemelerdir. Biyoaktif malzemelerin genel özelliği, fizyolojik sıvı ile etkileşime girdiklerinde yüzeylerinde apatit benzeri tabaka oluşturmalarıdır [7]. Biyoaktif camlar, klasik ergitme ve sol-jel yöntemleriyle üretilmektedir [8]. Klasik ergitme yöntemi, basit ve kısa zaman alan bir yöntemdir.

Biyoaktif camların özellikleri kimyasal bileşimlerine bağlı olarak değişmektedir. Özellikle, özel elementlerin ya da iyonların biyoaktif camların yapısına katılmaları bu malzemelerin biyolojik ortamda daha fazla salım yapmasına yol açmakta ve böylece doku yenilenmesinin iyileştirilmesi için istenen biyolojik özellikler sağlanabilmektedir. Bakır (Cu^{+2}), stronsiyum (Sr^{+2}), magnezyum (Mg^{+2}), çinko (Zn^{+2}) ve gümüş (Ag^{+1}) gibi metalik iyonlar biyoaktif camların yapısına katılabilmektedir. Her bir element özel biyolojik etkiye sahiptir. Bu elementlerden bakır, doku yenilenmesi esnasında anjiyojenez (kan damarı oluşumunu artırma) özelliğinin geliştirilmesinde katkı sağlamaktadır [9].

Kemik doku mühendisliği için yapı iskelesi üretiminde polimerler ve biyoaktif seramikler birlikte kullanılırsa istenen fiziksel, biyolojik ve mekanik özelliklere sahip yapı iskeleleri üretilebilmektedir [10]. Son yıllarda, kemik onarımında yüksek biyoaktivite, biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerinden dolayı biyopolimer kaplı biyoaktif cam-seramik esaslı kompozit yapı iskeleleri geliştirilmektedir. Aljinat, biyobozunur ve Ca^{+2} gibi katyonlarla kolay jelleşebilir özelliğe sahip olduğu için hücre immobilizasyonu (sabitlenme) ve kaplanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [7].

Yapı iskelesi üretiminde sol-jel, polimer sünger kopyalama, polimer ile kaplama, çözücü döküm, çözücü döküm/tanecik uzaklaştırma ve mikroküre dolgulama,

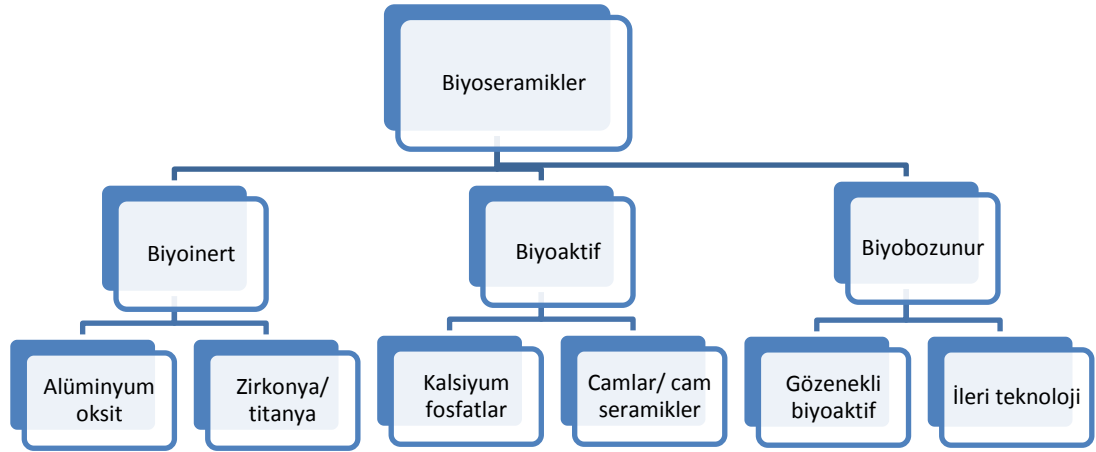
mikroküre sinterleme, ısı etkiyle faz ayrımı/dondurarak kurutma (TIPS), polimer sünger inorganik kaplama, katı serbest form (SFF) hızlı prototipleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında polimer sünger kopyalama yöntemi ayarlanabilir gözenek boyutuna sahip oldukça gözenekli süngerlerin üretimine olanak sağlayan basit ve kullanışlı bir yöntemdir [11].

Bu çalışmada, klasik ergitme yöntemi ile bileşiminde ağırlıkça %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %24.5 CaO olan 45S5 ve bileşiminde ağırlıkça %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %22.5 CaO ve %2 CuO olan biyoaktif camların üretimi gerçekleştirilmiştir. İki farklı bileşime sahip bu camlar kullanılarak, polimer sünger kopyalama yöntemi ile yapı iskeleleri üretilmiştir. Yapı iskeleleri farklı oranlarda (%1, 2, 3) aljinat ile kaplanmış ve 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerinin bir kısmına bakır çözeltisi damlatılarak aljinat ile bakırın çapraz bağlaması gerçekleştirilmiştir. Üretilen yapı iskelelerinin (aljinat ile kaplanan ve kaplanmayan) fiziksel ve yapısal özelliklerinin incelenmesi amacıyla çeşitli karakterizasyon işlemleri uygulanmıştır. Biyoaktif davranışlarının incelenmesi için de yapı iskeleleri farklı sürelerde yapay vücut sıvısı içerisinde bekletilmiştir.

2. BİYOAKTİF CAMLAR VE CAM SERAMİKLER

Biyomalzemeler, modern çağda insan sağlığını iyileştirmek ve yaşam kalitesini artırmak için vazgeçilmez bir unsur olarak gelişmektedir. Biyomalzemelerin uygulama alanları; gen dizilişi ve biyosensörler gibi tıbbi teşhislerden, kan torbaları ve cerrahi aletlerin temini gibi tıbbi uygulamalara, medikal implantlar ve cihazlar gibi tedavi edici uygulamalara, deri ve kıkırdak doku mühendisliği gibi yenileyici tıbbi uygulamalara kadar uzanmaktadır [12].

Biyomalzemeler genel olarak metaller, polimerler, seramikler olarak üç ana kategoride sınıflandırılmaktadır [12,13]. Biyolojik olarak kullanılan seramikler biyoseramikler olarak adlandırılır ve Şekil 2.1’ de görüldüğü gibi inert (absorbe olamayan), yarı inert (biyoaktif) ve biyolojik olarak absorbe olabilenler (biyobozunur) olarak üçe ayrılırlar [13].



Şekil 2.1 : Biyoinert, biyoaktif ve biyobozunur olarak sınıflandırılan biyoseramik çeşitleri [13].

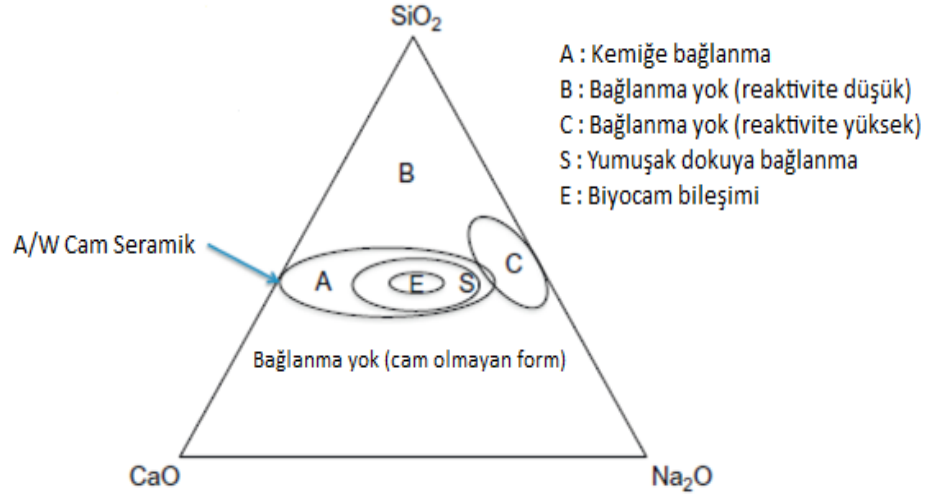
Biyoseramiklerin genel olarak sert ve kırılğan olmalarından dolayı yük taşıyıcı uygulamalarda kullanımları zordur. Ancak, basınç dayanımları yüksektir. Yüksek sıkışma ve aşınma direnci sayesinde diş restorasyonlarında ve bazı ortopedik uygulamalarda (örneğin yapay eklemlerin parçası olarak) yaygın olarak kullanılmaktadır. Toz halindeki seramikler, diş ve ortopedik uygulamalarda

polimerlerle bağlantılı olarak kemik boşluklarını doldurmak için kullanılmaktadır [14].

Genel olarak, özel biyolojik aktiviteye sahip bir maddenin oluşumunu destekleyen maddeler biyoaktif maddeler olarak tanımlanır. Daha dar anlamda ise biyoaktif maddeler, vücuda nakledildiğinde özel yüzey tepkimelerini gerçekleştirerek, sağlam bir bağ ile sert ve yumuşak doku oluşumundan sorumlu olan hidroksiapatit (HA) benzeri yüzey tabakasının oluşumuna yol açan maddelerdir. İn vitro (vücut dışında) yapay vücut sıvısı (SBF) içerisine konulduğunda HA benzeri tabaka oluşturma özelliğine sahip, biyoaktivitenin bir göstergesidir [6].

Biyoaktif silika camlar ve cam seramikler, in vivo (vücut içinde) kemik oluşumunu artırma ve kemik dokusu yüzeyine güçlü bağlanma özellikleri ile kemik onarımı ve yenilenmesinde ilgi çeken biyomalzemelerdir [7]. 1969 yılında Hench tarafından keşfedilmiş olan biyoaktif cam, vücudun doğal yapısında bulunan silisyum, kalsiyum, sodyum, magnezyum ve fosfor ihtiva eden sentetik minerallerden oluşan çok bileşenli bir inorganik bileşik olarak tanımlanmaktadır [15,16]. Biyoaktif camlar, kemiğe ve diğer dokulara bağlanma özelliği ile mükemmel biyouyumluluğa sahiptirler [17]. Adayüzey ve hücre-aracılı tepkimeler sayesinde, biyoaktif cam bir kalsiyum boşluğu oluşturur ve oluşan karbonatlı fosfat yüzey tabakası alıcı kemiğe kimyasal olarak bağlanmayı sağlar. Bu kemiğe bağlanma davranışı biyoaktivite olarak bilinir ve vücut sıvısına yerleştirildiğinde cam yüzeyinde hidroksikarbonat apatit (HCA) oluşumu ile ilişkilendirilir [5].

Biyoaktif cam ve bazı cam seramiklerin biyoaktiviteleri, içerdikleri SiO_2 miktarına bağlıdır. Yoğun araştırmalar sonucunda saptanmış olan ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan biyoaktif cam formülasyonu genel olarak 45S5 olarak bilinmektedir. 45S5 camı, %45 SiO_2 , %24.5 Na_2O , %24.5 CaO ve %6 P_2O_5 içermektedir. Biyoaktif cam, yüksek reaktif yüzey oluşumuna neden olan, %60'dan az SiO_2 ; yüksek Na_2O ve CaO ; ve yüksek $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ oranı olmak üzere üç ana bileşimsel özelliğe sahiptir. Şekil 2.2, üçlü Na_2O - CaO - SiO_2 diyagramı ile camın biyoaktivitesinin bileşime bağlılığını göstermektedir [16,18].



Şekil 2.2 : Kemik bağlanması için bileşimsel diyagram [16].

Biyoaktif camların ve cam seramiklerin kemiğe bağlanabilirliğini gösteren bileşimsel aralık altı bölgeye ayrılmıştır (A-E ve S). En yüksek biyoaktiviteye ve kemiğe hızlı bağ yapma özelliğine sahip camlar Na₂O-CaO-SiO₂ diyagramının tam merkezinde bulunmaktadır (E bölgesi). A bölgesi ağırlıkça %45-52 SiO₂ ve sabit %6 P₂O₅ bileşiminden oluşurken, A-W (Apatit-Wollastonit) cam seramiği daha yüksek P₂O₅ içeriğine sahiptir. A bölgesinde, bütün bileşimlerin kemiğe bağlanabilirlik ve biyoaktiviteleri oldukça yüksektir [16]. Bu bölgedeki biyoaktif camlar, osteoüretken (artan osteoblast aktivitesi dolayısıyla malzeme yüzeyinde yeni kemik oluşumunu sağlama) ve osteokondüktiftirler [16]. Daha geniş A bölgesinin içerisinde kalan E bölgesindeki camlar, hem yumuşak hem de sert dokulara bağlanabilmektedir. %60'dan daha fazla SiO₂ içeriğine sahip B bölgesindeki camlar, kemiğe daha yavaş bağlanarak biyoinert davranış göstermektedir [16]. Bu bölgedeki biyoaktif camlar yalnızca osteokondüktif özelliğe sahiptirler. C bölgesindeki biyoaktif camlar ise, doku içinde 10-30 gün içerisinde geri emilmektedir [5,16].

Biyoaktif camların yapı iskelesi malzemesi olarak kullanımını sağlayan önemli bir neden, bir dizi kimyasal özelliklerin kontrol edilebilmesi ve böylece biyobozunma hızının kontrolünün sağlanmasıdır. Bununla birlikte, biyoaktif camların kristalizasyonu biyoaktiviteyi düşürmektedir ve hatta biyoaktif camın inert bir maddeye dönüşmesine neden olmaktadır. Bu da, sinterleme ile yoğunlaştırma öncesinde tamamen kristalizasyon meydana geldiği için biyoaktif camın yapı iskelesi olarak kullanımını sınırlayan bir dezavantajdır ve gerekli olan mekanik

stabiliteye sahip bir yapı iskelesi desteğini yoğunlaştırmak için daha geniş sinterleme gerektirmektedir [5,17].

2.1 Biyoaktif Camların Özellikleri

2.1.1 Mekanik özellikler

Biyoaktif camların amorf yapısı, fizyolojik çözelti içerisindeki iyon dağılımı ve sıralı biyoaktivite tepkimelerinin gerçekleşmesini kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, özellikle gözenekli yapıda, malzemenin mekanik dayanımını zayıflatmakta ve kırılma tokluğunu düşürmektedir. Bu nedenle, yük taşıyıcı uygulamalarda biyoaktif camların kullanımları sınırlıdır [5, 16]. Çizelge 2.1 yoğun ve gözenekli biyoaktif seramiklerin basınç dayanımı, elastik modülü ve bazı kırılma tokluğu değerlerini göstermektedir. Doku mühendisliği için, gözenekli yapı iskelelerinin, kortikal ve trabeküler kemikle kıyaslandığında daha düşük mekanik özellikler gösterdiği görülmektedir. Biyoaktif cam seramik malzemeler, amorf cam ve kalsiyum fosfat seramiklerden daha iyi mekanik özelliklere sahiptirler [5].

Çizelge 2.1 : Yoğun ve gözenekli hidroksiapatit, 45S5 Biyocam[®], A/W cam seramik ve insan kortikal kemiğinin mekanik özellikleri [5].

Seramikler	Basma dayanımı (MPa)	Gerilme dayanımı (MPa)	Elastisite modülü (GPa)	Kırılma tokluğu (MPa/√m)
Hidroksiapatit(HA)	>400	~40	~100	~1.0
45S5 Biyocam [®]	~500	42	35	0.5-1
Cam-seramik A/W	1080	215	118	2.0
Gözenekli biyoaktif cam 70S30C (%82)	2.25	-	-	-
Gözenekli Biyocam [®] cam seramik (>%90)	0.2-0.4	-	-	-
Gözenekli HA (%82-86)	0.21-0.41	-	0.83-1.6× 10 ⁻³	-
Kortikal kemik	130-180	50-151	12-18	6-8
Süngerimsi kemik	4-12	-	0.1-0.5	-

2.1.2 Yüzey reaksiyonları ve doku bağlanması

Biyoaktif camın kemiğe bağlanması, fizyolojik sıvı ile etkileştiğinde camın yüzeyinde HCA tabakasının oluşumu ile meydana gelmektedir. HCA yapısı kemik mineraline benzediğinden, kemik ile bağ oluşturma kabiliyetine sahiptir [19]. HCA

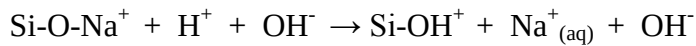
tabakasının oluşumu, biyoaktif camın fizyolojik sıvıya maruz kaldığında, yüzeyinde gerçekleşen bir dizi tepkimeler ile meydana gelmektedir [18, 19]. Camın kemiğe tamamen bağlanması Şekil 2.3’ de özetlenen 11 tepkime ile gerçekleşmektedir [20].

<u>Artan zaman</u>	<u>Aşama</u>	<u>Tepkime</u>
	11	Matrisin kristallenmesi
	10	Matrisin oluşumu
	9	Gövde hücrelerinin değişimi
	8	Gövde hücrelerinin bağlanması
	7	Makrofajların hareketi
	6	Biyolojik taneciklerin tutulması
	5	Kalsiyum fosfatın HCA’ya çekirdeklenmesi ve kristallenmesi
	4	Amorf kalsiyum fosfatın çökmesi
	3	Yüzeydeki silikanın çözünmesi
	1-2	SiOH bağlarının oluşumu
log t	0	Biyoaktif cam

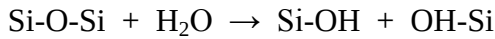
Şekil 2.3 : Doku ve biyoaktif camlar arasında kemik oluşumunu içeren ara yüzey tepkimeleri [20].

Çözünür iyonik maddelerin hızlıca dağılımına neden olan ilk beş reaksiyon ile cam yüzeyinde hidroksikarbonat apatit (HCA) tabakası oluşmaktadır [18, 19]. Bu reaksiyonlar aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır [16, 18, 19, 21].

- 1. Aşama : Na^+ ve Ca^+ iyonlarının sulu çözeltiden H^+ ya da H_3O^+ ile hızlıca yer değiştirmesi, silanollerin (Si-OH) oluşumunu sağlayan silika gruplarının hidrolizine neden olurlar.



- 2. Aşama : 1. aşama çözeltinin hidroksil derişiminin artmasını sağlayarak silika cam ağının harekete geçmesine neden olur. Si-O-Si bağlarının yıkılmasıyla, çözünebilir silika çözeltide $\text{Si}(\text{OH})_4$ oluşturur ve çözelti ara yüzeyinde Si-OH (silanoller) oluşumu devam eder.



- 3. Aşama : Tükenmiş alkali ve toprak alkali katyonların yüzeyinde zengin SiO_2 tabakasının yoğunlaşması ve yeniden polimerizasyonu gerçekleşir.
- 4. Aşama : Ca^{+2} ve PO_4^{-3} grupları silika açısından zengin tabakaya geçiş yaparlar ve bu tabakanın üst kısmında $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ açısından zengin bir film

oluştururlar. Sıvıdan çözünebilir kalsiyum ve fosfatların katılması ile amorf yapıdaki $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ açısından zengin filmin büyümesi sağlanır.

- 5. Aşama : Sıvıdan yapıya OH^- ve CO_3^{2-} anyonlarının katılması ile amorf $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ filminin kristallenmesi sonucu hidroksikarbonat apatit (HCA) tabakası oluşur.

5. aşama'da oluşan bu apatit benzeri tabaka, insan kemiğinin inorganik bileşeni ile benzer özellik göstermektedir. Arayüz adhezyonu ve biyo-implant ile doğal kemik arasında bağların oluşumuna öncü olmaktadır [22].

Yüzeyde HCA tabakasının oluşumundan sonra, dokuya bağlanma prosesleri meydana gelmektedir (6-11. aşama). Tepkime aşamaları ($\text{SiO}_2 - \text{HCA}$ tabakası), büyüme faktörleri gibi biyolojik kısımların adsorpsiyonunu artırmakta (6. Aşama), implant bölgesini doku onarımına hazırlamak için makrofajların hareketini (7. Aşama), ve bağlanmasını (8. aşama), kök hücrelerin çoğalma ve ayrılma sürelerini (9. aşama) etkilemektedir. Bunları takiben, matris oluşumu (10. aşama) ve matrisin mineralizasyonu (11. aşama) gerçekleşmektedir. Vücut içi ve vücut dışında 6-12 günde gerçekleşen bu aşamalardan sonra, son ürün olarak kolajen-HCA matrisi ile kaplı olgun kemik hücreleri elde edilmektedir [16].

2.2 Biyoaktif Cam Üretim Yöntemleri

Biyoaktif camlar klasik ergitme yöntemiyle ya da sol jel tekniği ile üretilirler [8].

2.2.1 Klasik ergitme yöntemi

Biyoaktif camlar genellikle klasik cam üretme yöntemleri ile üretilmesine rağmen, biyomedikal uygulamalarda kullanımları için bazı sınırlandırmalar vardır. Bu sınırlandırmaları önleyerek yüksek ve istenen saflıkta cam üretimi amaçlanmaktadır [16]. Ergitme prosesinde, uygun miktardaki SiO_2 , CaCO_3 , Na_2CO_3 ve P_2O_5 gibi başlangıç hammaddeleri karıştırılarak homojen hale getirilir ve 1573-1723 K aralığında ergitilirler [16, 19]. Camın kirlenmesini önlemek için platin potalar kullanılır [19]. Ergitilen karışım daha sonra suya dökülerek biyocam parçacıkları elde edilir. Oluşan biyocam parçacıkları kurutulduktan sonra öğütülerek istenen tanecik boyutuna getirilir [19]. Ergitme sıcaklığı, hazırlanan cam bileşimine bağlıdır. Yüksek silika ve kalsiyum oksit içeriği daha yüksek ergitme sıcaklığı gerektirir [16].

2.2.2 Sol-jel yöntemi

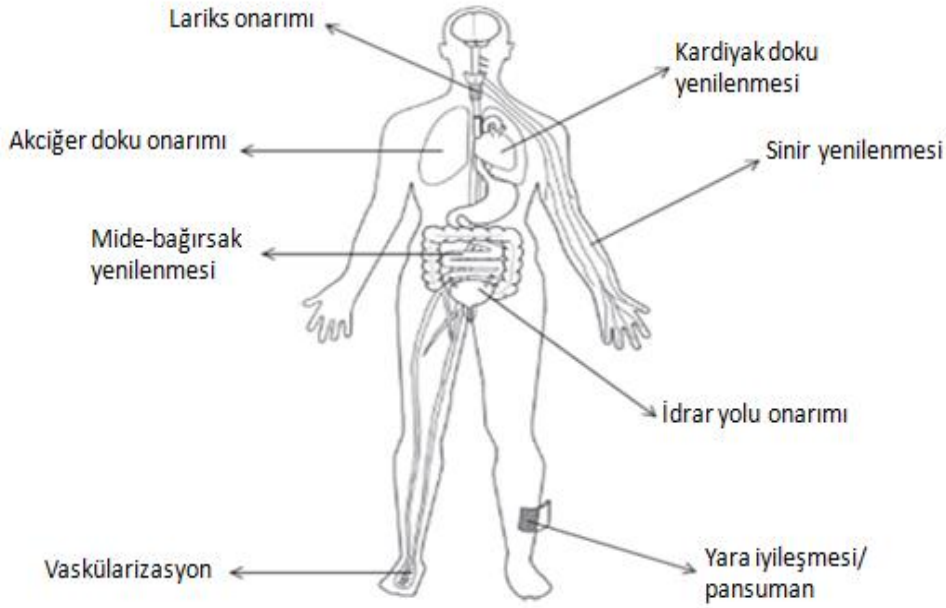
Sol-jel prosesi, biyomedikal ve diğer uygulamalar için çok çeşitli malzemelerin üretiminde kullanılan başarılı bir yöntemdir [23]. Bu proseste düşük sıcaklıkta tetraetil ortosilikat (TEOS), kalsiyum ve fosforlu alkoksitlerin hidrolizi ve yoğunlaşması ile sol adı verilen kolloidal tanecikler oluşur. Yoğunlaşma ve polimerleşme tepkimelerinden sonra, kolloidal tanecikler (sol) jelleşmeye başlar [18]. Silanol gruplarının polikondenzasyonu (Si-OH) ile silikat (-Si-O-Si-) ağı oluşur. Ağın bağlanabilirliği arttıkça, viskozite de artarak jel biçimlenir. Daha sonra oluşan jel kurutulur ve 873-1073 K'de ısıl proses (sinterleme) ile stabil hale getirilir [8]. Optimum biyoaktiviteyi sağlamak için yüksek saflıkta maddelerin kullanılması gerekmektedir. Düşük sıcaklıkta, yüksek silika ve düşük alkali içeriği ile gerçekleşen sol jel prosesi, maddelerin gerekli olan saflıkta elde edilmesine imkan sağlamaktadır. Polimerizasyondan önce çözeltinin homojenleşmesi sağlanmakta ve böylece elde edilen son camın heterojenliği düşmektedir [18].

Ergitme yöntemi ile üretilen camlar gibi, jel camlarda da SiO₂ içeriğinin artması biyoaktiviteyi düşürmektedir. Bununla birlikte, ergitme yönteminde biyoaktivite bileşimsel aralıkla sınırlıdır ve SiO₂ içeriğinin %60 (molar)'dan az olması gerekir. Sol jel yönteminde ise bu aralık daha geniştir ve SiO₂ içeriği %90 (molar)'ın üzerine çıkabilmektedir [18].

2.3 Biyoaktif Camların Kullanım Alanları

Çok çeşitli camlar ve cam-seramikler yaklaşık 40 yıldır diş ve ortopedik alanlarda kullanılmaktadır. Pazarlama amaçlı kullanılan ilk cihaz, katı parçacık formundaki Biyocam[®]'dan üretilmiştir. Çok çeşitli klinik problemlerin tedavisi için Biyocam[®] kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Yumuşak doku bağlanma özelliğine sahip olan Biyocam[®]'ın özel bir uygulama alanı orta kulak protezidir. Ayrıca, göz çukurlarının onarımı için biyoaktif cam kullanımı üzerinde çalışılmaktadır. [16].

Geniş kullanım alanına sahip olan biyoaktif camlar, anjiyojenez, yara iyileşmesi, hemostaz (kanama kontrolü) ve sinir, kardiyak, akciğer, bağırsaklar gibi yumuşak dokuların yenilenmesinde kullanılmaktadır (Şekil 2.4) [24].



Şekil 2.4 : Yumuşak doku yenilenmesinde biyoaktif cam uygulamaları [24].

2.4 Bakır Katkılı Biyoaktif Camlar

Kan damarları, yeni oluşmuş dokuların besin ve oksijen almasında bir yol sağlamaktadır. Aynı zamanda, kemik gelişimi ve yaraların onarılmasında da özel bir öneme sahiptir. Bu nedenle, anjiyogenez doku mühendisliği için kritik bir önem taşımaktadır. Doku mühendisliğinde anjiyogenez uyararak için en iyi bilinen yaklaşım, biyobozunur yapı iskelelerinden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) dağıtımı gibi büyüme faktörleri ve/veya hücrelerin dağıtımıdır. Bununla birlikte, klinik uygulamalarda yüksek fiyat ve potansiyel yan etkilerinden dolayı büyüme faktörlerinin ve/veya hücrelerin kullanımı sınırlıdır [25].

Son yıllarda anjiyogenez uyarda, büyüme faktörleri ve genetik mühendisliği yaklaşımlarına oranla maliyetin azaltılması ve biyolojik yan etkilerin ortadan kaldırılması için biyomalzemelerden üretilmiş yapı iskelelerinden salınan inorganik iyonlar büyük ilgi görmektedir. Birçok çalışma, Cu^{+2} iyonlarının anjiyogenez uyarıcı özelliğinin bulunduğunu göstermiştir. Cu^{+2} , in vitro kültüründe endotelial büyüme faktörlerinin çoğalmasını sağlamaktadır. Ayrıca, Cu^{+2} osteoblastik hücrelerin farklılaşmasının artmasında osteojenik etki göstermektedir [25].

Zhao ve Ç.A., CuO (ağırlıkça %0-3) katkı borat biyoaktif cam mikrofibrlerini (çap=0.4-12 μm ; molar bileşimi % 6 Na_2O , %8 K_2O , %8 MgO , %22 CaO , %54

B₂O₃, %2 P₂O) klasik ergitme yöntemiyle sentezlemişler, in vitro ve in vivo değerlendirmesini yapmışlardır. SBF çözeltisine konulan fiberler ortamda Ca⁺², B⁺³ ve Cu⁺² iyon salımlarını gerçekleştirerek 7 günde bozunmuş ve hidroksiapatite dönüşmüştür. İn vitro hücre kültürü çalışmalarında, fiberlerin iyonik çözünme ürünlerinin HUVECs (insan göbek bağı damar hücreleri) göçü, borucuk oluşumu, VEGF salgılanmasını ve fibroblastların anjiyojenik bağlantılı genlerinin uyarılmasını desteklediği ve HUVECs ile fibroblastlarda toksik bir etkiye yol açmadığı görülmüştür. Kemirgenlerde 7 ve 14 günlük cerrahi uygulama sonrasında, tam kalınlıktaki deri kusurlarını tedavi etmek için kullanıldıklarında, Cu⁺² katkılı (ağırlıkça %3 CuO) fiberlerin anjiyojenezi uyarma kapasitesinin katkısız fiberlere ve onarılmamış yaralara (kontrol) göre belirgin oranda daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Cu⁺² katkılı ve katkısız fiberlerle onarılan yaralarda, onarılmayan yaralara göre kolajen birikimi, olgunluğu ve uyumu iyileştirilmiştir. Sonuçlar, bakır katkılı borat biyoaktif cam mikrofiberlerinin yara pansumanları için umut veren adaylar olduğunu göstermiştir [26].

Goh ve Ç.A., %50 SiO₂-%45 CaO-%5 P₂O₅ esaslı molce %1, 5 ve 10 CuO ya da Ag₂O katkılı biyoaktif camları hızlı alkali sol-jel metodu ile sentezlemişlerdir. Fourier kızıl ötesi dönüşüm spektroskopisi (FTIR) sonuçlarında, silisyum ve fosfor gruplarına ait karakteristik pikler görülmüş ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri, biyoaktif camların nano-yapısını doğrulamıştır. Ön ısıtma (973 K) yapılmış Ag⁺¹ katkılı örneklerin X-Işını Difraktometresi (XRD) sonuçlarında, metalik gümüş fazının kristal pikleri gözlemlenmiştir. Yine ön ısıtma (973 K) yapılmış Cu⁺² katkılı örneğin ve kontrol numunesinin (%50 SiO₂ - %45 CaO - %5 P₂O₅) XRD sonuçlarında amorf yapı görülmüştür. Alevli Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi (FAAS) ile numunelerin iyon salımları incelenmiştir. Ag⁺¹ iyonlarının hızlı salımı, Ag⁺¹ katkılı biyoaktif camın hızlı bakteri öldürme ajanı olarak, Cu⁺² katkılı biyoaktif camdan daha iyi olduğunu göstermiştir. İyon salımı daha uzun süren Cu⁺² katkılı biyoaktif camın, uzun süreli antibakteriyel özellik gerektiren durumlarda potansiyel aday olabileceği sonucuna varılmıştır. Biyoaktif cama Cu⁺² ve Ag⁺¹ katılması ile biyoaktivitenin iyi sonuç vermesi, bu camların kemik yenilenmesinde potansiyel adaylar olduğunu kanıtlamıştır [27].

Aina ve Ç.A., bakır salımı gerçekleştiren sistemlerin kimyasal, morfolojik ve biyoaktivite özelliklerini araştırmak için iki farklı oranda Cu⁺² içeren biyoaktif cam

hazırlamışlar ve karakterizasyon işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Molar bileşimi %15 CaO - %5 P₂O₅ - %80 SiO₂ - xCuO (x=0 ve 1) olan iki farklı biyoaktif camın üretiminde sol-jel yöntemini uygulamışlardır. Karakterizasyon işlemleri, değişen sentezleme yöntemleri ile bakır içeren sistemlerin iki farklı oksitleme ve bir araya getirme aşamasında olabileceğini göstermiştir : (i) cam ağı matrisinde homojen olarak yayılan SGCu(ox) (oksitlenmiş Cu (Cu oksidasyon durumu +2)) ve (ii) cam yüzeyinde ağırlıklı olarak nano-partikül içeren (5 - 130 nm) SGCu(red) (metalik Cu – (Cu oksidasyon durumu 0)). Referans olarak alınan (Cu⁺² içermeyen) cam ile kıyaslandığında Cu⁺² katkısı, camın yüzeyinde hidroksiapatit/hidroksi karbonat apatit (HA/HCA) oluşumunu kısmen geciktirmiş, biyoaktivitesini ise hemen hemen hiç değiştirmemiştir. Biyoaktivite analizlerinde, bakırın her iki camda da salım gerçekleştirdiği görülmüştür [28].

3. BİYOPOLİMERLER

Polimerler, doku mühendisliği uygulamalarında yapı iskelesi üretimi için birincil malzemelerdir ve bu alanda çok çeşitli biyobozunur polimerik malzemeler kullanılmaktadır [29]. Biyopolimerler ise, yenilenebilir kaynaklardan oluşan çevreye zararı olmayan polimerik malzemelerdir [30].

Doku mühendisliği; hasarlı bölgeye implant edilebilen, üç boyutlu ağlara yerleştirildiğinde rejeneratif potansiyele sahip yapı iskelelerine ihtiyaç duymaktadır. Doku mühendisliği uygulamaları için, çeşitli sentetik ve diğer biyopolimerler yapı iskelesi üretimi için kullanılmaktadır. Biyopolimerler, biyobozunur olmaları ve doğal ekstrasellüler (hücre dışı) bileşenlere benzer yapısal gruplar içermelerinden dolayı avantajlıdır [31].

Biyobozunur polimerler iki sınıfa ayrılırlar : (1) polisakkaritleri (nişasta, aljinat, kitin/kitosan, hiyalüronik asit türevleri) ya da proteinleri (soya, kolajen, fibrin jeller, ipek) içeren doğal esaslı malzemeler; (2) poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA), poli (ϵ -kaprolakton) (PCL), poli (hidroksi bütirat) (PHB) gibi sentetik polimerlerdir [29, 30].

3.1 Doğal Biyopolimerler

Doğal polimerler, klinik olarak kullanılan ilk biyobozunur biyomalzemeler olarak görülmektedir [32]. Hücre adhezyonu ve işlevini olumlu olarak etkiledikleri için avantajlıdır. Bununla birlikte, mekanik özellikleri zayıftır. Birçoğunun temin edilmesi zordur ve bu nedenle de maliyetleri yüksektir [29].

3.1.1 Nişasta

Nişasta, birçok bitkide enerji depolayan baskın bileşendir. Granül formunda, kök ve yumrular gibi organlarda bulunmaktadır. En önemli nişasta kaynağı mısır olmakla birlikte buğday, patates, tapyoka ve pirinç de sıklıkla kullanılmaktadır [33].

Doğal nişastanın yapısı ve bileşimi botanik kaynağa göre değişmektedir. Ancak, bütün granüller amiloz ve amilopektin olmak üzere iki çeşit α -glukan polimerlerinden oluşmaktadır [30]. Bu iki doğal bileşenin derişimleri, nişastanın malzeme özelliklerini büyük ölçüde etkilemektedir. Sonuç olarak, farklı amiloz ve amilopektin bileşimine sahip yüzlerce nişasta ortaya çıkmaktadır [34].

İnsan bağırsağında bulunan enzimler nişastayı sindirebilmesine rağmen, insan dokusuna hazır olarak implant edilen nişasta biyobozunur özellik göstermemektedir. İnsanlarda, hücresel enerji depolama polimeri nişasta değil glikojendir. Sonuç olarak, nişasta biyomedikal uygulamalar için uygun bir seçim değildir. Bununla birlikte, bazı nişasta esaslı polimerler insan dokusunda biyobozunur ve biyoyumludur. Birçok uygulama arasında, nişasta esaslı polimerler kırıkta yenilenmesinde yapı iskelesi hazırlamak için kullanılmaktadır [34].

3.1.2 Kitosan

Kitosan, insan vücudu ile mükemmel biyoyumluluğa sahip olmasından dolayı, kemik doku mühendisliğinde kullanılan en iyi biyoaktif biyomalzemeler arasındadır [35].

Kitosan, kitinin en az %50 oranında asetillenmesi ve seyreltik asitte çözünür hale gelmesiyle oluşan biyosentetik bir polisakkarittir [34, 36]. Kitin, kabuklu dış iskeletten elde edilen veya mantar fermentasyon süreçleri ile üretilen, doğal bir polisakkarittir [34].

Kitosan; biyoyumluluğu, yüksek yük yoğunluğu, zehirli olmaması ve mukozaya yapışma özelliklerinden dolayı ilaç ve kozmetik uygulamaları için yüksek potansiyele sahiptir. Son zamanlarda uygulama alanı tıp, atık su arıtımı, biyomembranlar ve hidrojel geliştirmeye kadar genişlediği için daha çok dikkat çekmektedir [36]. Hücre büyümesi için uygun olması ve osteokondüksiyon özelliklerinden dolayı, biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, antimikrobiyal özelliklere sahip olmasından dolayı bakteriyel enfeksiyona karşı oldukça duyarlı olan süngerimsi kemik doku yenilenmesi için yapı iskelesi tasarımında uygun bir polimerdir [35].

3.1.3 Kolajen

Kolajen; yapısal ve mekanik destek sağlayan, hayvanlarda en bol bulunan proteindir [36]. İnsan vücudundaki proteinlerin yaklaşık %30'unu kolajen oluşturmaktadır. Güç ve esneklik gerektiren bütün ana dokularda bulunmaktadır [34]. Moleküler şeritleri oluşturarak tendonları ve geniş esnek katmanları güçlendirip doku ve iç organlara destek olan önemli bir yapısal proteindir. Kemik ve dişler, özellikle hidroksiapatit mineral kristallerinin eklenmesiyle kolajenden oluşturulmaktadır. Kolajen, bütün hayvan organlarında yumuşak dokuların korunması, desteklenmesi ve iskelete bağlanmasını sağlayan yapıyı oluşturmaktadır [36].

Kolajen ailesinin genetik olarak 20 farklı üyesi bulunmaktadır. En önemlileri tip I (deri, tendon ve kemik), tip II (kıkırdak) ve tip III (deri ve damar) olan fibril oluşturucu kolajenlerdir. Bu kolajen tipleri, dokunun yapı ve bütünlüğünün önemli bir kısmını oluşturan fibriler yapıların bir parçası olarak bulunabilirler. Kolajenin her bir zinciri 1000 amino asit içermektedir [36]. Bol miktarda bulunması ve eşsiz fiziksel ve biyolojik özelliklerinden dolayı tip I kolajeni biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [34].

3.1.4 Fibrin

Fibrin, trombin ile çapraz bağlanmış fibrinojenin fibrine dönüşmesinden oluşan ve kanın pıhtılaşmasında rol oynayan doğal bir biyopolimerdir [37].

Fibrin, başarılı bir doku yenilenmesi için gerekli olan birçok önemli biyolojik özelliği ve biyoyumlu bir fiziksel yapı oluşumunu sağlamaktadır. Dolayısıyla hücreler veya biyoaktif moleküller için bir taşıma sistemi olarak kullanılmasının yanında, biyoyumlu bir matris olarak da kullanılabilir. Fibrin matrisleri, birçok doku mühendisliği uygulamasında yapı iskelesinin hücre oluşumu için kritik bir problem olan, yapı iskelesindeki maddeleri ve hücrelerin homojen dağılımını sağlamaktadır. Başlangıç matrisi olarak fibrin kullanılan doku mühendisliği uygulamalarından bazıları vasküler greftler ve kardiyovasküler doku, kemik ve kıkırdak yenilenmesidir [37].

3.1.5 Hiyolüranik asit

Hiyolüranik asit vücudun birçok bölgesindeki ekstrasellüler dokusunda bulunan bir glikozaminoglikandır. Biyomalzeme biliminde önemi gittikçe artmaktadır ve doku

kültürü yapı iskelelerinden kozmetik malzemelere kadar değişen çok çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Çözelti içinde ya da hidrojel formunda sahip olduğu fiziksel ve biyokimyasal özellikleri ile doku onarımı uygulamalarında oldukça yüksek oranda ilgi çekmektedir [38].

3.1.6 Elastin

Elastin, ekstrasellüler bir matris proteindir ve kan damarları (kuru ağırlığın %50'si), elastik bağlar (kuru ağırlığın %70'i), akciğer (kuru ağırlığın %30'u) ve deri (kuru ağırlığın %24'ü) gibi elastikliğin önemli olduğu dokularda bol miktarda bulunmaktadır [34].

3.1.7 Jelatin

Jelatin, kolajenin kısmi bir türevidir ve hücre bağlanması, göçü, farklılaşması ve çoğalmasını desteklemek için kitosan, β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) ve HA gibi diğer malzemeler ile karıştırılarak kompozit şeklinde işlenmektedir. Hücre adhezyonunu destekleyen glisin, prolin ve hidroksiprolin gibi benzersiz sıralı amino bileşenlerinden oluşmaktadır. Jelatin derişiminin yapı iskelesi özelliklerini etkilediği bilinmektedir [31]. Fizyolojik ortamda biyobozunur ve biyouyumlu özelliklere sahip olmasından dolayı genellikle ilaç ve tıp uygulamalarında kullanılmaktadır [34].

3.1.8 Aljinat

Aljinat, β -(1-4) bağlı D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asit birim dizisinden oluşan yosunlarda bulunan doğal bir anyonik polisakkarittir. Aljinat, polimer zinciri boyunca sıralı olarak mannuronik asit, guluronik asit birimlerine zengin ve her iki monomerin eşit dağılım gösterdiği bölümlerden oluşmaktadır [34].

Aljinat, bir dizi karşılaştırmalı çalışmaların uygulanmasına imkan tanıyan iyi karakterize edilmiş bir yapıya sahiptir. Hücreler kolayca bağlanmazlar ve aljinat hidrojelleri üzerinde veya içerisinde büyürler. Yapısı değiştirilmemiş birçok polisakkarit için bu ortak bir özelliktir. Bununla birlikte, guluronik asit kalıntıları içindeki karboksilik gruplar, aljinatın kimyasal yapısının değişimi için kolay bir yol sağlamaktadır. Bu özellik sayesinde, biyolojik olarak aktif ligandlar aljinat omurgaya bağlanabilmektedir [34].

Aljinat, kolayca jelleşebilme, düşük zehirlilik etkisi ve kolayca bulunabilme özelliklerinden dolayı hücre kapsülleme ve ilaç salımı uygulamalarında kullanılmaktadır. İyonik olarak çapraz bağlanmış jellerin çapraz bağlama yoğunluğu, mekanik özellikleri ve gözenek boyutu, zincirlerinin molekül ağırlığı değiştirilerek kontrol edilebilmektedir [38].

Aljinatın en önemli dezavantajı, son üretilen malzemede mitojenik, sitotoksik ve apoptoz indükleyici safsızlıkların oluşumuna neden olan kirlenmiş deniz yosunundan ayırma zorluğudur. Böyle moleküller, ileri saflaştırma işlemleri ile uzaklaştırılabilmelerine rağmen, bu işlem zaman alıcı ve pahalı bir prosestir [34].

3.2 Sentetik Biyopolimerler

Sentetik polimerler nispeten daha iyi mekanik özelliklere sahiptir. Şekilleri ve bozunma hızları kolayca değiştirilebilmektedir. Bununla birlikte, yüzeyleri hidrofobik özelliğe sahiptir ve hücre tanıma sinyalleri zayıftır [29].

Sentetik biyobozunur polimerler, özel uygulama alanına bağlı olarak mekanik özellikleri ve bozunma hızları kontrol edilebildiği için, klinik ve cerrahi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu polimerler hücre adhezyonu, göçü, çoğalması ve farklılaşmasını sağlama özelliklerinden dolayı, doku mühendisliği uygulamalarında dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, sentetik polimerlerden üretilen yapı iskelelerinin yeterli mekanik özellik ve biyoaktifliği gösterememeleri kemik doku mühendisliği uygulamalarında bir dezavantajdır. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında polimer yapı iskelelerinin özelliklerini ve performansını geliştirmek için biyobozunur polimer/biyoaktif seramik kompozit üretimi dikkat çekmektedir [39].

3.2.1 Doygun Alifatik Poliesterler

Poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerlerini içeren poli- α -hidroksi esterler, doku mühendisliğinde 3 boyutlu yapı iskeleleri için en çok yararlanılan biyobozunur sentetik polimerlerdir. PLA, L-PLA (PLLA), D-PLA (PDLA) ve D,L-PLA (PDLLA) olmak üzere üç farklı yapıda bulunabilmektedir [5].

Bu polimerler, kimyasal özellikleri sayesinde de-esterifikasyon yoluyla hidrolitik bozunmaya uğramaktadırlar. Bu bozunma ile her bir polimerin monomerik bileşeni doğal yollarla ortadan kaldırılmaktadır. Vücut, laktik ve glikolik asitlerin monomerik bileşenlerini tamamıyla ortadan kaldırmak için oldukça düzenli bir mekanizmaya sahiptir. PGA, metabolitlere dönüştürülür ya da diğer mekanizmalarla yok edilir. PLA ise trikarboksilit asit döngüsü ile temizlenir. Bu özelliklerinden dolayı PLA ve PGA, US FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onaylanmış olan bozunur ameliyat iplikleri gibi ürünler ve cihazlarda kullanılmaktadır. Bu iki polimer, kolaylıkla işlenebilmekte ve bozunma hızları ile fiziksel ve mekanik özellikleri, değişik molekül ağırlıkları ve kopolimerler kullanılarak geniş oranda ayarlanabilmektedir. Bununla birlikte, bu polimerler erozyona uğrayarak yapı iskelelerinin erkenden bozunmasına neden olabilmektedir. Ayrıca, bu asidik bozunma ürünlerinin ani salımı, kuvvetli bir inflamatuvar (iltihaplı) cavaba yol açmaktadır [5].

Genel olarak PGA'nın bozunma hızı, PLA'dan daha yüksektir. Bozunma hızı sırası $PGA > PDLLA > PLLA > PCL$ (poli(ϵ -kaprolakton) $\sim$ PPF şeklindedir [5, 30]. Biyobozunur poliesterlerin bozunması, su ile ester bağlarının hidrolizinden sonra meydana gelmektedir. Bozunma kinetiğini, kimyasal bileşim, konfigürasyonel yapı, üretim geçmişi, mol ağırlığı, çevresel koşullar, gerilme ve şekil değiştirme, kristallik, kimyasal olarak reaktif bileşenlerin matrisdeki dağılımı, katkı maddeleri, orijinal monomerlerin varlığı gibi birçok faktör etkilemektedir [5].

3.2.2 Polipropilen fumarat (PPF)

Poli(propilen fumarat) (PPF) doymamış doğrusal bir poliesterdir. PPF, kimyasal olarak modifiye edilebilir ve çok çeşitli bozunma özelliğine sahip polimerlerle çapraz bağlanabilir. Bozunması, diğer poliesterler gibi, ester bağlarının hidrolizi ile gerçekleşir ve bozunma ürünleri (fumarik asit ve polipropilen glikol) zehirli değildir; insan vücudu tarafından kolayca işlenebilir. Bozunma hızı ve mekanik özellikleri; büyük ölçüde, molekül ağırlığına, çapraz bağlanma süresine ve çapraz bağlama kimyasına bağlı olarak değişmektedir [40].

3.2.3 Poli (vinil alkol) (PVA)

Polivinil alkol (PVA); biyobozunur, biyoyumlu ve sulu ortamda jelleşebilen bir polimerdir. PVA hidrojellerinin bozunma hızları; polimerin molekül ağırlığı, polimer derişimi ile fiziksel ve kimyasal çapraz bağların bileşimi değiştirilerek kontrol

edilebilmektedir. PVA'nın hücre adhezyonu ve protein absorpsiyonuna karşı dirençli olması, bakteriyel enfeksiyonu ve ameliyat sonrası adhezyonu önlemektedir [40].

3.2.4 Polihidroksialkanoatlar (PHB, PHBV, P4HB, PHBHHx, PHO)

Polihidroksialkanoatlar (PHA) da alifatik poliester grubuna dahildir. Ancak, dengesiz büyüme koşullarında mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir [5]. Bu doğrusal polimerler, gerçek mikroorganizmalarda karbon ve enerji stoklamayı sağlayan hücre içi enerji depolama polimerleridir. Bu polimerler, yavaş bir şekilde biyobozunur olan, biyouyumlu ve termoplastik malzemelerdir [34]. Biyobozunur ve ısı olarak işlenebilir olmalarından dolayı, tıbbi cihazlar ve doku mühendisliği uygulamalarında biyomalzeme olarak kullanımları ilgi çekmektedir [5]. Poli(3-hidroksibütirat) (PHB), yaygın olarak kullanılan en basit PHA'dır.

Farklı uygulamalar için, gerekli olan özelliklere bağlı olarak, biyouyumluluk ve mekanik özelliklerini ayarlamak için PHA polimerlerinin yüzeyleri modifiye edilebilmekte ya da enzimler ve inorganik malzemeler gibi diğer polimerler ile birleştirilebilmektedir [5].

PHB, kemik doku mühendisliği için özel bir polimerdir. Kemik dokuya olan uyumlu cevabı ve implantasyon süresinden sonra 12 haftaya kadar istenmeyen kronik inflamatuvar (iltihaplı) cevaba yol açmadığı kanıtlanmıştır [5].

3.2.5 Yüzey biyoaşınma polimerleri

Ağırlıklı olarak hidroliz prosesinin polimer-su arayüzeyi ile sınırlı olduğu durumda heterojen hidrolize uğrayan bir polimer sınıfı bulunmaktadır. Bu özellik “yüzey aşınma” olarak bilinmektedir. Bu özelliği gösteren polimerler, poli(anhidritler), poli(orto-esterler) ve polifosfazenlerdir. Yüzey biyo-aşınma özelliği gösteren bu polimerler ilaç salım aracı olarak kullanılmaktadırlar. Yüzey biyo-aşınma özellikleri yapı iskelesi olarak kullanımlarında üç önemli avantaj sunmaktadır : (1) kütle hacim oranının korunmasından dolayı cihazın bozundurucu ömrü boyunca mekanik bütünlüğünün sürdürülmesi, (2) bozunma ürünlerinin çözünürlüğünün ve derişiminin düşük olması nedeniyle zehirli etkilerinin en düşük seviyede olması, (3) aşınma ilerledikçe gözenek boyutu arttığı için, gözenekli yapı iskeleleri içindeki kemik gelişiminin belirgin bir şekilde artması [5].

4. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILAN YAPI İSKELELERİ

Kemikler; kemik doku, kemik iliği ve periost adı verilen kemiği çevreleyen bir bağ dokudan oluşan vaskülerize ve sinirle donatılmış organlardır. İç organların korunması, kaslara destek olma, kan üretimi, kalsiyum homeostazisi ve asit-baz tamponu gibi birçok fonksiyona sahiptir. Kemik dokusu, kemik organının sert kalsifiye edilmiş kısmıdır ve kemiğin işlevsel özellikleri için kritik öneme sahiptir [41].

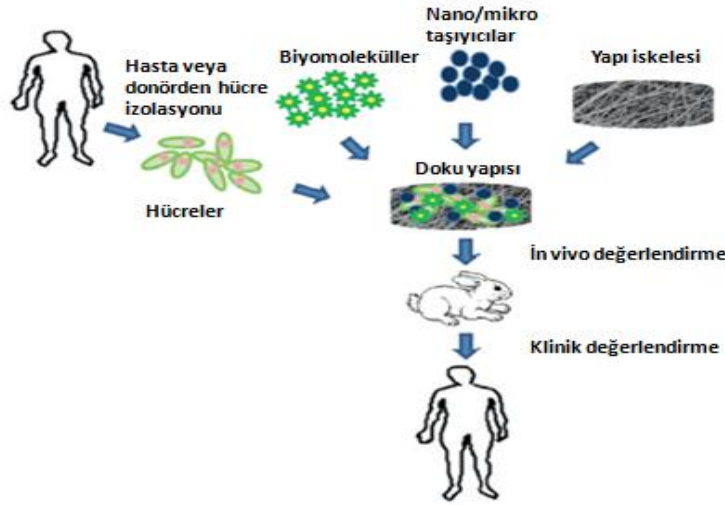
Kemik dokusu, konjenital (doğumsal) bozukluklar, hastalıklar, yaralanmalar ya da travmalar gibi birçok nedenle zarar görmektedir. Bu doku hasarlarını onarmak için otogreftler veya allogreftler yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleridir. Ancak, bu yöntemlerin hastalığın bulaşması, düşük biyouyumluluk ve başarısız implantasyon riski nedenleriyle kullanımları sınırlıdır. Son zamanlarda, doku mühendisliğinde alternatif olarak yapı iskeleleri kullanılmaktadır [42].

Yapı iskelesi, büyüyen hücreler ve dokular için geçici bir destek yapısı olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, sentetik ekstrasellüler matris olarak bilinir ve hücreleri desteklemede önemli bir rol oynar. Bu hücreler daha sonra, üç boyutlu olarak hücre çoğalması, göçü ve farklılaşması ile insan vücudunda bulunabilen uygun özelliklere sahip özel dokunun oluşumuna neden olur [38].

Kemik doku mühendisliği yapı iskeleleri, kritik boyuttaki kemik hasarlarının onarımında kullanılan ve kemik ile kuvvetli bağlar oluşturmak için fizyolojik sıvı ile tepkimeye giren biyoaktif malzemelerden üretilen malzemelerdir. Gerekli hücre ve sinyal molekülleri ile uygun biyoaktif yapı iskelesinin kullanımı vaskülerize kemik dokusunun yenilenmesini desteklemelidir. Kemik yenilenmesi, doku mühendisliğinde dikkat çeken önemli araştırma alanlarından biridir [43].

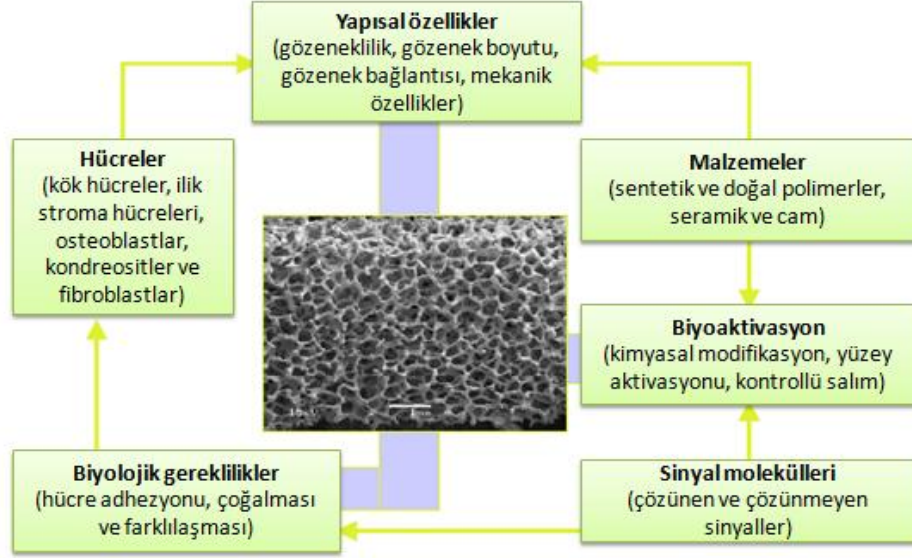
4.1 İdeal Bir Yapı İskelesinin Sahip Olması Gereken Özellikler

Birçok doku mühendisliği uygulamalarında, üç boyutlu yapı iskeleleri Şekil 4.1’de görüldüğü gibi yapısal destek oluşturmak için hücreler ile birlikte kullanılırlar. Bir yapı iskelesinin başarısı, kullanılan başlangıç maddesinin özelliğine ve üretim yöntemine bağlıdır [44]. Başarılı kemik doku yenilenmesi için, in vitro ve in vivo koşullarda hücre büyümesi ve yeni doku oluşumu için 3 boyutlu biomimetik yapı sağlayan sentetik ekstrasellüler matris (ECM) benzeri yapı iskelesi tasarlanmalıdır [45].



Şekil 4.1 : Yapı iskelesi esaslı doku mühendisliğinin şematik gösterimi [44].

Klinik olarak daha uygun yapı iskeleleri tasarlarken, doğru tasarım ve malzeme özellikleri ve ayrıca farklı kemik hasarları ve kırık merkezlerinin gereksinimleri dikkate alınmalıdır. Birincisi ve en önemlisi, malzeme biyouyumlu olmalıdır (istenmeyen fizyolojik tepkiler üretmemelidir). İdeal olarak, yapı iskelesi geçici bir yapı oluşturmalı ve zamanla yeni dokunun oluşumuyla bozunmalıdır (biyobozunur özelliğe sahip olmalıdır). Bunlara ek olarak, yerine geçtiği doku ile uyumlu mekanik özelliklere sahip olmalı, yapısal özellikleri (gözenek boyutu, gözeneklilik, gözenek birleştiriciliği ve geçirgenlik) uygun olmalı ve üç boyutlu karmaşık şekillerde kolay işlenebilir olmalıdır [45, 46]. Şekil 4.2 yapı iskelesinin sahip olması gereken en önemli özellikleri göstermektedir [11].



Şekil 4.2 : Kemik doku mühendisliğinde ideal yapı iskelesinin sahip olması gereken en önemli özellikler [11].

Kemik yenilenmesi için ideal yapı iskelesinin sahip olması gereken bütün özellikler aşağıda sırasıyla özetlenmiştir [11, 38, 47, 48].

1. Yüzeyi; hücre bağlanmasını sağlamalı, hücre büyümesini desteklemeli ve farklılaşmış hücre fonksiyonlarının tutulmasına izin vermelidir.
2. Biyouyumlu olmalı ve in vivo koşullarda zehirli özellik göstermemelidir.
3. Üç boyutlu doku büyümesi için kalıp gibi davranmalıdır.
4. Yaralı doku oluşturmada esas dokuya bağlanmalı ve osteokondüktif özelliğe sahip malzemeden üretilmelidir.
5. Vücut içerisinde biyoemilir olmalı ve kontrol edilebilir bir bozunma hızına sahip olmalıdır. Bozunma ürünleri zehirli olmamalı ve örneğin üriner sistem ile vücut dışına atılabilmelidir.
6. Bağlandığı dokuya benzer mekanik özellikler göstermelidir.
7. Gözenekliliği %90'dan büyük olan gözenekli bir yapıya sahip olmalı ve ayrıca yenilenen dokunun merkezine hücre nüfuzu, doku gelişimi ve yeni damar oluşumu ile besin taşınımının gerçekleşebilmesi için çapı 300-500 μm aralığında olmalıdır.
8. Hastaya ait kemik kusurları ile eşleşen, düzensiz şekillerde üretilebilir olmalıdır.
9. Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) ve FDA gerekliliklerini sağlayarak ticari olarak üretilebilir bir potansiyele sahip olmalıdır.

4.2 Yapı İskelesi Üretim Yöntemleri

4.2.1 Sol-jel prosesi

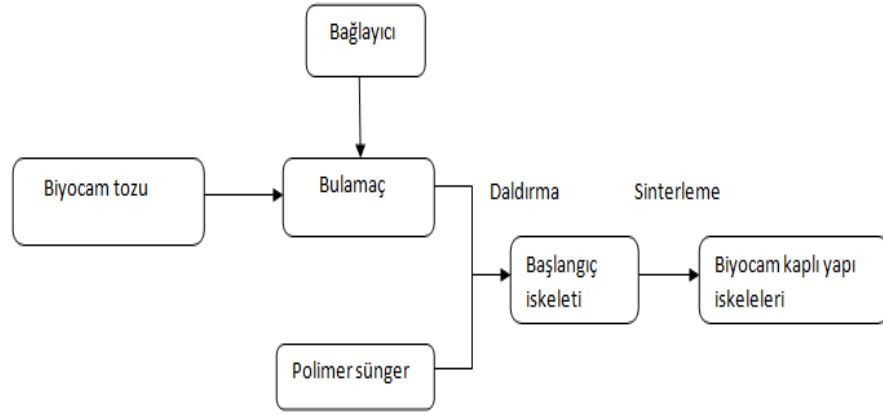
Sol-jel prosesi; çözeltinin (sol) hazırlanması, çözeltinin jelleşmesi ve çözücünün uzaklaşması ile inorganik malzemelerin kimyasal sentezi olarak tanımlanmaktadır. Sol-jel prosesi, bir sistemin sıvı bir çözeltiden (sol) katı bir jel fazına geçişini içermektedir. Prosesin temelini, metal alkoksitlerin inorganik polimerizasyon tepkimeleri oluşturmaktadır [11].

Oldukça yüksek gözenekliliğe sahip camlar (ya da cam süngerler), çift bıçaklı bir karıştırıcı, yüzey aktif bir madde ve jelleşme ajanı olarak asidik bir katalizör (seyreltik HF) kullanılarak çözeltinin doğrudan süngerleştirilmesiyle oluşmaktadır. Cam süngerlerin başlangıç maddeleri; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ve tetraetil ortosilikat (TEOS) ile trietil fosfat (TEP) olmak üzere iki alkoksittir. Reaktivitenin artması ve doku bağlanması için mezo gözeneklere (2-50 nm) ve doku gelişimi için birbirine bağlı makro gözeneklere (100-500 μm) sahip hiyerarşik bir yapı oluşmaktadır. Bu makro gözenekli camlar doku mühendisliği uygulamaları için gerekli özellikleri, doku hasarının olduğu yerde onarımını ve yenilenmesini sağlamaktadır [11].

4.2.2 Sünger kopyalama yöntemi

Polimer sünger kopyalama yöntemi, ilk olarak uzun yıllar önce makro gözenekli seramiklerin üretiminde kullanılmıştır. Son yıllarda gözenekli cam yapı iskelesi üretiminde dikkat çekmektedir [4]. Bu yöntem ile biyocam yapı iskelesi üretim aşamaları Şekil 4.3' de gösterilmiştir [11].

Polimer sünger kopyalama yönteminde; başlangıç yapısı, poliüretan gibi bir polimer süngerin biyoaktif cam tanecikleri ile kaplanmasıyla hazırlanmaktadır. İstenen makro yapıyı içeren polimer sünger, biyoaktif cam kaplaması ile geçici bir kalıp oluşturmaktadır. Bulamaç, polimer kalıp içine emdirilmekte ve bu sayede polimer yüzeyinde homojen bir biyocam tanecik kaplaması sağlamak üzere yapı içine sızması sağlanmaktadır. Kurutmadan sonra polimer, gözenekli biyocam kaplamanın mikroyapı hasarını en düşük seviyeye indirmek için, yüksek sıcaklıkta ($>723\text{ K}$) yavaşça yakılıp uzaklaştırılmaktadır. Polimer yok edildikten sonra, cam istenen yoğunluğa sinterlenmektedir. Proses, polimer süngerin makro gözenekli yapısını kopyalamakta ve sonuç olarak kendine özgü mikroyapılar oluşturmaktadır [11].

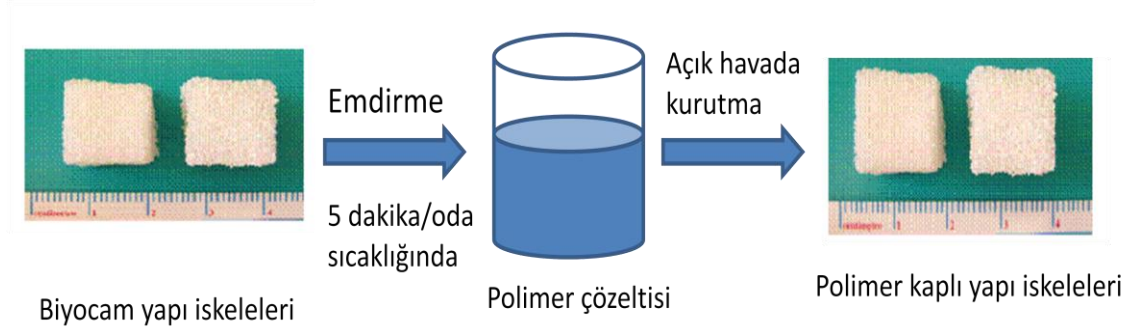


Şekil 4.3 : Polimer sünger kopyalama yönteminin şematik gösterimi [11].

Diğer yapı iskelesi üretim yöntemleri ile karşılaştırıldığında, polimer sünger kopyalama yöntemi birçok avantaj sağlamaktadır. Bu yöntem, ayarlanabilir gözenek boyutuna sahip oldukça gözenekli süngerlerin üretimine imkan tanımaktadır. Birbiriyle bağlantılı ve %40-95 aralığında değişen gözenekli yapı iskelelerine ulaşılabilir. Ayrıca, kemik hasarının şekline ve boyutuna uygun düzensiz şekiller üretilebilmektedir. Bunlara ek olarak, hızlı bir yöntemdir ve zehirli kimyasalların kullanımını içermemektedir. Hızlı prototipleme gibi diğer standart proselere göre daha ekonomiktir [4, 11].

4.2.3 Polimer kaplı biyocam yapı iskeleleri

Oldukça yüksek gözenekliliğe sahip seramik yapı iskelelerinin mekanik kararlılığını geliştirmek için, yapı iskelelerinin biyobozunur polimer ile kaplanması konusunda çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Polimer tabakası, yapı iskelesinin mekanik kararlılığını geliştirerek yüzeydeki mikro çatlakları kaplamak ve doldurmak için hazırlanmaktadır. Polimer tabakaların, doğal kemiğin kırılma sürecinde kolajen fibrillerin oluşturduğu etki gibi, çatlak kenetleme mekanizmasını etkilediği düşünülmektedir. Biyocam yapı iskelelerinin polimer ile kaplanması Şekil 4.4' deki gibi gerçekleştirilmektedir [11].



Şekil 4.4 : Polimer çözeltisine daldırma yöntemi [11].

4.2.4 Çözücü döküm yöntemi

Kompozit yapı iskelelerinin üretiminde kullanılan çözücü döküm yöntemi; polimerin organik bir çözücüde çözünmesi, seramik granülleri ile karıştırılması ve önceden belirlenmiş 3 boyutlu bir kalıp içerisine çözeltinin dökümü aşamalarından oluşmaktadır. Daha sonra çözücü buharlaştırılmaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajı, üretimin özel ekipman gerektirmeden kolayca yapılmasıdır. Çözücü döküm prosesinin başlıca dezavantajları : (1) şekil sınırlaması (genellikle üretim yapılan şekiller düz levhalar ve tüp şeklindedir), (2) polimer içerisinde zehirli çözücü kalma ihtimali, (3) çözücü kullanımı ile polimere katılan proteinlerin ya da diğer moleküllerin bozulması. Polimeri dökmek için kullanılan organik çözücüler, protein gibi biyoindüktif moleküllerin aktivitesini düşürebilmektedir [5, 11].

4.2.5 Çözücü döküm/tanecik uzaklaştırma yöntemi

Çözücü dökümünü takiben tanecik uzaklaştırma yöntemi, gözenekli polimerik yapı iskelelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Suda çözünür bir porojen, bir polimer çözeltisi ile karıştırılır ve karışım arzu edilen şekildeki kalıba dökülür. Daha sonra çözücü, buharlaştırma ya da dondurarak kurutma yöntemi ile uzaklaştırılır ve porojen deiyonize su içine daldırılarak süzülür. Porojen/polimer oranı, gözenekliliği kontrol eden faktördür ve porojen boyutu son yapı iskelesinin gözenek boyutunu belirler. Bu yöntemde, düşük polimer kullanım avantajının yanında, gözenek şeklinin ve gözenekler arası bağlantının kontrolü sağlanamaz. Ayrıca, yapı iskelesindeki artık çözücüler, nakledilen hücreler ya da ana dokular için zararlı olabilmektedir [30, 44].

4.2.6 Çözücü döküm/tanecik uzaklaştırma ve mikroküre dolgulama

Çözücü döküm, tanecik uzaklaştırma ve mikroküre dolgulama yöntemlerinin birleşimi ile biyoaktif polimer-seramik yapı iskeleleri üretilebilmektedir. İlk olarak polimer mikroküreler, su/yağ emülsiyonu ile şekillendirilmektedir. Daha sonra polimer-biyoseramik yapı iskeleleri çözücü, tuz ya da şeker parçacıkları (porojenler), biyoaktif cam ya da seramik granüller ve önceden sertleştirilmiş mikrokürelerin karıştırılmasıyla üretilmektedir. Tanecik uzaklaştırma ve mikroküre dolgulama yöntemlerinin birleştirilmesini esas alan bu yöntem ile kontrollü gözenekliliğe sahip üç boyutlu yapılar oluşturulabilmektedir. Bu proses, çözücü döküm yöntemi ile aynı avantaj ve dezavantajları göstermektedir [11].

4.2.7 Mikroküre sinterleme

Bu proseste ilk olarak emülsiyon/çözücü buharlaştırma yöntemiyle bir seramik ve polimer kompozitin mikroküreleri sentezlenir. Kompozit mikrokürelerin sinterlenmesi sonucunda üç boyutlu gözenekli yapı iskelesi oluşur [5].

4.2.8 Isıl etkiyle faz ayrımı (TIPS)/dondurarak kurutma

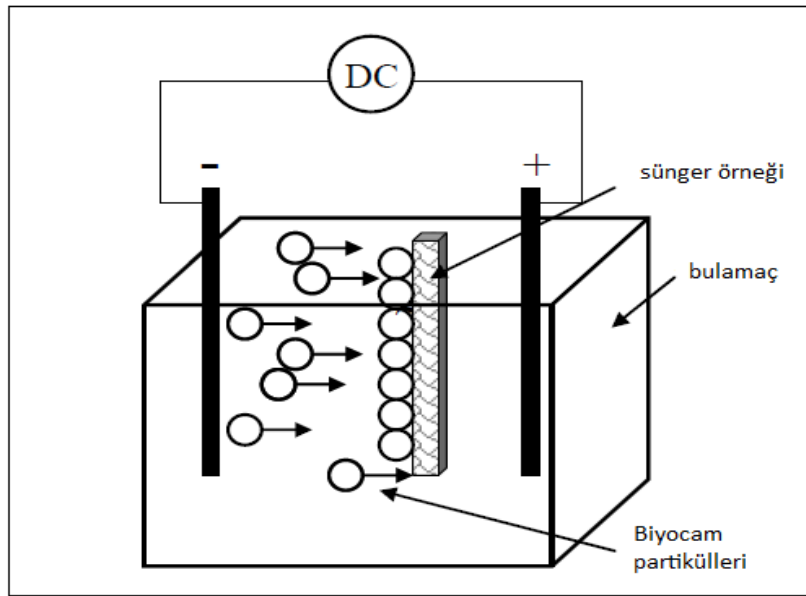
Gözenekli kompozit yapılar, ısı etkiyle faz ayrımı (TIPS) ve evaporasyon işlemleri uygulanarak üretilebilmektedir. Polimer ve inorganik malzeme süspansiyonunun sıcaklığını düşürmek, faz ayrımını gerçekleştirmek için uygulanan yaklaşımlardan biridir. İlk olarak, polimer ve seramik karışımının ara boşluklarda hareketi sağlanarak çözücü katılaştırılır. Dondurulmuş karışım, daha sonra içerisinde çözücünün buharlaştığı soğutmalı bir kurutucu ile liyofilize (dondurarak kurutma) edilir [11].

Sinir, kas, tendon, bağ doku, bağırsak, kemik ve diş gibi dokular için uygun kontrollü makro ve mikroyapıya sahip üç boyutlu emilebilir ve oldukça yüksek gözeneklilikte (~%97) yapı iskeleleri TIPS yöntemi ile üretilebilmektedir. Bu şekilde üretilen yapı iskeleleri, geniş ara gözenekliliğe sahip tüp şeklindedir. TIPS yöntemi ile üretilen süngerlerin mikrogözenekliliği, gözenek morfolojisi, mekanik özellikleri, biyoaktivitesi ve bozunma hızlarının kontrolü çözelti içerisindeki polimer derişimi, ikincil fazın hacim fraksiyonu, soğutma sıcaklığı, kullanılan polimer ve çözücünün değiştirilmesi ile yapılabilmektedir [5, 30].

4.2.9 Polimerik sünger - inorganik kaplama

Biyobozunur polimerler ve biyoaktif cam ya da seramik malzemeleri birleştirmek için alternatif bir yaklaşım, polimerik süngerlerin üzerine inorganik parçacıkları kaplamaktır. Polimerik yapı iskelelerinin, biyoaktif camlar ya da diğer inorganik parçacıklarla bulamaca daldırma ya da elektroforetik kaplama (EPD) yöntemleri ile kaplanması bu yönetime örnek olarak gösterilebilir [11].

Elektroforetik kaplama yönteminde, sulu süspansiyon içindeki yüklü biyocam tanecikleri, geniş çaptaki elektrotlara doğru dikey olarak yönlendirilen tüp şeklindeki makrogözeneklere sahip süngerlerin içine sızdırılır (Şekil 4.5) [11].



Şekil 4.5 : Elektroforetik kaplama (EPD) yönteminin şematik gösterimi [11].

4.2.10 Katı serbest form (SFF) (hızlı prototipleme) yöntemi

Aynı zamanda hızlı prototipleme olarak adlandırılan katı serbest form (SFF), kalıplar gibi geleneksel araçlar kullanılmadan, bir bilgisayar destekli program (CAD) ile kesitsel şekillerin üretilmesini içeren tekniklerin tamamını ifade eder. Bu yöntem, yapısı önceden bilgisayar üzerinde modellenmiş yapı iskelelerini üretmek için kullanılır. Bu şekilde, iskele yapısı kontrol edilebilir ve ayrıca istenen mekanik cevaba ulaşmak, kemik yenilenme sürecini hızlandırmak ve anatomik kortikal-trabeküler yapıda kemik oluşturmak için optimizasyon yapılabilir. Yapı iskelesi üretimi için üç boyutlu baskı (3DP), eriterek kaplama (FDM), mürekkep püskürtmeli

baskı, stereolitografi (SL), seçici lazer sinterleme (SLS) gibi birçok SFF yöntemi kullanılmaktadır [30].

4.3 Yapı İskelesi Üretimi İle İlgili Literatürde Yapılmış Olan Çalışmalar

Wu ve Ç.A., hasar görmüş kemik dokular için biyoaktif yapı iskelelerinin anjiyojenez kapasitesi ve antibakteriyel özelliklerinin iyileştirilmesi için iyi düzenlenmiş mezogözenek kanalları (yaklaşık 5 nm) ile bakır içeren (%0-5 oranında) mezogözenekli biyoaktif cam (Cu-MBG) yapı iskelelerini sentezlemişler ve insan kemik iliği stromal hücrelerinin kültür çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. SEM analizleri, dört çeşit Cu-MBG yapı iskelesinin (%0, 1, 2, 5) de yüksek gözenek çapına (300-500 μm) sahip olduğunu göstermiştir. Aynı oranlardaki yapı iskelelerinin XRD analizlerinde belirgin kristal pikler görülmemiştir. Hazırlanan Cu-MBG yapı iskelelerinin, %5 bakır içeren de dahil olmak üzere, hücre kültüründe biyobozunurluk çalışmaları iyi sonuç vermiş ve belirgin bir sitotoksik etkiye yol açmamıştır. Cu-MBG yapı iskeleleri, bakır içermeyen biyoaktif camlarla karşılaştırıldığında, anjiyojenez kapasitesini iyileştirdiği gözlenmiştir. Cu-MBG yapı iskeleleri, insan kemik iliği stromal hücrelerinde hipoksi indüklenebilir faktör ((HIF)-1 α) ve VEGF proteinlerini taklit edebilmiştir. MBG içerisine Cu⁺² katılması, anjiyojenez ve osteogenezin (yeni kemik oluşumu) birleşimine yol açan hipoksi benzeri doku tepkimelerini belirgin oranda artırmıştır. Ayrıca, farklı oranlarda bakır (%0-5) içeren Cu-MBG yapı iskelelerinin yüzey alanları 310-440 m²/g olarak saptanmış ve bu da Cu-MBG yapı iskelelerinin ilaç salım sistemlerinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bakırın yapı iskelelerinin birçok fonksiyonel karakteristiğini iyileştirmesi, kayıp kemik dokuların yenilenmesinde bakır katkılı yapı iskelelerinin kullanımının avantajlı olduğunu kanıtlamıştır [2].

Zhao ve Ç.A., biyoaktif cam içerisinde değişen oranlardaki bakır miktarının in vitro insan kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücreleri (hBMSCs) ve kan damarı oluşumu üzerindeki etkisi ve in vivo sıçan kalvaryal kemik kusurlarında kemik yenilenmesindeki etkisini araştırmışlardır. Ağırlıkça %0.5, %1 ve %3 CuO katkılı borosilikat biyoaktif camdan (molar bileşimi %6 Na₂O, %8 K₂O, %8 MgO, % 22 CaO, %36 B₂O₃, %18 SiO₂, %2 P₂O₅) gözenekli yapı iskelelerinin üretiminde polimer sünger kopyalama yöntemini kullanmışlardır. Yapı iskeleleri SBF çözeltisinde bakır salımını gerçekleştirmiş ve hidroksiapatite dönüşmüşlerdir. SEM

analizleri sonucunda, yapı iskelelerinin mikroyapısının gözenekliliğinin 85 ± 3 , makrogözenek aralığının ise 200-500 μm olan insan trabeküler kemiğine benzer olduğu gözlenmiştir. Biyoaktif cam yapı iskelelerinin basma dayanımı 3.1 ± 0.4 MPa iken, bakır katkılı yapı iskelelerinin basma dayanımları 2.9 ± 0.3 MPa olarak saptanmıştır. Bu değerler, insan trabeküler kemiği için belirtilen alt limit aralığında (2-12 MPa) kalmaktadır. Cam içerisinde kullanılan bakır derişimleri yapı iskelelerinin in vitro hBMSCs kültüründe zehirli bir etkiye neden olmamıştır. Cam içerisindeki bakırın artmasıyla insan kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücrelerinin alkalın fosfat aktiviteleri (ALP), anjiyojenik bağlantılı genleri (VEGF ve bFGF) ve osteojenik bağlantılı genleri (RUNX2, BMP-2 ve OPN) belirgin oranda artış göstermiştir. Sıçan kalvaryal kemik kusurlarına 8 hafta yerleştirilen ağırlıkça %3 bakır katkılı borosilikat yapı iskelelerinin bakır katılmamış cam yapı iskelelerine oranla anjiyojenez ve kemik yenilenmesini arttırdığı gözlenmiştir. Sonuçlar, biyoaktif cama bakır katkısının kemik kusurlarını iyileştirme kapasitesini attırmada umut verici bir yaklaşım olduğunu kanıtlamıştır [3].

Erol ve Ç.A., bor içeren biyoaktif cam esaslı bakır iyonları ile çapraz bağlanmış aljinat kaplı yapı iskelelerinin sentezlenmesini ve karakterizasyon işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Ağırlıkça % 65 SiO_2 , % 15 CaO , % 18.4 Na_2O , % 0.1 MgO , %1.5 B_2O_3 içeren biyoaktif camdan yapı iskelesini üretmek için sünger kopyalama yöntemini kullanmışlardır. İn vitro biyoaktivite çalışmaları amacıyla yapı iskeleleri 1, 3, 5, 7, 14 ve 28 gün süreyle SBF çözeltisinde bekletilmiştir. Aljinat kaplı ve kaplanmamış üç boyutlu yapı iskelelerinin SBF öncesi ve sonrası yapısal özelliklerinin incelenmesi için XRD ve FTIR karakterizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca, yüzeyde hidroksiapatit tabakasının oluşumunu incelemek amacıyla, SEM ve bakır salımının araştırılması için de İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP) analizleri gerçekleştirilmiştir. SEM çalışmaları, aljinatın üç boyutlu yapı iskeleleri üzerinde homojen bir şekilde bağlandığını göstermiştir. Yapı iskelelerinin sinterleme prosesinden sonra da amorf yapısı değişmemiş ve aljinat kaplanması yapı iskelelerinin biyoaktivite ve mekanik özelliklerini iyileştirmiştir. Bakır salımı çalışmaları, aljinat kaplamanın bakır iyonlarının kontrollü salımına engel olmadığını göstermiştir. Aljinat kaplı yapı iskelelerinin basınç dayanımı, kaplanmamış yapı iskelelerine göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, kaplanmış yapı iskelelerinin biyoaktivite davranışları, kaplanmamış olanlara göre daha iyi sonuç vermiştir. Bakır

iyonlarının kontrollü salımı, yapı iskelelerinin kemik doku mühendisliği için potansiyel adaylar olduğunu göstermiştir [7].

Bertolla ve Ç.A., Biyocam[®] (ortalama 4 µm parçacık boyutunda) esaslı polivinil alkol (PVA) ve mikrofibrillenmiş selülozdan oluşan (MFC) kompozit ile kaplanmış gözenekli yapı iskelelerini polimer sünger kopyalama yöntemi ile hazırlamışlar ve mekanik özelliklerini incelemişlerdir. Biyocam bulamacını hazırlarken bağlayıcı olarak poli (vinil bütiral-ko-vinil alkol-ko-vinil asetat) (PVHB) ve polimeri çözmek için de su yerine etanol kullanmışlardır. Etanol kullanımı, bulamaca daldırılmış kübik süngerlerin daha çabuk kurumasını sağlamıştır. PVA kaplaması sonucunda, yapı iskelelerinin basma dayanımının kaplı olmayanlara oranla 5 kat daha fazla ve %5 MFC fiberlerinin eklenmesi ise, basma dayanımının 10 kat daha fazla olmasını sağlamıştır. Ayrıca, PVA/MFC kompozit kaplaması gerilme dayanımını da iyileştirmiştir. PVA/%10 MFC kaplı örneklerin gerilme dayanımı, kaplı olmayanlara oranla 20 kat artış göstermiştir. SEM sonuçları, MFC fiberlerinin kırılma enerjisi, kırılma enerjisi dağılım sürecine katkıda bulunarak yapı iskelelerinin dayanımını artırdığını göstermiştir [49].

Olad ve Ç.A., üç boyutlu kitosan-jelatin/nanohidroksiapatit-montmorillonit (CS–Gel/nHA–MMT) kompozit yapı iskelelerini dondurarak kurutma yöntemi ile sentezlemişlerdir. nHA ve MMT bileşenlerinin birlikte kullanımının yapı iskelelerinin fizikokimyasal özelliklerine etkilerini araştırmışlardır. Hazırlanan yapı iskelelerinin karakterizasyonu FTIR, XRD ve SEM teknikleri ile gerçekleştirilmiştir. Kompozit yapı iskelelerinin gözenek boyutu 100-350 µm olarak saptanmıştır. Hazırlanan kompozit yapı iskeleleri, hem nano ölçekli yapıyı, hem de doğal kemik ekstrasellüler matris kimyasal bileşimini taklit edebilmektedir. Yapı iskelelerinde nHA ve MMT bulunması, bozunma hızını azaltmış ve biyomineralizasyonu artırmıştır. Ayrıca, kompozit yapı iskelelerinin şişme ve gözeneklilik özelliklerinin iyi çıkması mekanik özelliklerinin iyileştirilmesini sağlamıştır [50].

Lacroix ve Ç.A., kontrollü makro gözenekli yapıya sahip jelatin-biyoaktif cam yapı iskelelerini sentezlemiştir. Ağırlıkça bileşimi %75 SiO₂ ve %25 CaO olan biyoaktif cam parçacıklarının (<50 µm) üretiminde sol-jel yöntemini kullanmışlardır. İn vitro koşullarda apatit oluşumunu incelemek için, kompozit yapı iskeleleri 1 saat-5 gün süre aralıklarında SBF çözeltisinde bekletilmiştir. SBF sonuçları, biyoaktif camın yüksek in vitro kemik benzeri apatit oluşturma kabiliyetinin jelatin eklense bile

değişmediğini göstermiştir. Silisyum, kalsiyum ve fosfor elementlerinin SBF çözeltisi içerisindeki dağılımını belirlemek için yapılan İndüktif Eşleşmiş Plazma-Atomik Emisyon Spektroskopisi (ICP-AES) ölçümleri sonucunda biyoaktivitenin zamanla arttığı gözlenmiştir. Farklı şekillerdeki kompozit yapı iskelelerinin SEM sonuçları belirlenen gözenekliliğin doku mühendisliği uygulamaları için uygun olduğunu göstermiştir. Yüksek gözenekliliğe (>%90) sahip jelatin-biyoaktif cam kompozit yapı iskelelerinin mekanik özellikleri saf biyoaktif cama göre iyileştirilmiştir [51].

Fabbri ve Ç.A., 45S5 Biyocam® esaslı oldukça yüksek gözenekliliğe sahip yapı iskelelerini polimer sünger kopyalama yöntemi ile üretmişler ve grafen içeren elektriksel olarak iletken organik-inorganik hibrid tabakası ile kaplamışlardır. Yapı iskeleleri kaplamadan sonra orijinal yüksek gözenekliliğini ve birbirine bağlı gözenek yapısını korumuştur. Grafen katkısının yapı iskelelerinin SBF içerisindeki biyoaktivite davranımlarına olumsuz bir etkisi olmamıştır. SBF çözeltisinde 7 gün süre ile bekletilen yapı iskelelerinin FTIR analizleri HA tabasının oluştuğunu göstermiştir. Farklı yapı iskelelerinin hücre davranımlarını araştırmak için MG-63 osteoblast benzeri hücreler üç hafta süre ile kültürde incelenmiştir. Hücre kültürü sonuçları, kaplanmış ve kaplanmamış her iki yapı iskelesinin de hücre bağlanması, yayılması ve ekstrasellüler matrisin sentezlenmesini desteklediğini göstermiştir. Sonuçlar, grafen kaplı yapı iskelelerinin biyoyumlu olduğunu ve hücresel aktiviteyi desteklediğini göstermiştir [52].

Fu ve Ç.A., insan trabeküler kemiği ile neredeyse aynı mikroyapıdaki borat esaslı 13-93B2 camından gözenekliliği $72\pm3\%$, gözenek çapı 200-500 μm olan yapı iskelelerini polimer sünger kopyalama yöntemi ile üretmişlerdir. Seyreltik fosfat çözeltisinde (0.02 M K_2HPO_4) bekletilen yapı iskelelerinin 7 günde yüzeylerinde hidroksiapatit tabakasının oluşması, in vitro koşullarda camın biyoaktifliğini göstermiştir. Başlangıçta basma dayanımı 6.4 ± 1.0 MPa olan yapı iskelelerinin basma dayanımı, 15-30 gün fosfat çözeltisinde bekletildikten sonra 1.5–2.0 MPa değerine düşmüştür. Bir eşik derişimi (~ 0.65 mM) altında, camın hidroksiapatite dönüşümü sonucu kültür ortamına salınan borat iyonları, kemik iliği stromal hücrelerinin çoğalmasına engel olmamıştır. Bu eşik bor derişiminde, yapı iskelesi çözünme ürünlerinin estraktları kemirgen MLO-A5 hücrelerinin çoğalmasını ve işlevini desteklemiştir. Bu in vitro sonuçları, yapı iskelelerinden eşik değerinin altında

kontrollü bor salınımı sağlandığında, borat esaslı 13-93B2 cam yapı iskelelerinin kemik onarımında kullanılabileceğini göstermiştir [53].

Fu ve Ç.A., insan trabeküler kemiğine benzer mikroyapıdaki 13-93 biyoaktif camından (bileşimi ağırlıkça %53 SiO₂, %6 Na₂O, %12 K₂O, %5 MgO, %20 CaO, %4 P₂O₅) gözenekli yapı iskelesini hazırlamak için sünger kopyalama yöntemini kullanmışlardır. Yapı iskelelerinin; gözenekliliği 85 ± 2 , gözenek çapı 100-500 µm, basınç dayanımı 11 ± 1 MPa, elastik modülü 3.0 ± 0.5 GPa olarak bulunmuştur. Bu değerler, insan trabeküler kemiği için bildirilen en yüksek değerlerdir. Ayrıca, üretilen yapı iskeleleri, aynı yöntemle üretilen ve eş değer gözeneklilikteki polimerik biyoaktif cam-seramik ve hidroksiapatit yapılarından dikkate değer oranda daha yüksek güce sahiptir. 7 gün süre ile SBF çözeltisinde bekletilen gözenekli yapı iskelelerinin yüzeylerinde nanoyapıda bir hidroksiapatit tabakasının oluşması, yapı iskelelerinin in vitro koşullarda biyoaktif olduğunu göstermiştir. İn vitro hücre kültürü ve SEM incelemeleri sonucunda, yapı iskelelerinin hem yüzey de hem de yapıların içinde MC3T3-E1 preostoblast hücrelerinin çoğalması ve bağlanmasını desteklemek için mükemmel özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar, kemik onarımı ve yenilenmesinde 13-93 camlarından üretilen yapı iskelelerinin biyolojik yapı iskeleleri olarak uygunluğunu kanıtlamıştır [54].

5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

5.1 Çalışma Programı

Biyoaktif camların yapısına çeşitli iyonların katılması ile doku yenilenmesinin iyileştirildiği bilinmektedir. Bu çalışmada, biyoaktif özelliği yüksek olduğu bilinen 45S5 camı ve anjiyojenezi uyarma özelliğine sahip olan bakır katkılı biyoaktif cam üretimi gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç hammaddelerinden bileşimleri ağırlıkça; %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %24.5 CaO olan 45S5 ve %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %2 CuO ve %22.5 CaO içeren bakır katkılı biyoaktif camlar klasik ergitme yöntemi ile üretilmiştir. Bileşim içerisindeki CuO oranı, yüksek derişimlerin biyoaktiviteyi ve biyoyumluluğu olumsuz etkileyebileceği düşünüldüğünden, %2 ile sınırlandırılmıştır. Üretilen cam numunelerine, Diferansiyel Termal Analiz (DTA) uygulanarak camsı geçiş (T_g) ve kristalizasyon (T_c) pik sıcaklıkları belirlenmiştir. Cam numunelerinin amorf yapılarının incelenmesi için XRD analizi uygulanmıştır. İki farklı bileşime sahip cam numunelerinden, polimer sünger kopyalama yöntemi ile yapı iskelesi üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen yapı iskeleleri, biyoaktivite ve biyobozunurluk özelliklerinin geliştirilmesi için doğal bir polimer olan aljinat ile kaplanmıştır. Aljinat ile bakırın çapraz bağlanması işlemini gerçekleştirmek üzere, 45S5 camından üretilen yapı iskelelerinin bir kısmına bakır çözeltisi damlatılmıştır. Böylece 45S5 camından üretilen (aljinat kaplı ile kaplama yapılmamış ve bakır ile çapraz bağlanmış aljinat kaplı) ve bakır katkılı camdan üretilen (aljinat kaplı ve kaplama yapılmamış) olmak üzere üç farklı polimer/biyoaktif cam kompozit yapı iskelesi üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yapı iskelelerine ve biyoaktif camlara uygulanan karakterizasyon işlemleri sırasıyla aşağıda belirtilmiştir:

- Biyobozunma davranımlarının ve yüzeylerinde oluşan hidroksiapatit tabakasının incelenmesi için, yapı iskeleleri laboratuvar koşullarında belirli sürelerde yapay vücut sıvısı içerisinde bekletilmiştir.

- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak yapı iskelelerinin mikroyapıları ve yapay vücut sıvısından çıkarıldıktan sonra yüzeylerindeki hidroksiapatit tabakası incelenmiştir.
- Yapılarındaki amorf ve kristal fazların araştırılması için X-Işınları Difraksiyonu (XRD) analizi yapılmıştır.
- Fourier Kızıl Ötesi Dönüşüm Spektroskopisi (FTIR) ile numunelerin yapılarında oluşan kimyasal bağlar tespit edilmiştir.
- İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP) cihazı kullanılarak yapay vücut sıvısı içerisindeki bakırın derişimi belirlenmiştir.

5.2 Numunelerin Hazırlanması

5.2.1 Ergitme yöntemi ile biyoaktif camların üretimi

Klasik ergitme yöntemi kullanılarak ağırlıkça; %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %24.5 CaO içeren 45S5 camı ve ağırlıkça %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %2 CuO ve %22.5 CaO içeren bakır katkılı biyoaktif cam olmak üzere iki farklı bileşime sahip biyoaktif cam üretimi gerçekleştirilmiştir.

Üretim için saf başlangıç hammaddeleri olarak Merck kalitede SiO₂, Na₂HPO₄ (P₂O₅ ve Na₂O kaynağı olarak), CaCO₃ (CaO kaynağı olarak), Na₂CO₃ (Na₂O kaynağı olarak), Cu(NO₃)₂.3H₂O (Cu⁺² kaynağı olarak) kullanılmıştır. Gerekli olan bileşim temel alınarak tartılan hammaddelerden hazırlanan başlangıç karışımı, daha homojen bir karışım elde etmek için agat havanda öğütülmüştür. Hazırlanan karışım, platin pota içerisinde Protherm PLF-1600 markalı fırında 1623 K'de ergitilmiş, eriyik bu sıcaklıkta 2 saat bekletildikten sonra saf su içerisine dökülmüştür. Granül halinde elde edilen cam parçacıkları, homojenliğin sağlanması için tekrar agat avanda öğütülmüş ve viskoziteyi düşürerek camı rahatça dökülebilmek için aynı sıcaklıktaki fırın içerisinde yine 2 saat bekletilmiştir. Elde edilen eriyik, tekrar saf suya dökülerek biyoaktif cam numunelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir.

5.2.2 Polimer sünger kopyalama yöntemi ile yapı iskelesi üretimi

Yapı iskelesi üretimi gerçekleştirilmeden önce ergitme yöntemiyle üretilen camlar agat havanda tanecik boyutu 45 µm'nin altında olacak şekilde öğütülmüştür.

Yapı iskelesi üretimi için; oda sıcaklığında karışmakta olan saf su içerisine, cam taneciklerinin polimer süngere kaplanmasını sağlayan bağlayıcı ajan olarak gerekli miktarda polivinil alkol (PVA) ilave edilmiştir. Polimerin çözünmesi için, karıştırıcılı ısıtıcının sıcaklığı 353 K'e ayarlanmış ve çözelti aynı sıcaklıkta 1 saat süreyle karıştırılmaya devam edilmiştir. Polimer çözündükten sonra, çözeltinin sıcaklığı 303 K'e düşürülmüş ve toz camlar yavaş yavaş çözeltiye ilave edilerek, çözelti 1 saat daha karıştırılmıştır. 45S5 biyoaktif camı kullanılarak ağırlıkça ortalama %4.2 PVA, %50.8 su ve %45 toz cam; bakır katkılı biyokatif cam kullanılarak ise %4.5 PVA, %54.3 su ve %41.2 toz cam bileşimlerine sahip çözeltiler elde edilmiştir. 1×1×1 cm³'lük küpler halinde hazırlanan 60 PPI (pore per inch-152 gözenek/cm) poliüretan süngerler, hazırlanan polimer çözeltisine daldırılarak karışımı emmesi için 1-2 dakika süreyle bekletilmiştir. Çözeltiden çıkarılan süngerler, gözeneklerin tıkanmaması için sıkılarak çözeltinin fazlası alınmıştır. Daha sonra, süngerlerin oda sıcaklığında bir gece bekletilerek kurumaları sağlanmıştır. Kuruyan süngerlere, polimeri uzaklaştırmak ve yapı iskelelerini sağlamlaştırmak amacıyla Nabertherm marka fırında 4 K/dakika sıcaklık artım hızı ile sırasıyla 823 K ve 1223 K sıcaklıklarında ısıtılma işlemi uygulanmıştır. Süngerlerin bu sıcaklıklarda bekleme süreleri 2 saattir. Isıl işlem etkisiyle poliüretan süngerler tamamen uzaklaştırıldıktan sonra, süngerin yapısını taklit eden biyoaktif cam yapı iskeleleri elde edilmiştir.

5.2.3 Yapı iskelelerinin aljinat ile kaplanması ve 45S5 camı ile üretilen yapı iskelelerine çapraz bağlama yapılması

Kaplama yapılmadan önce, 45S5 camından üretilen yapı iskelelerinin bir kısmına derişimi 5 mg/ml olan bakır içeren çözelti damlalık ile damlatılmış ve 310 K'de 1 saat bekletilerek kurutulmuştur.

Kaplama için üç farklı derişimde aljinat çözeltisi (ağırlıkça %1, %2, %3) hazırlanmıştır. Bu amaçla, saf su içerisine aljinat ilave edilmiş ve yaklaşık 1 saat süreyle karıştırılarak aljinatın tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme gerçekleşikten sonra, yapı iskelelerine aljinat çözeltileri damlalık ile damlatılarak kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece, bakır çözeltisi damlatılmış olan yapı iskelelerine aljinat damlatılması sonucunda, bakırın aljinat ile çapraz bağlanması sağlanmıştır. Gözeneklerin tıkanmaması ve fazla çözeltinin akarak uzaklaşması için yapı iskeleleri bir gece süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonuç olarak, 45S5

camından üretilmiş Cu^{+2} iyonu çapraz bağlanmış aljinat kaplı, 45S5 camından üretilmiş aljinat kaplı ve bakır katkılı camdan üretilmiş aljinat kaplı olmak üzere üç farklı yapı iskelesi elde edilmiştir.

5.3 Biyoaktif Cam Numunelerinin ve Yapı İskelelerinin Karakterizasyonu

Mikroyapılarının, fiziksel ve yüzey özelliklerinin belirlenmesi için numunelere çeşitli karakterizasyon işlemleri uygulanmıştır.

5.3.1 Üretilen biyoaktif cam numunelerine DTA (Diferansiyel Termal Analiz) uygulanması

Biyoaktif cam numunelerinin camsı geçiş sıcaklıklarının ve kristalizasyon eğilimlerinin belirlenmesi amacıyla TA Marka, SDT Q600 Model DTA cihazı kullanılmıştır. DTA analizinde cam numuneleri 20 K/dakika'lık ısıtma hızı ile 1273 K'e kadar ısıtılmış ve referans madde olarak $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ kullanılmıştır.

5.3.2 İn vitro biyoaktivite analizleri

45S5 camından üretilmiş aljinat kaplı (Cu^{+2} iyonu çapraz bağlı ve çapraz bağlama yapılmamış) ve kaplanmamış yapı iskeleleri ile bakır katkılı camdan üretilmiş aljinat kaplı ve kaplanmamış yapı iskeleleri, yüzeylerinde hidroksiapatit tabakasının oluşumunun incelenmesi için, içerisinde 30 ml yapay vücut sıvısı (SBF) bulunan santrifüj tüplerine konulmuştur. Daha sonra, içerisinde yapı iskelesi bulunan bu çözeltiler laboratuvar ortamında sıcaklığı 310 K'e ayarlanmış etüv içerisinde 1, 7, 14 ve 28 gün süreyle bekletilmiştir.

5.3.2.1 Yapay vücut sıvısının (SBF) hazırlanması

Yapay vücut sıvısı Çizelge 5.1'de yer alan kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır [55].

Çizelge 5.1 : Yapay vücut sıvısının hazırlanmasında kullanılan kimyasal bileşikler [55].

Sıra	Kimyasal	Saflık	Miktar
1	NaCl	Min %99.5	7.996 g
2	NaHCO ₃	Min %99.5	0.350 g
3	KCl	Min %99.5	0.224 g
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	Min %99.0	0.228 g
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	Min %98.0	0.305 g
6	1 M HCl	-	40 ml
7	CaCl ₂	Min %95.0	0.278 g
8	Na ₂ SO ₄	Min %99.0	0.071 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	Min %99.9	6.057 g
10	1 M HCl	-	pH ayarı için uygun miktarda

Çözelti hazırlanmadan önce kullanılan tüm malzemeler bir gece süreyle seyreltik HCl çözeltisinde bekletildikten sonra, deiyonize su ile iyice yıkanmış ve kurutulmuştur. 1 litrelik polipropilen behere 750 ml deiyonize su konulmuştur. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı ile suyun sıcaklığı 310 K'e ayarlanmıştır. Çizelge 5.1'de yer alan ilk sekiz kimyasal sırasıyla ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı ile her ilave edilen kimyasalın tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözeltiye tris base ((CH₂OH)₃CNH₂), mümkün olduğunca yavaş bir şekilde ilave edilmiştir. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 1 M HCl çözeltisi kullanılarak 7.4'e ayarlandıktan sonra, çözelti cam balon jojeye aktarılmış ve sıcaklığı 293 K olana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Soğuduktan sonra çözeltinin hacmi deiyonize su ile 1 litreye tamamlanmış ve çözelti polipropilen behere aktarılmıştır. Çökme olup olmadığını gözlemlemek amacıyla çözelti bir hafta süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir [55].

5.3.2.2 X-Işını Difraktometresi (XRD) analizleri

- Agat havanda tanecik boyutu 45 µm'nin altına düşürülmüş camların amorf yapılarının belirlenmesi ve
- Yapı iskelelerinin SBF'de bekletildikten sonra yapılarında oluşan HA fazının belirlenmesi

amacıyla Philips Marka, PW 3710 Model X-ışınları difraktometresi kullanılmıştır. Cihazda kullanılan X-ışını kaynağı 0.154 nm dalga boyundaki Cu-K α olup difraksiyon diyagramındaki veriler 0.02 derecelik tarama adımı ve 0.5 s'lik tarama zamanı ile $10^\circ < 2\theta < 90^\circ$ aralığında toplanmıştır.

5.3.2.3 Fourier Kızılötesi Dönüşüm Spektroskopisi (FTIR) analizleri

Camların (45S5 ve bakır katkılı) ve bu camlardan üretilmiş aljinat kaplanmış ve kaplanmamış yapı iskelelerinin (SBF çözeltisine konulmadan öncesi ve sonrasında) yapılarındaki kimyasal bağların belirlenmesi için Perkin Elmer Marka, Spectrum 100 Model FTIR cihazı kullanılmıştır. Cihaz, kimyasal bağların spesifik frekans veya dalga boylarında kızılötesi enerjiyi absorblama prensibi ile çalışmaktadır. Toz haline getirilerek ölçümleri gerçekleştirilen numunelerin absorbans değerleri 650-4000 cm⁻¹ aralığında kaydedilmiş ve bu değerler incelenerek yapılarındaki fonksiyonel gruplar belirlenmiştir.

5.3.2.4 Mikroyapı (SEM) analizleri

Yapı iskelelerinin yapay vücut sıvısında bekletilmeden önce gözenekli yapısının ve yapay vücut sıvısında bekletildikten sonra yüzeylerinde oluşan hidroksiapatit tabakasının oluşumu ile yapısal morfolojilerinin incelenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılmıştır. Zayıf iletkenlikleri nedeniyle analizden önce tüm numunelerin yüzeyleri 120 saniye süreyle ince bir altın tabakası ile kaplanmıştır. 15 kV'da, FEI - Quanta FEG 250 model SEM cihazı ile numunelerin görüntüleri elde edilmiştir.

5.3.2.5 Bakır iyonu salımı analizleri

Üretilen yapı iskelesi numunelerine ICP analizi uygulanarak bakır iyon derişimlerinin SBF içindeki değişimi incelenmiştir. Bu amaçla, numuneler SBF içerisinde 1, 7, 14 ve 28 gün süreyle bekletilmişlerdir.

Belirlenen sürelerin sonunda numuneler yapay vücut sıvısından çıkarılmış ve yapay vücut sıvısındaki bakır iyonlarının zamana bağlı olarak değişen derişimleri ICP cihazı ile ölçülmüştür. Ölçümler, Perkin Elmer Marka Sciex Elan DRC-e Model ICP cihazının 13.56 MHz'ta kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

5.3.2.6 Biyobozunurluk çalışmaları

İn vitro biyobozunma davranımlarının araştırılması için 45S5 camından üretilmiş aljinat kaplı (Cu^{+2} iyonu çapraz bağlı ve çapraz bağlama yapılmamış) ve kaplanmamış yapı iskeleleri ile bakır katkılı camdan üretilmiş aljinat kaplı ve kaplanmamış yapı iskeleleri 30 ml'lik SBF çözeltisine konularak 1, 7, 14 ve 28 gün süreyle sıcaklığı 310 K'de sabitlenmiş etüv içerisinde bekletilmiştir. Belirlenen süreler sonunda, SBF çözeltisinden çıkarılan yapı iskelelerinin ıslak ağırlıkları (W_w), kurutulduktan sonraki ağırlıkları (W_d) ve yapay vücut sıvısına konulmadan önceki başlangıç ağırlıkları (W_i), yapı iskeleleri tartılarak kaydedilmiştir. Sırasıyla (5.1) ve (5.2) eşitlikleri kullanılarak su absorpsiyonu (W_A) ve ağırlık kaybı (W_L) değerleri hesaplanmıştır [7].

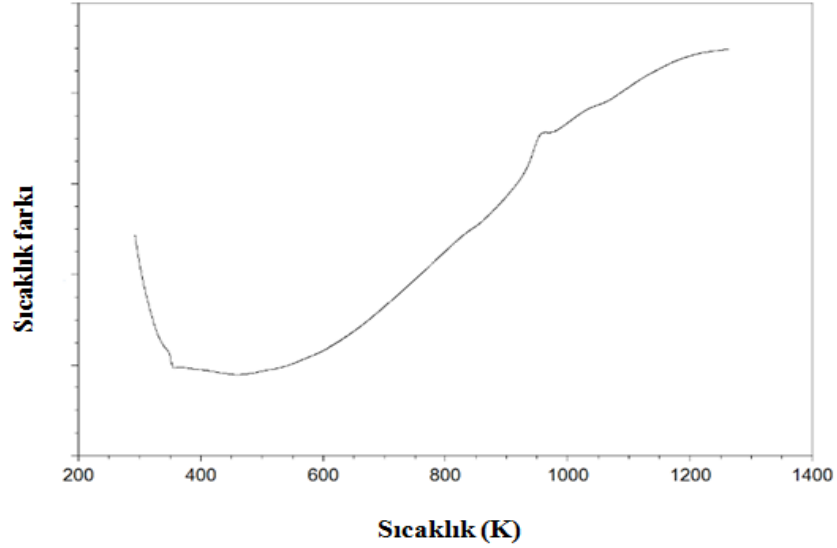
$$\%W_A = [(W_w - W_d)/W_d] \times 100 \quad (5.1)$$

$$\%W_L = [(W_i - W_d)/W_i] \times 100 \quad (5.2)$$

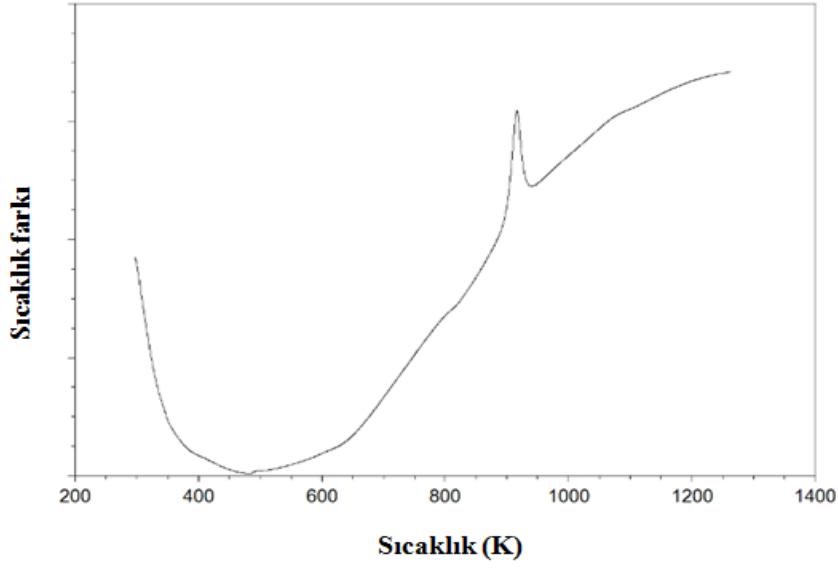
6. DENEYSEL ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

6.1 Biyoaktif Cam Numunelerinin DTA Sonuçları

Klasik ergitme yöntemiyle üretilen 45S5 ve %2 bakır içeren biyoaktif cam numunelerinin camsı geçiş ve kristalizasyon sıcaklıklarının belirlenmesi için DTA uygulanmıştır. Biyoaktif cam numunelerinin 323 K'den 20 K/dakika'lık bir ısıtma hızıyla 1273 K'e kadar ısıtılmasıyla elde edilen DTA eğrileri Şekil 6.1 ve Şekil 6.2'de verilmiştir.



Şekil 6.1 : 45S5 biyoaktif cam numunesinin DTA eğrisi.



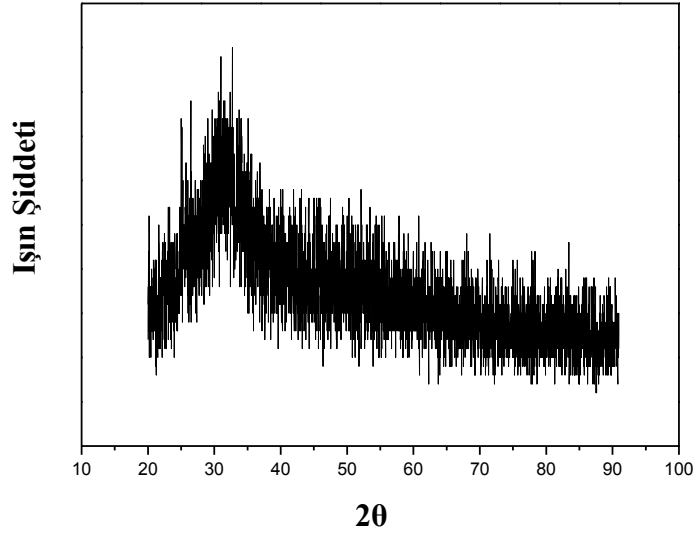
Şekil 6.2 : Bakır katkılı biyoaktif cam numunesinin DTA eğrisi.

Biyoaktif cam numunelerine ait DTA eğrilerinde (Şekil 6.1 ve Şekil 6.2) endotermik pikler camsı geçiş sıcaklığını, ekzotermik pikler ise kristallenme sıcaklığını göstermektedir. 45S5 biyoaktif camının ve %2 bakır içeren biyoaktif camın camsı geçiş sıcaklıkları sırasıyla 852 K ve 819 K; kristallenme sıcaklıkları ise sırasıyla 957 K ve 916 K olarak tespit edilmiştir. DTA sonucunda elde edilen kristallenme sıcaklıkları, yapı iskelesi üretimi için biyoaktif camların uygun olduğunu göstermiştir. Bu biyoaktif camlar kullanılarak yapı iskelesi üretilirken 1223 K sinterleme sıcaklığına ulaşıldığında, yapıda kristalizasyonun gerçekleşeceği anlaşılmaktadır.

6.2 Biyoaktif Cam Numunelerinin XRD Sonuçları

Bakır katkılı camın amorf yapısını belirleyebilmek amacıyla XRD analizi yapılmıştır.

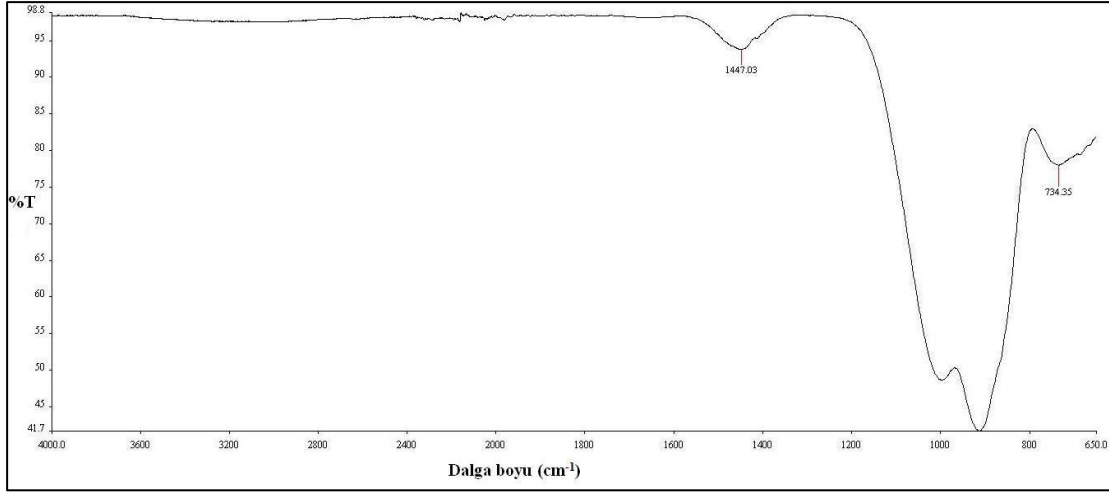
Şekil 6.3’de verilen XRD grafiği incelendiğinde, tüm bileşimlerin amorf yapıya özgü geniş bantlara sahip olduğu [56] ve herhangi bir kristalin faz içermediği görülmüştür. $2\theta=25^{\circ}$ - 40° aralığındaki geniş yansıma dışında difraksiyon piki görülmemesi [56], numunelerdeki amorf yapı varlığını doğrulamıştır. Bu sonuç, bakır katkısının hem cam ağının yapısını etkilemediğini, hem de eriyiğin soğuması sırasında kristalizasyon eğilimi oluşturmadığını göstermiştir.



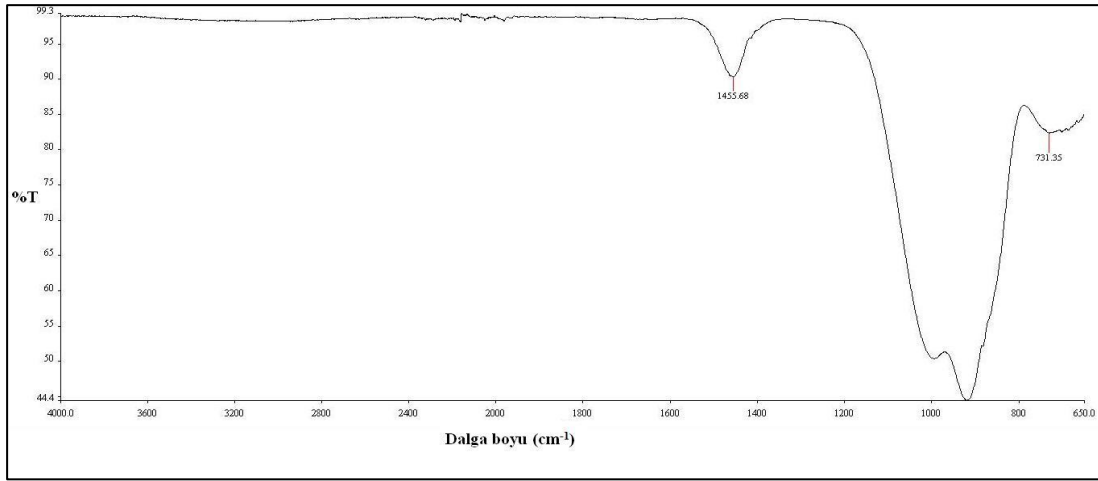
Şekil 6.3 : Bakır katkılı biyoaktif cam numunesinin XRD grafiği.

6.3 Biyoaktif Cam Numunelerinin FTIR Sonuçları

Bu çalışmada üretilen biyoaktif cam numunelerinin FTIR analizi ile $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında kaydedilen absorpsiyon değerleri incelenerek, camların yapılarındaki fonksiyonel gruplar belirlenmiştir. Şekil 6.4, 45S5 biyoaktif camının ve Şekil 6.5, %2 bakır katkılı biyoaktif camının FTIR grafiklerini göstermektedir. Her iki cam numunesi için de $1000\text{-}1014\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında görülen yoğun bantlar Si-O-Si silikatın absorpsiyon bandına ait asimetrik gerilimini, $914\text{-}922\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında görülen bantlar ise silikatın absorpsiyon bandına ait Si-O gerilimini göstermektedir [27, 57, 58]. $1447\text{-}1456\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığındaki pikler ise başlangıç karışımından gelen karbonat gruplarına aittir [58]. FTIR analizinde de camın amorf yapısını gösteren bağların bulunması XRD sonucunu desteklemiş, cam üretiminin başarılı bir şekilde yapıldığını ve yapı iskelesi üretimi için camsı yapının sinterlemeye uygun olduğunu göstermiştir. Ayrıca, FTIR analizi ile bakır katkılı cam ve 45S5 camı arasında belirgin farklılıklar olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 6.4 : 45S5 biyoaktif cam numunesinin FTIR grafiği.



Şekil 6.5 : Bakır katkılı biyoaktif cam numunesinin FTIR grafiği.

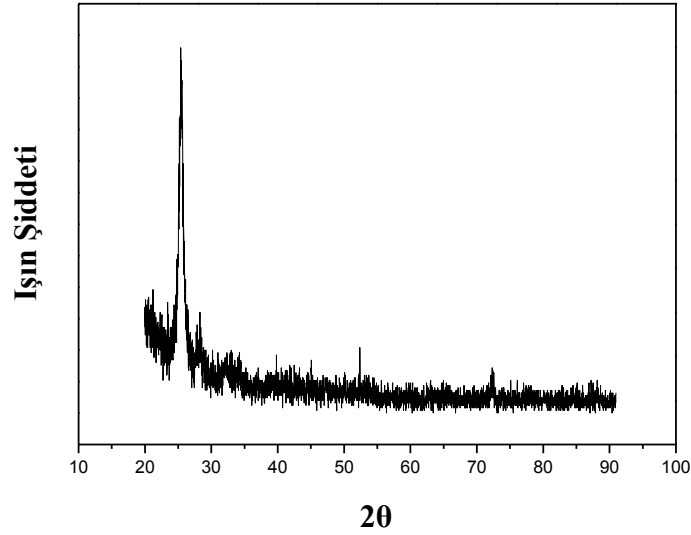
6.4 Yapı İskelesi Numunelerinin Karakterizasyonları

Üretilen yapı iskelelerinin, SBF’de bekletilmeden önce ve SBF’de bekletildikten sonra yapılarındaki kimyasal bağlar ve yüzey özelliklerinin belirlenmesi için çeşitli karakterizasyon işlemleri uygulanmıştır.

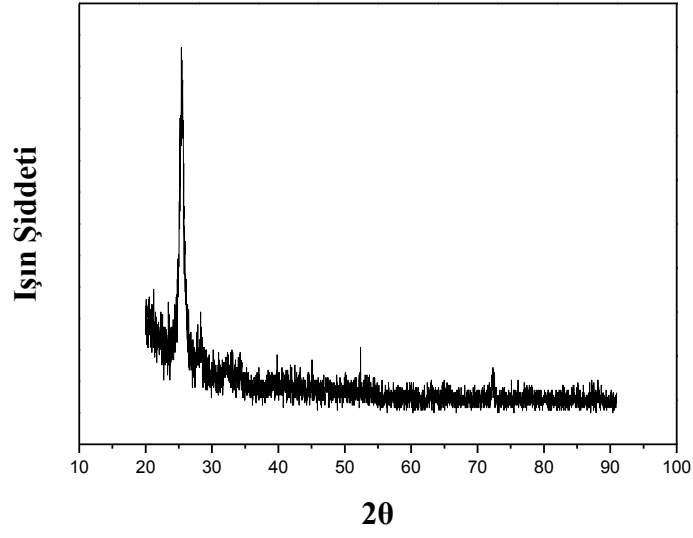
6.4.1 Yapı iskelesi numunelerinin XRD analizleri

45S5 camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı (bakır çapraz bağlı ve çapraz bağlama yapılmamış) ve kaplanmamış yapı iskeleleri ile bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı ve kaplanmamış yapı iskelelerinin, 28 gün SBF’de bekletildikten sonra, yapılarında oluşan hidroksiapatit tabakasının belirlenmesi için XRD analizi uygulanmıştır. 28 gün SBF’de bekletilen numunelere ait XRD grafikleri Şekil 6.6-6.10’da yer almaktadır. $2\theta=26^\circ$ ve (002) düzleminde yer alan pik, yapıda

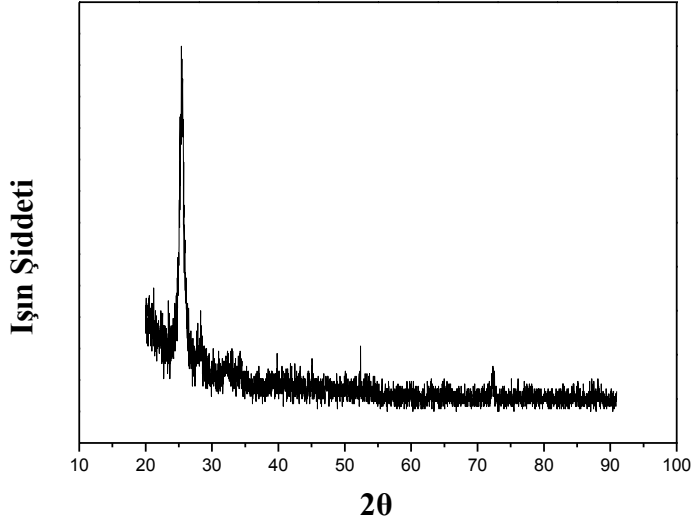
hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) tabakasının oluşumunu işaret etmektedir [59]. Ayrıca, aljinat ile kaplama işleminin biyoaktiviteye engel olmadığı ve aljinat kaplı yapı iskelelerinin XRD grafiklerinde de aynı düzlemde hidroksiapatit pikinin olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, aljinatın doğal bir polimer olarak biyoaktiviteye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bakır katkılı biyoaktif cam numunelerine ait XRD grafiklerinde, 45S5 camından üretilen yapı iskelelerinin XRD grafiklerinden farklı olarak $2\theta=26^\circ$ ve (002) düzleminde yer alan pikin yanısıra, $2\theta=32^\circ$ ve (211) düzleminde yer alan ufak bir pik daha tespit edilmiştir. Bu pikin de, hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) tabakasına ait olduğu belirlenmiştir. XRD çalışmaları sonucunda, tüm numunelerin yüzeyleri üzerinde hidroksiapatit tabakasının oluşması, numunelerin in vitro biyoaktif özelliğe sahip olduğunu göstermiştir.



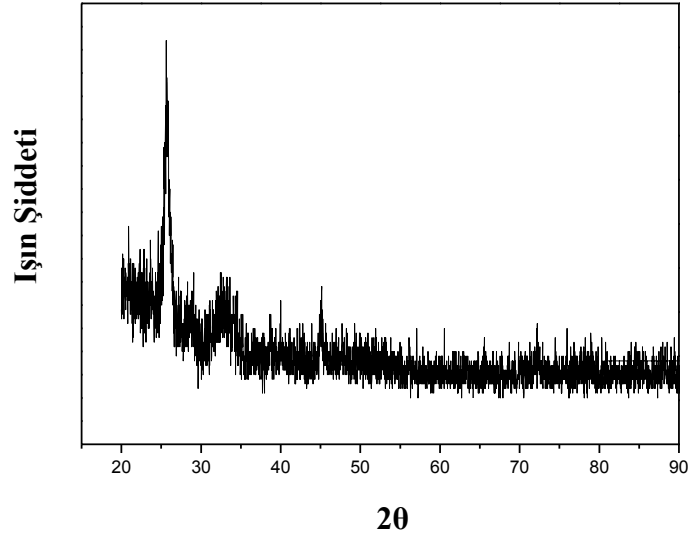
Şekil 6.6 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelesinin XRD grafiği.



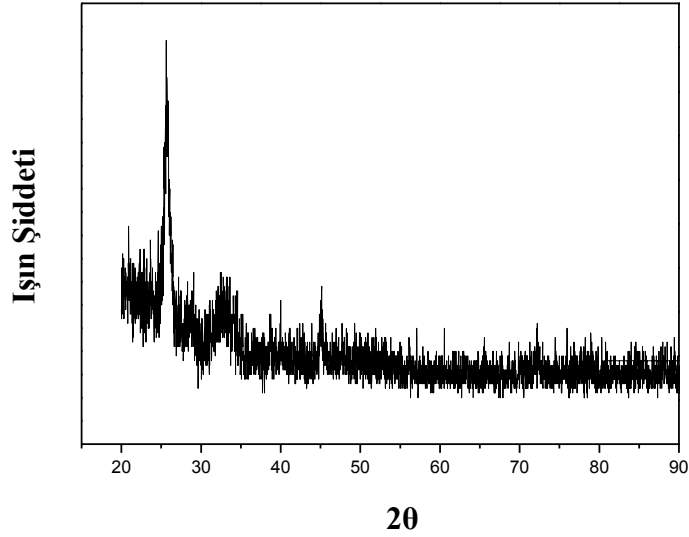
Şekil 6.7 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelesinin XRD grafiği.



Şekil 6.8 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlanmış ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelesinin XRD grafiği.



Şekil 6.9 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelesinin XRD grafiği.

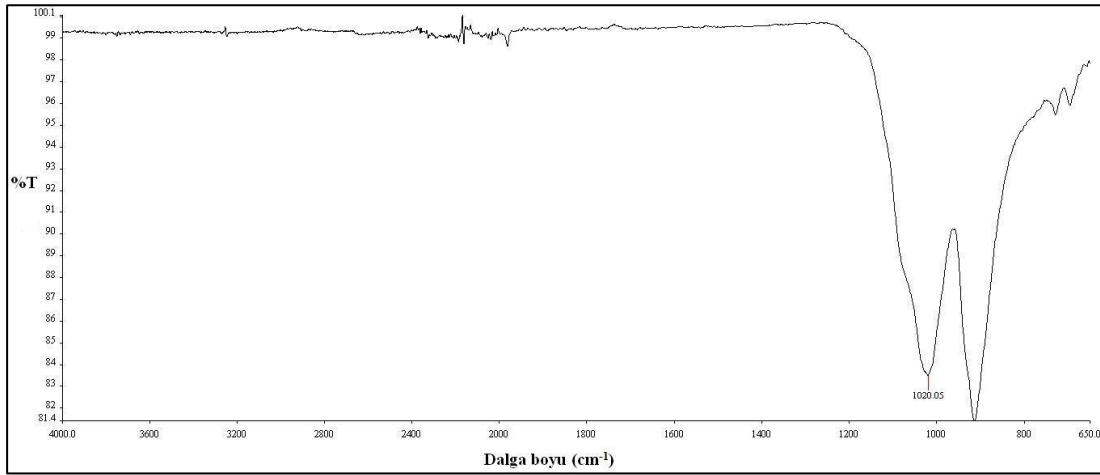


Şekil 6.10 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelesinin XRD grafiği.

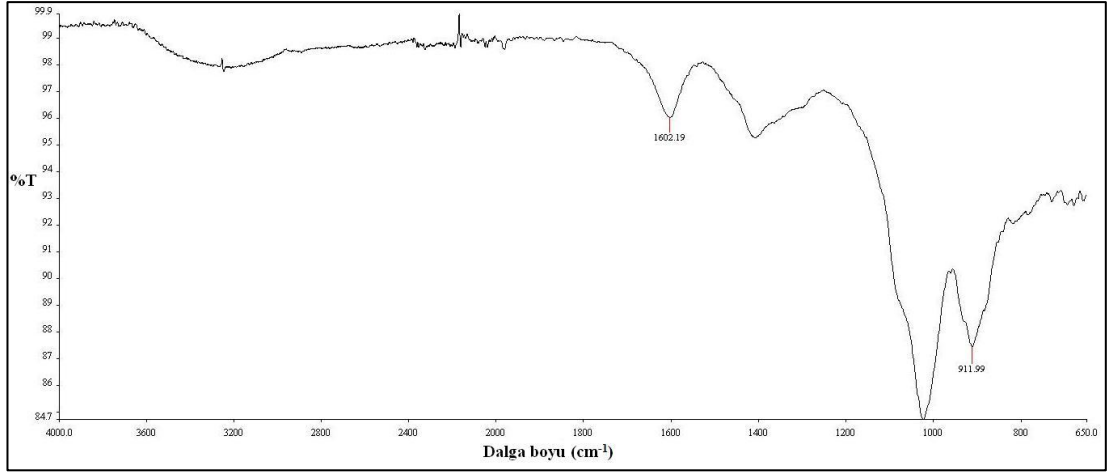
6.4.2 Yapı iskelesi numunelerinin FTIR analizleri

45S5 camından üretilen aljinat kaplı (bakır çapraz bağlı ve çapraz bağlama yapılmamış) ve kaplanmamış yapı iskeleleri ile bakır katkılı camdan üretilen aljinat kaplı ve kaplanmamış yapı iskelelerinin SBF’de bekletilmeden önce, SBF’de 1 gün ve 28 gün bekletildikten sonra, yapılarındaki fonksiyonel grupların araştırılması için $650-4000\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında FTIR analizi uygulanmıştır.

Aljinat ile kaplanmış ve kaplama yapılmamış numunelerin, yapay vücut sıvısında bekletilmeden önce yapılarındaki kimyasal bağların belirlenmesi için yapılan FTIR analizi sonucunda elde edilen grafikler Şekil 6.11-6.14’de görülmektedir. 45S5 camından üretilen her iki numune için de yaklaşık 1020 cm^{-1} civarında görülen band, numunelerdeki camsı yapının göstergesi olan Si-O-Si asimetrik gerilmesini; 911 cm^{-1} civarında görülen band ise Si-O yapısını göstermektedir (Şekil 6.11-6.12) [57, 58]. Şekil 6.11 ile Şekil 6.12 karşılaştırıldığında, numunenin aljinat ile kaplandığını işaret eden pikler görülmektedir. Şekil 6.12’de, 1602 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik karbonil gruplarını (COO^- asimetrik gerilme); 1416 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik, karboksil gruplarını (COO^- simetrik gerilme); 3220 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik, $-\text{OH}$ gruplarının absorpsiyonunu gösteren asimetrik ve simetrik absorpsiyon bantları ve sodyum aljinatın karboksil iyonlarının simetrik gerilme titreşimleridir [7, 60]. Ayrıca, Şekil 6.11’de 1020 cm^{-1} civarında görülen Si-O-Si asimetrik gerilme bandının, Şekil 6.12’de 1025 cm^{-1} değerine kaydığı görülmekte ve bu pikin aljinata ait C-O-C asimetrik gerilme bandı olabileceği düşünülmektedir [60]. 1025 cm^{-1} değerinde görülen bu pik, aljinatın yapısını oluşturan guluronik asit ve mannuronik asit gruplarının varlığını doğrulamaktadır [61]. FTIR analizleri sonucunda, yapı iskelelerinin aljinat ile başarılı bir şekilde kaplandığı ve aljinatın yüzeyde tutunduğu belirlenmiştir.

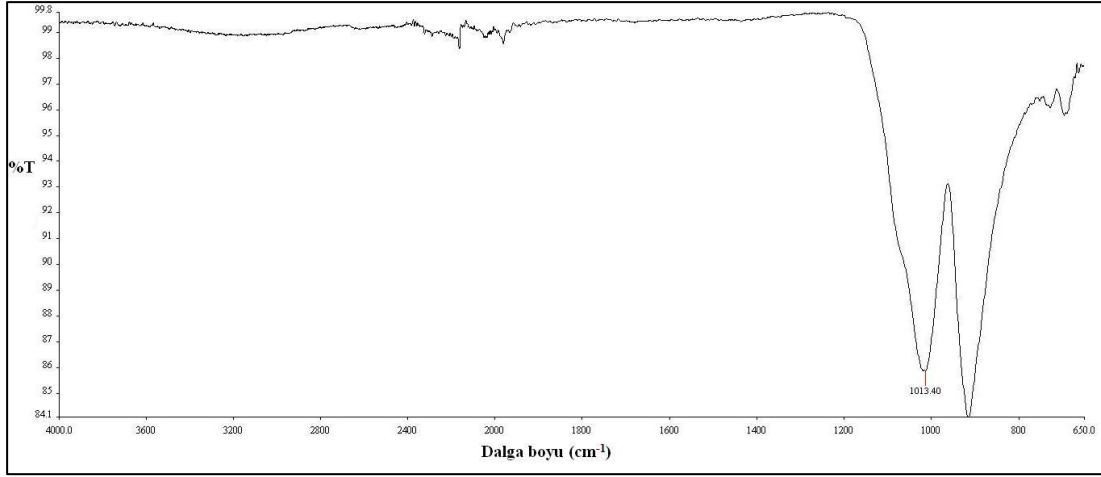


Şekil 6.11 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelesinin FTIR grafiği.

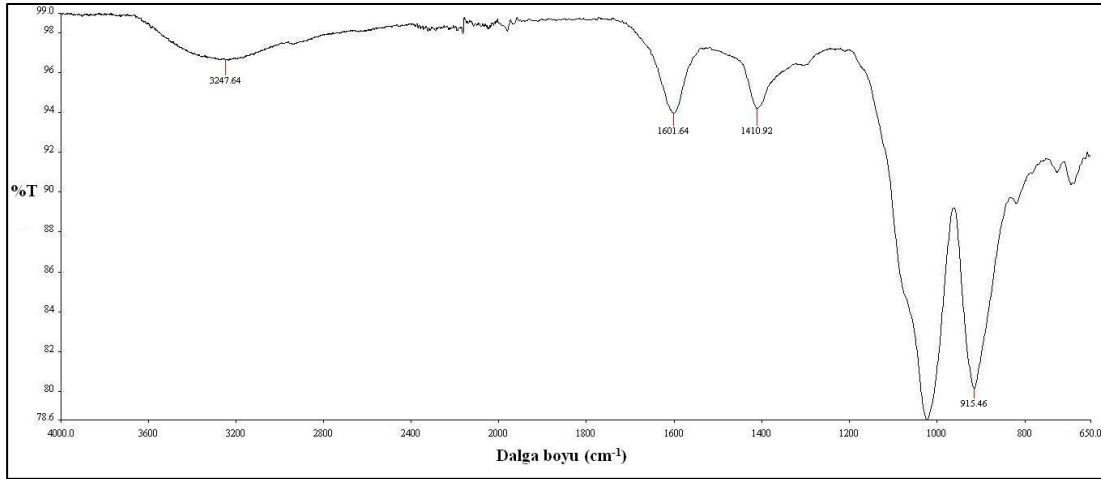


Şekil 6.12 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelesinin FTIR grafiği.

Bakır katkılı camdan üretilen aljinat ile kaplanmış ve kaplama yapılmamış yapı iskelelerine ait grafikler (Şekil 6.13-6.14) incelendiğinde, 1013 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik Si-O-Si asimetrik gerilme ve 915 cm^{-1} civarında görülen pik ise Si-O gerilme absorpsiyonlarına ait olup, camın amorf yapısını göstermektedir [57, 58]. 45S5 biyoaktif camından üretilen aljinat kaplanmış numunelerde olduğu gibi, bakır katkılı camdan üretilen yapı iskeleleri için Şekil 6.14’de 1410 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} , 3247 cm^{-1} dalga boyu değerlerinde görülen pikler, asimetrik ve simetrik absorpsiyon bantları ve sodyum aljinatın karboksil iyonlarının simetrik gerilme titreşimleridir [7]. Kaplamasız numunede 1013 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik, aljinat ile kaplanan numunede 1025 cm^{-1} değerine kaymış ve kaplanmamış numuneye göre pik şiddetinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, yapı iskelesinde bulunan cama ait Si-O-Si bandının, aljinatın yapısını oluşturan guluronik asit ve mannuronik asit gruplarını gösteren pikler tarafından kapandığını göstermektedir [61]. Ayrıca, 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskeleleri ile karşılaştırıldığında, cama bakır ilavesinin numunelerin kimyasal bağlarında herhangi bir değişime neden olmadığı ve camsı yapıyı bozmadığı tespit edilmiştir.



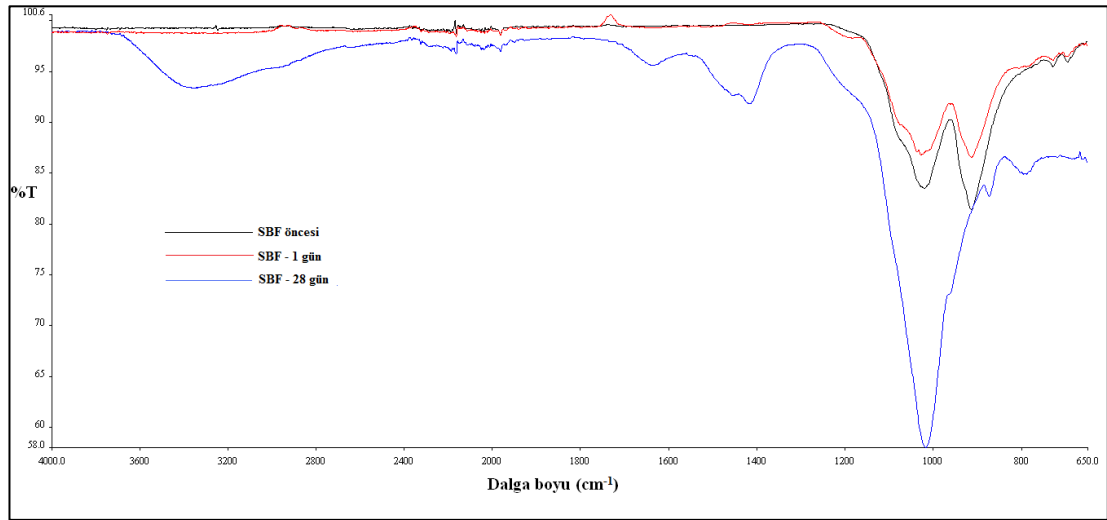
Şekil 6.13 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelesinin FTIR grafiği.



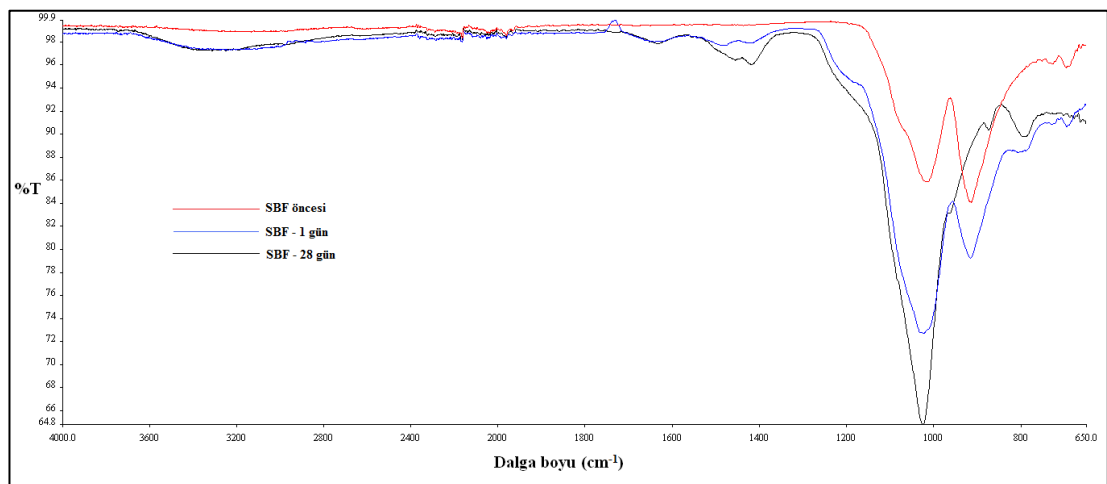
Şekil 6.14 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelesinin FTIR grafiği.

45S5 ve bakır katkılı biyoaktif camlardan üretilen kaplamasız yapı iskelelerinin yapay vücut sıvısında bekletilmeden önce ve 1 gün ile 28 gün bekletildikten sonraki FTIR grafikleri sırasıyla Şekil 6.15 ve Şekil 6.16’da verilmiştir. Yapay vücut sıvısında bekletilmeden önce her iki numune için de 1013 cm^{-1} dalga boyunda silikatın absorpsiyon bandı olan Si-O-Si asimetrik gerilmesine ve yaklaşık 911 cm^{-1} civarında görülen bandın ise Si-O bağına ait olduğu belirlenmiştir [57, 58]. Yapay vücut sıvısında 1 günlük bekletme sonrasında numunelerin pik yerlerinde belirgin bir farklılık gözlenmemekle birlikte, 28 günlük bekletme sonrasında pik yerlerinde kaymalar olmuş ve yeni pikler ortaya çıkmıştır. 28 gün yapay vücut sıvısında bekletilen numunelerde 1025 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik, Si-O-Si asimetrik gerilme bandının yerini alan hidroksiapatite ait P-O asimetrik gerilme bağı göstermektedir [28]. Yapay vücut sıvısında bekletilmeden önce yaklaşık 911 cm^{-1}

civarında görülen Si-O bağının, 28 gün bekletme sonrasında 883 cm^{-1} dalga boyuna kaydığı gözlenmiş ve bu bağın yüzeyde hidroksiapatit oluşumunu gösteren CO_3^{-2} ve HPO_4^{-2} iyonlarının ortak katkısı ile oluştuğu tespit edilmiştir. Yapay vücut sıvısında 1 gün bekletme sonrasında oluşan ve 28 gün bekletme sonrasında belirginleşen yaklaşık 1416 cm^{-1} civarında görülen pikin, yüzeyde yüksek hidroksikarbonat apatit içeriğini gösteren C-O bağı olduğu ve 1600 cm^{-1} dalga boyunda görülen pikin -OH iyonlarını gösteren su absorplama bandı olduğu belirlenmiştir [62, 63]. Yapay vücut sıvısında 28 gün bekletme sonrasında $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında görülen geniş bandlar ise, doymamış asimetrik -OH gerilme titreşimlerini göstermektedir [64].



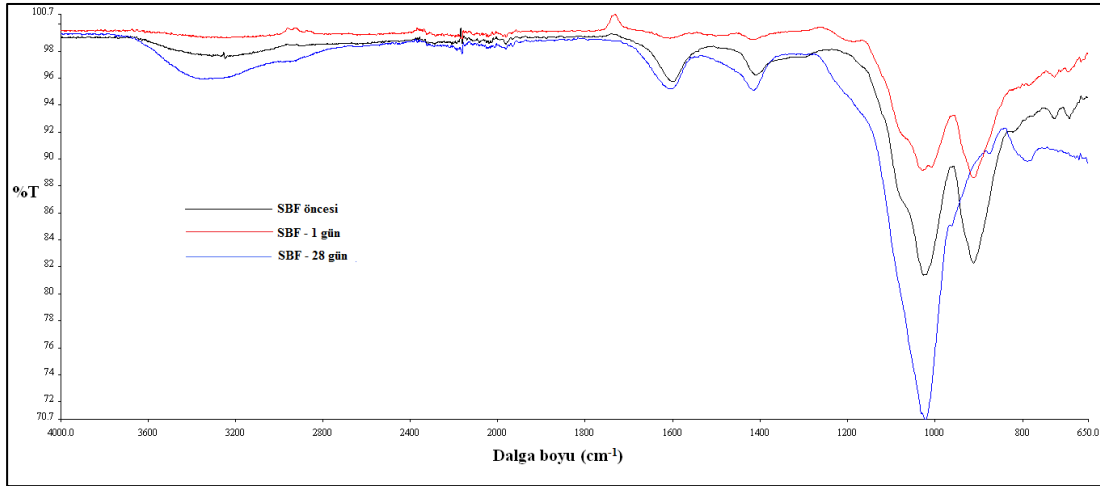
Şekil 6.15 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.



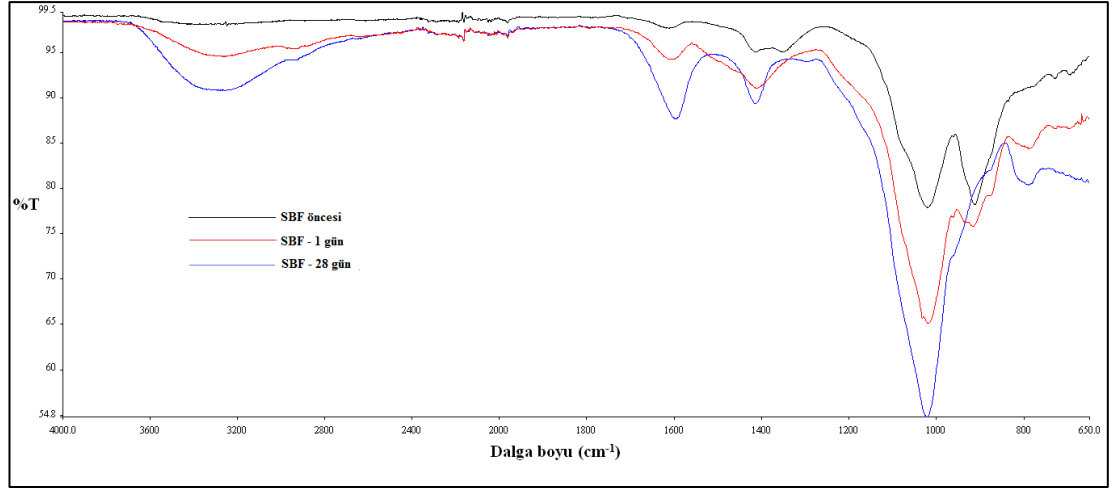
Şekil 6.16 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.

45S5 ve bakır katkılı biyoaktif camlardan üretilen %2 aljinat kaplı numunelerin yapay vücut sıvısında bekletilmeden önce ve 1 gün ile 28 gün bekletildikten sonraki

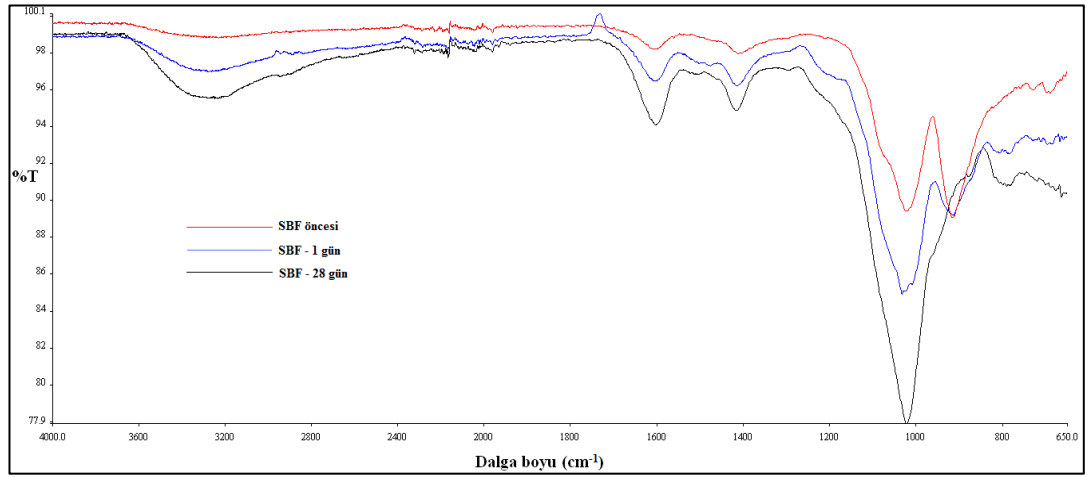
FTIR grafikleri Şekil 6.17, Şekil 6.18 ve Şekil 6.19’da görülmektedir. Her üç numune için de yapay vücut sıvısında bekletilmeden önce, yaklaşık $1010\text{-}1025\text{ cm}^{-1}$ civarında görülen pikler kaplamasız numunede Si-O-Si bağının, kaplama ile aljinata geçiş yaptığı C-O-C asimetrik gerilme titreşimleridir [60]. Numuneler yapay vücut sıvısında bekletildikten sonra bu pikin şiddetini artırdığı gözlenmiş ve yapıda hidroksiapatit oluşumunu gösteren P-O asimetrik gerilme bandına ait olduğu belirlenmiştir. Yapay vücut sıvısında bekletilmeden önce, numunelerde yaklaşık 910 cm^{-1} civarında görülen Si-O bağının, yapı iskeleleri yapay vücut sıvısına konulduktan 1 gün sonra şiddetini azalttığı, 28 gün sonra ise tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Bu piklerin yerine yaklaşık 880 cm^{-1} civarında görülen zayıf pik, CO_3^{2-} ve HPO_4^{2-} iyonlarının ortak katkısı ile yüzeyde oluşan hidroksiapatitin varlığına işaret etmektedir [62]. Ayrıca, 28 gün sonra 3250 cm^{-1} civarında belirginleşen geniş band, hidroksiapatite ait hidroksil (-OH) gruplarının absorpsiyonunu göstermektedir.



Şekil 6.17 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.



Şekil 6.18 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır ile çapraz bağlanmış ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.



Şekil 6.19 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.

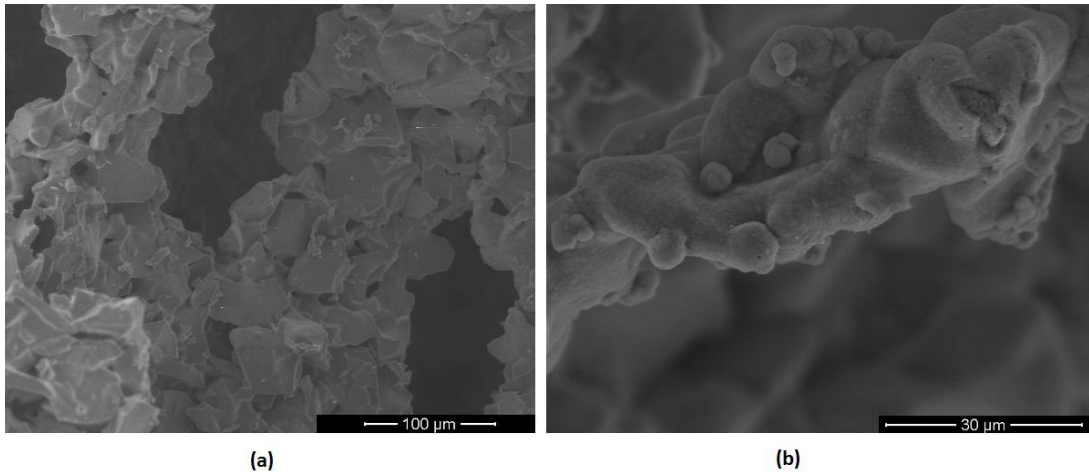
45S5 ve bakır katkılı biyoaktif camlardan üretilen %1 ve %3 aljinat kaplı numunelerin FTIR grafikleri ise Ek A'da verilmiştir.

Bu sonuçlar; 45S5 ve bakır katkılı camlardan üretilen yapı iskelelerinin, yapay vücut sıvısına konulduğunda, yüzeylerinde kemik benzeri hidroksikarbonat apatit tabakası geliştirebileceklerini göstermektedir. İn vivo koşullarda biyoaktif malzemenin yüzeyinde oluşan kemik benzeri HCA tabakasının, biyoaktif malzeme ve komşu dokular arasında güçlü bağların oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [62].

6.4.3 Yapı iskelesi numunelerinin SEM analizleri

Üretilen yapı iskelelerinin gözenekli yapısını ve yapay vücut sıvısında bekletildikten sonra yüzeylerinde oluşan hidroksiapatit tabakasını incelemek amacıyla SEM çalışmaları yapılmıştır.

45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerinin SBF’de bekletilmeden önce ve SBF’de 28 gün bekletildikten sonraki SEM görüntüleri Şekil 6.20-6.23’de verilmiştir. 45S5 biyoaktif camından üretilen kaplama yapılmamış ve bakır ile çapraz bağlı farklı oranlarda (ağırlıkça %1, %2, %3) aljinat ile kaplanmış yapı iskelelerinin SBF’de bekletilmeden önceki görüntüleri incelendiğinde, mikroyapıları arasında belirgin farklılıklar bulunmamakla birlikte tüm yapı iskelelerinin oldukça yüksek gözenekliliğe sahip olduğu ve gözenekler arasındaki bağlantılarının iyi durumda olduğu gözlemlenmiştir. SBF’de bekletilmeden önce yapı iskelelerinin gözenek çaplarının yaklaşık olarak 100-240 µm aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Bu değerler, yapı iskelelerinin kemik hücre çalışmaları için uygun makrogözenek yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Şekil 6.20 (a)-6.23 (a)’dan da görüldüğü gibi, yapı iskelesinde gözenek cidarlarının tam oluştuğu ve kalınlıklarının da yapının çökmesini engelleyecek boyutta olmadığı saptanmıştır.

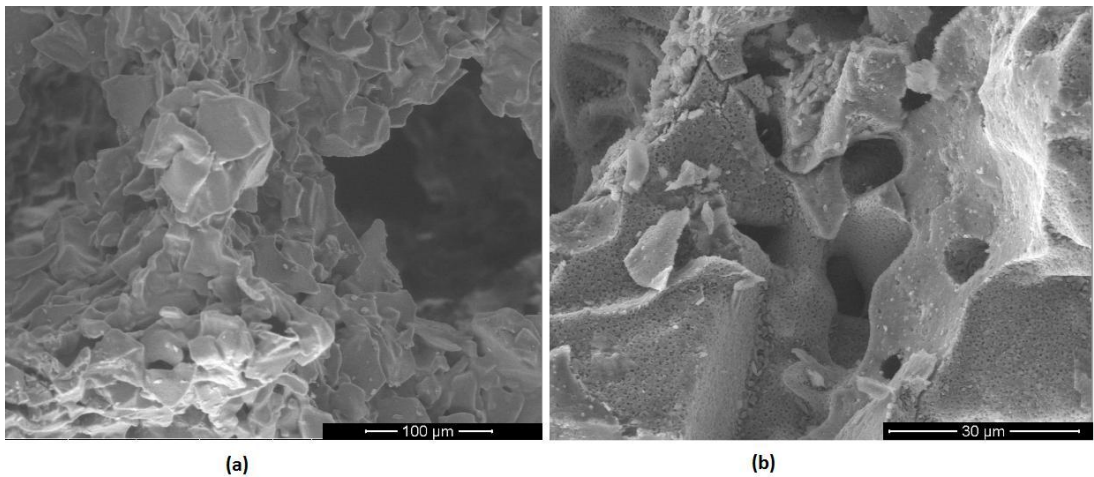


Şekil 6.20 : 45S5 biyoaktif camından üretilen kaplama yapılmamış yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.

Kaplamalı ve kaplamasız görüntüler karşılaştırıldığında, yapı iskelelerinin aljinat ile tamamen kaplandığı görülmektedir. Yapı iskelelerini aljinat ile kaplamanın gözenekleri tıkamadığı ve homojen bir kaplama yapılabildiği gözlenmektedir.

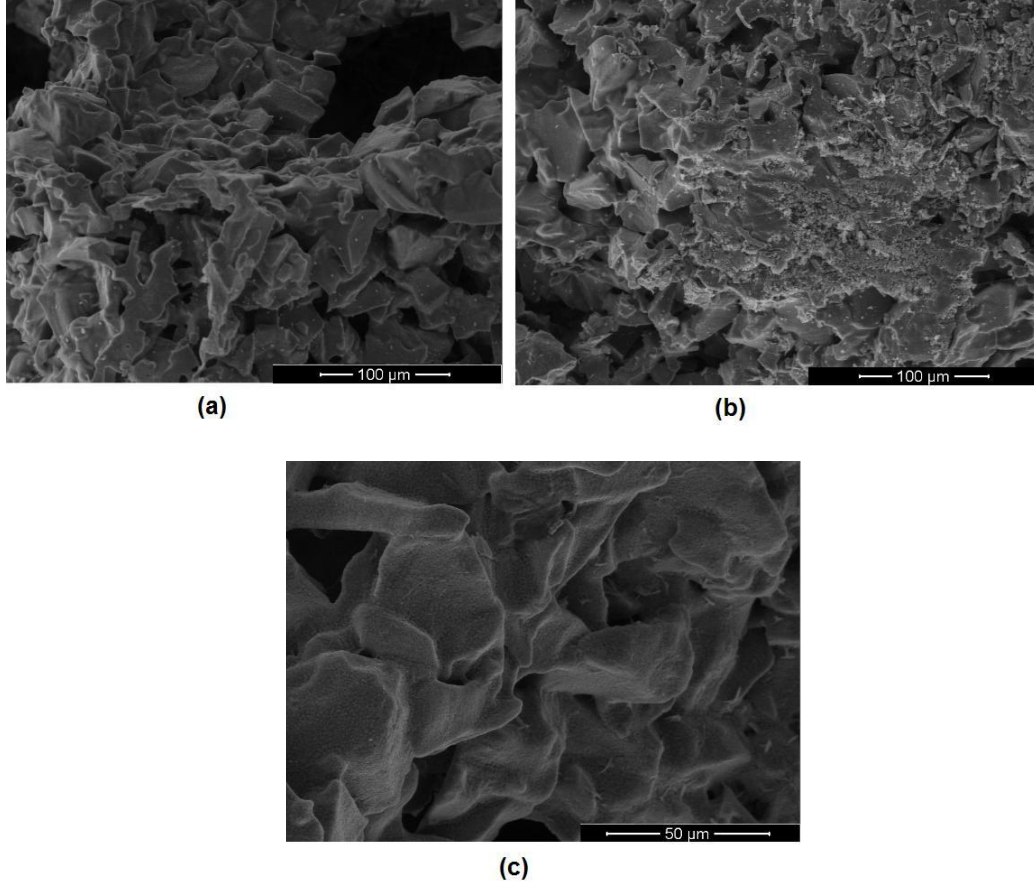
Ayrıca, kaplama sonrası gözeneklerde herhangi bir tıkanma görülmemiş ve gözenekler arasındaki bağlantı da korunmuştur.

28 gün süreyle SBF’de bekletilen numunelerin yüzeylerinde HA kristallerinin oluşumu belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 6.20-6.23 (b)). HA tabakasının oluşumunun yapı iskelesi yüzeyi ile SBF çözeltisi arasındaki iyonların değişimi esasına dayandığı bilinmektedir. Bununla birlikte, aljinat biyoaktif bir polimer olduğu için, polimer kaplı yapı iskelelerinde aljinatın yüzeyinde de HA tabakasının oluşumu gerçekleşmiştir. Ayrıca, SBF’de bekletme sonrasında aljinat kaplı numunelerin yüzeyinde çok fazla sayıda küçük gözenekler oluşmuş ve buradan da yapı iskelelerinin biyobozunur olduğu sonucuna varılmıştır. Bu da, aljinat ve SBF ortamı arasındaki iyon değişimi dikkate alınarak açıklanabilir. İyonik olarak çapraz bağlı aljinatın, doku kültürü ortamı, SBF ya da diğer biyolojik çözeltilerde şişmeye ve hatta çözünmeye yatkın olduğu bilinmektedir. Bakır iyonlarının aljinat matrisinde çözünmüş olabileceği ve bu yüzden kaplamanın daha büyük miktarda su alıp daha hızlı bozunmasına yol açtığı düşünülmektedir. Polimer kaplamadaki küçük boşluklar, aljinat yapısının açık halini kanıtlamaktadır [7]. Şekil 6.21 (c)’ de aljinat kaplamalı numunenin yüzeyinde küçük gözeneklerin görülmesi, bu bilgiyi doğrulamaktadır. Benzer durum, 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı numunede de görülmüştür (Şekil B.1). SBF sonrasında yapı iskelelerinin gözenekli yapısı bozulmamış, gözenek çapları bütünlüğünü korumuştur ve yapının hala sağlam olduğu gözlenmiştir.

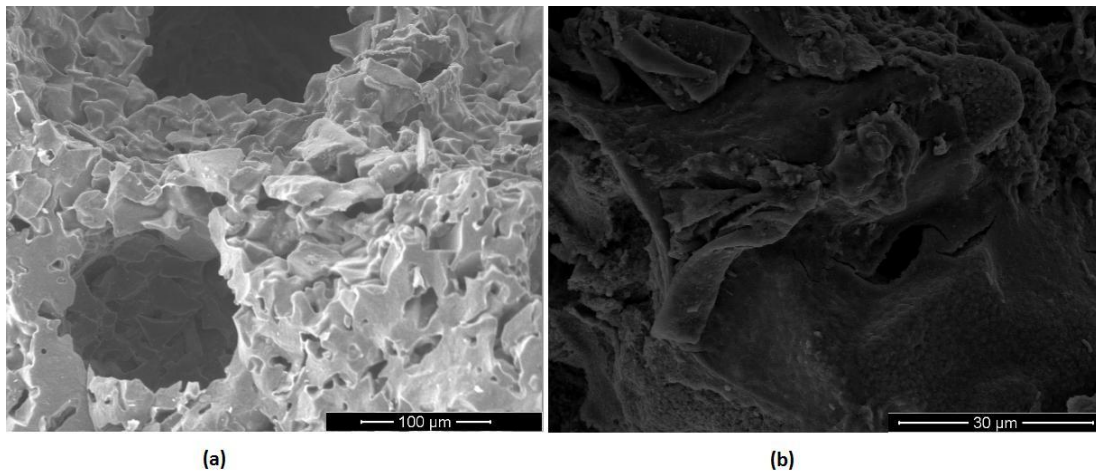


Şekil 6.21: 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlanmış ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.

Şekil 6.22 (b)'de SBF'de bekletilmeden önce yapı iskelelerinin yüzeyinde görülen küçük beyaz parçacıklar bakırdan kaynaklanmaktadır ve bu da bakır çapraz bağlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini kanıtlamaktadır.

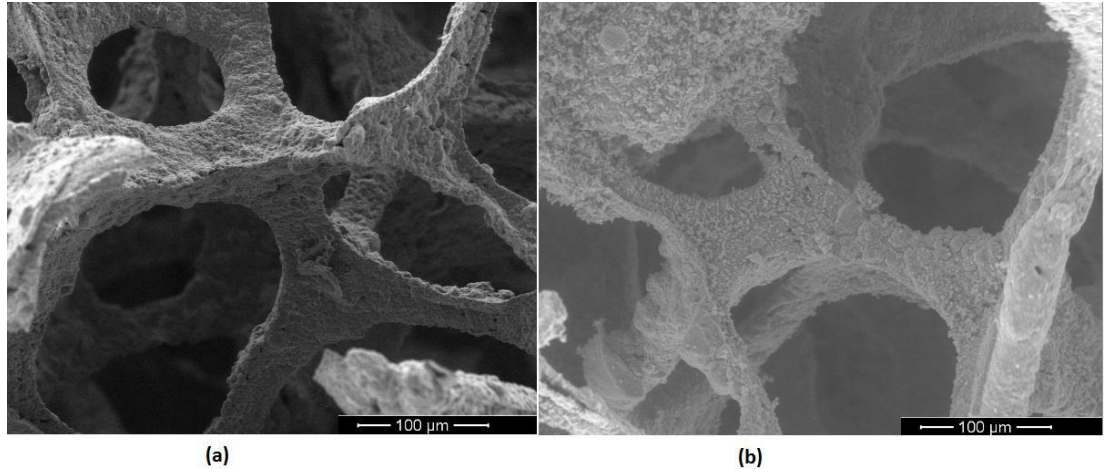


Şekil 6.22 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlanmış ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF'de bekletilmeden önce (b) SBF'de bekletilmeden önce (yakınlaştırılmış görüntü) (c) SBF'de 28 gün bekletme sonrası.

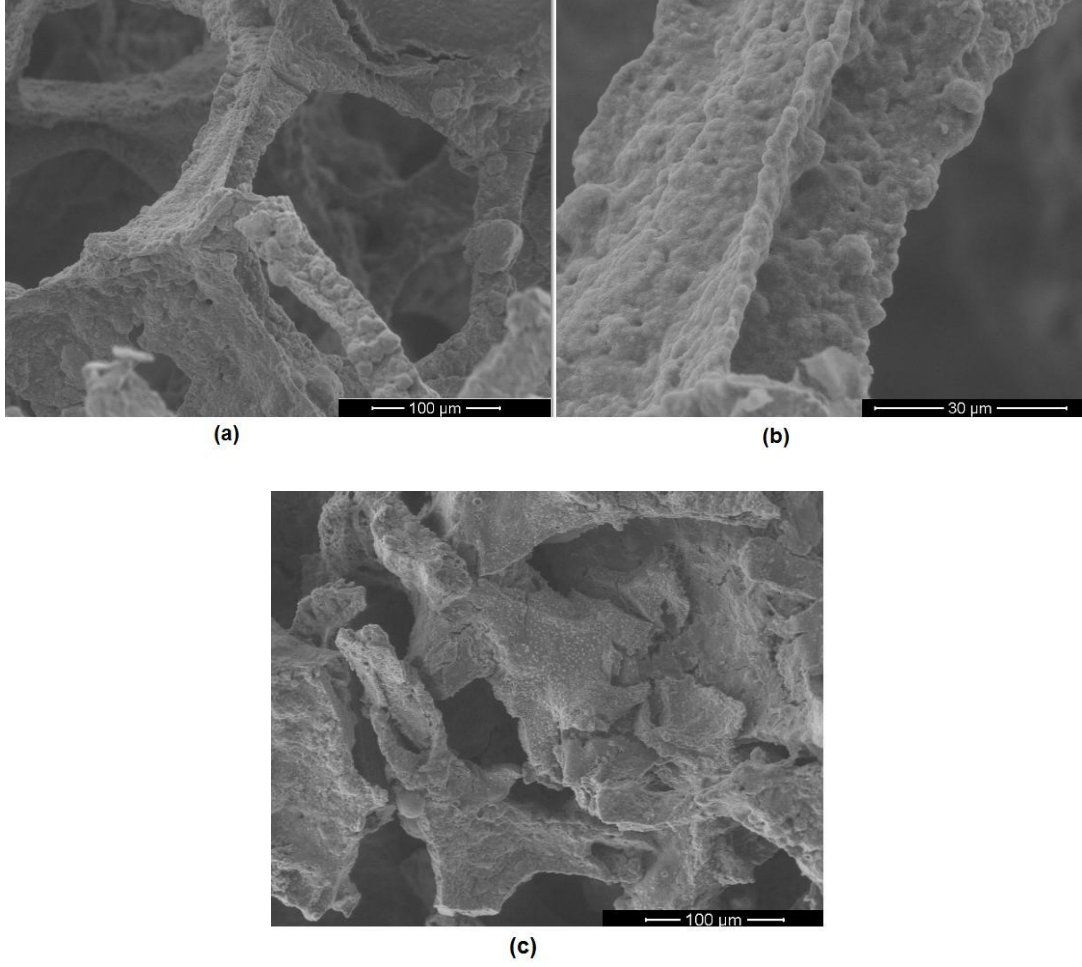


Şekil 6.23 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlanmış ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF'de bekletilmeden önce (b) SBF'de 28 gün bekletme sonrası.

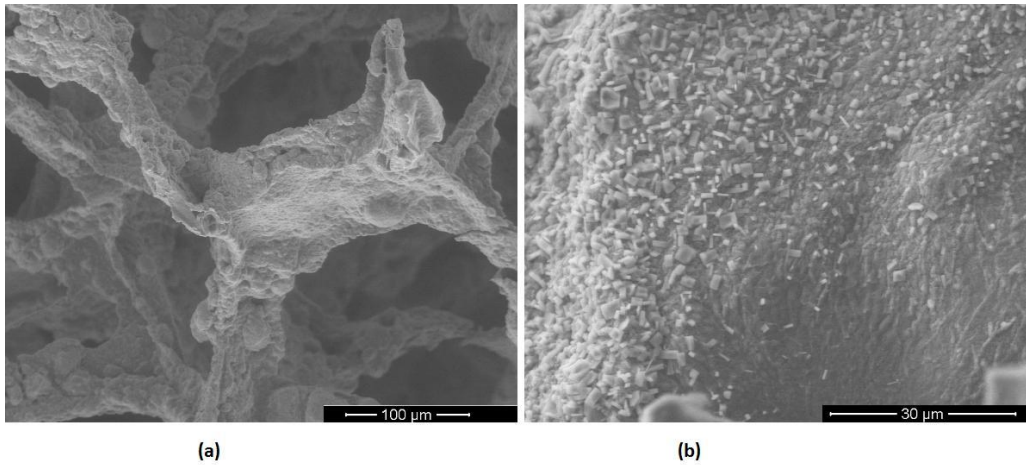
Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelelerinin SBF’de bekletilmeden önce ve SBF’de 28 gün bekletildikten sonraki SEM görüntüleri Şekil 6.24-6.26’da verilmiştir. SBF’de bekletilmeden önceki görüntüler incelendiğinde, kullanılan poliüretan süngerin yapısına benzer üç boyutlu, açık ve birbirine bağlı bir makroyapının olduğu gözlenmiştir. Yapı iskelelerinin SBF’de bekletilmeden önceki gözenek çaplarının, yaklaşık olarak 200-400 µm aralığında değiştiği saptanmıştır. Bu makrogözenek yapısı, yapı iskelelerinin hücre kültürü çalışmalarında kullanılabileceğini işaret etmektedir. 45S5 biyoaktif camından üretilen numunelerde olduğu gibi, SBF’de 28 gün bekletildikten sonra bakırlı camdan üretilen tüm numunelerin de yüzeylerinde belirgin şekilde HA kristalleri görülmektedir (Şekil 6.24 (b), Şekil 6.25 (c), Şekil 6.26 (b), Şekil 6.27 (b)). Şekil 6.25 (b)’de, aljinatın yapı iskelesini homojen bir şekilde kapladığı ve makrogözenekli yapıda herhangi bir gözenek tıkanmasına yol açmadığı görülmektedir.



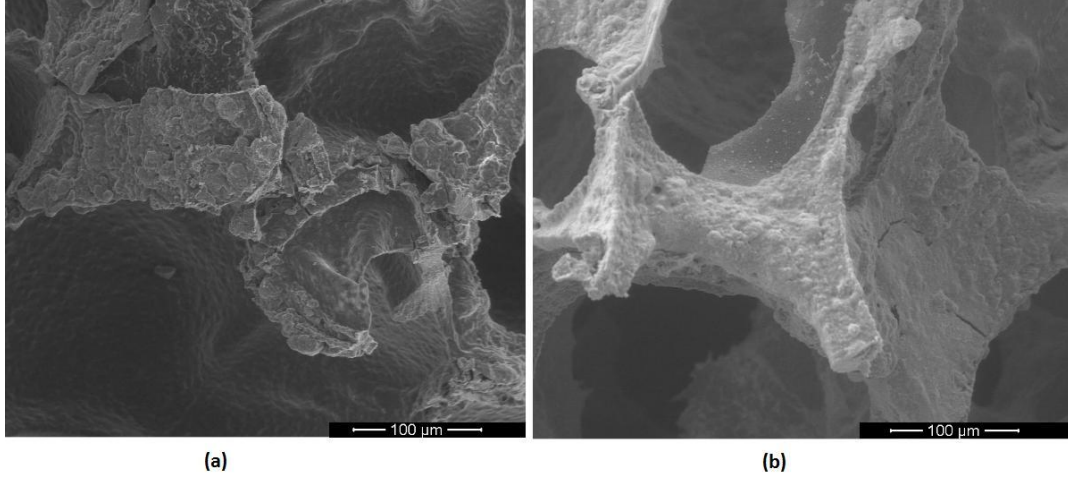
Şekil 6.24 : Bakır katkılı camdan üretilen kaplama yapılmamış yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.



Şekil 6.25 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de bekletilmeden önce (yakınlaştırılmış görüntü) (c) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.



Şekil 6.26: Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %2 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.



Şekil 6.27 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.

SEM görüntüleri; bakır çapraz bağlanmış aljinat kaplı ve bakır katkılı camdan üretilmiş yüksek gözenekliliğe ve gözenekler arasındaki bağlantıya sahip olan yapı iskelelerinin; kemik doku mühendisliği uygulamalarında hücre bağlanması, göçü ve vaskülarizasyon için uygun adaylar olduğunu doğrulamaktadır [7].

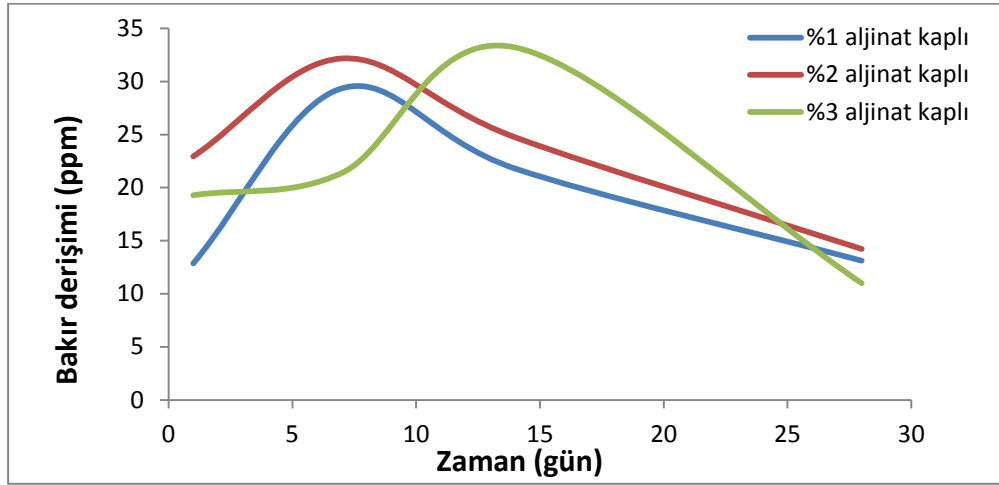
6.4.4 Yapı iskelesi numunelerinin bakır iyonu salımı analizleri

Yapı iskelesi numunelerinin in vitro koşullarda bakır iyonu salımlarını incelemek için ICP analizi yapılmıştır. 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlı aljinat kaplı ve bakır katkılı camdan üretilen (aljinat kaplı ve kaplanmamış) yapı iskelelerinin 1, 7, 14 ve 28 gün SBF içerisinde bekletildikten sonra, bakır iyonlarının SBF çözeltisinde zamana bağlı olarak değişen derişimleri ICP analizi ile tespit edilmiştir. 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlı aljinat kaplı yapı iskelesi numunelerinin SBF çözeltisinde zamana bağlı bakır salımları incelendiğinde, bakır derişiminin 1-7 gün süreleri arasında arttığı, 7-28 gün bekletme sürelerinde ise zamanla azaldığı görülmektedir (Şekil 6.28). 28 gün SBF’de bekletme sonrasında %1, %2 ve %3 aljinat kaplı numunelerin, sırasıyla son derişimleri, 13 ppm, 14 ppm ve 11 ppm olarak saptanmıştır. Vasküler endotelyal büyüme faktörlerinin (VEGF) düzenlenmesi açısından optimum Cu^{+2} iyonu derişimi, 14-57 ppm değerleri arasındadır [65]. VEGF, doku etrafındaki endotelyal hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve sonunda tüp şeklindeki yapının oluşmasını sağlamaktadır [2]. Şekil 6.28’de görüldüğü gibi, bakır çapraz bağlı aljinat kaplı yapı iskeleleri için 1, 7 ve 14 günün sonunda ulaşılan bakır derişimleri optimum değerler aralığında

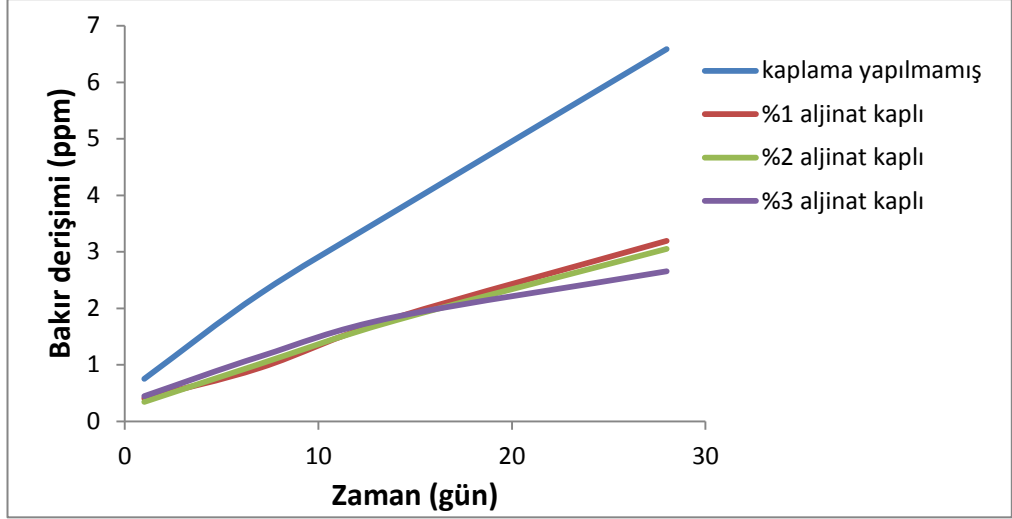
kalmaktadır. 28. günün sonunda ise, yalnızca %2 aljinat kaplı numunenin bakır salım değeri bu aralıktadır. Yapı iskelelerinden salınan bakır iyonlarının derişimlerinin, sitotoksik etkiye neden olacak kadar yüksek olmadığı (58 ppm altı) belirlenmiştir.

Bakır katkılı camdan üretilen aljinat kaplı yapı iskelesi numunelerinin SBF çözeltisi içerisindeki bakır derişimi, Şekil 6.29’da görüldüğü gibi zamanla artmaktadır. Yapı iskelelerinin 28 gün SBF’de bekletme sonrasında ulaşılan son bakır derişimleri; kaplamasız, %1, %2 ve %3 kaplamalı olmak üzere sırasıyla 6.6 ppm, 3 ppm, 3ppm ve 2.7 ppm olarak bulunmuş ve aljinat kaplama derişimi arttıkça bakır salımının azaldığı görülmüştür. Bakırın aljinat ile çapraz bağlı olduğu numunelerle karşılaştırıldığında, bakır katkılı camdan salınan bakır miktarı daha düşük derişimlerde seyretmektedir. Hücre içerisinde bakır seviyesinin zehirli etkiye neden olma sınırının 58 ppm olduğu bilinmektedir [7]. Bu bilgiye göre, üretilen bütün yapı iskelelerin vücutta zehirli bir etkiye neden olmayacağı ön görülmektedir.

Bütün sonuçlar incelediğinde, bakır çapraz bağlı aljinat kaplı yapı iskelelerinin bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelelerine göre anjiyojenezi uyarma kapasitesinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 6.28 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlı aljinat kaplı yapı iskelelerinin SBF çözeltisindeki bakır derişiminin zamana bağlı değişimi.



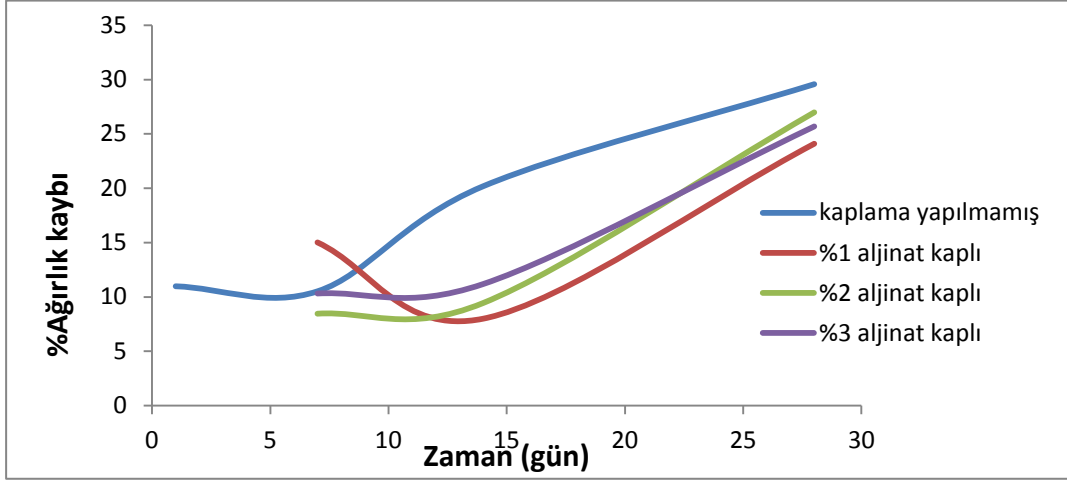
Şekil 6.29 : Bakır katkıli biyoaktif camdan üretilen yapı iskelelerinin SBF çözeltisindeki bakır derişiminin zamana bağıli değışimi.

6.4.5 Yapı iskelesi numunelerinin in vitro biyobozunurluk çalışmaları

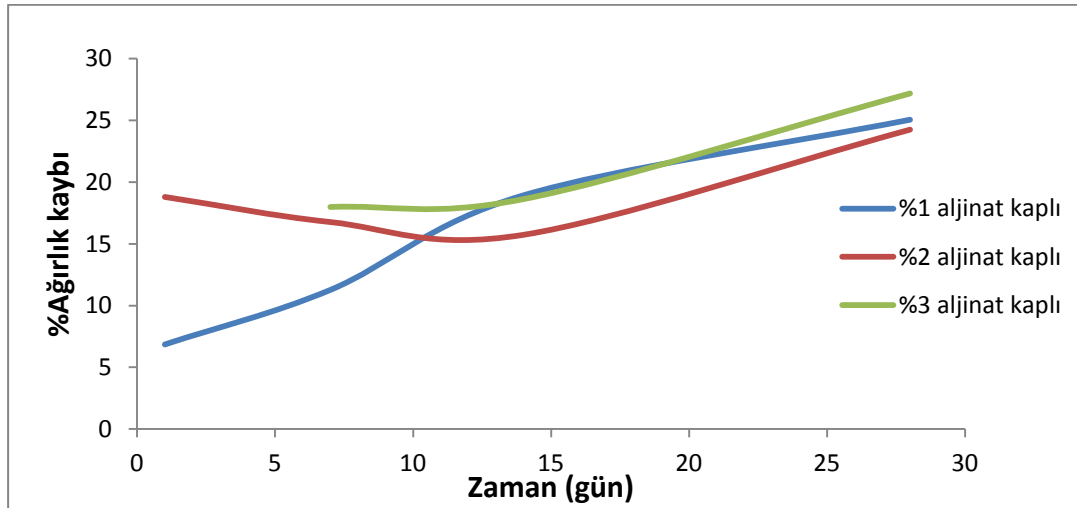
Kemik doku mühendisliğinde kullanılan yapı iskelelerinin, yeni kemik dokusunun oluşumu ile birlikte vücuttan atılması (biyobozunurluk davranışı) önemli bir konudur. Yapı iskelesi numunelerinin in vitro koşullarda biyobozunurluk davranımlarının incelenmesi amacıyla, ağırlık kaybı ile su absorpsiyonları hesaplanmıştır. Üretilen yapı iskelelerinin biyobozunurluk davranımlarını incelemek için, SBF’de bekletilmeden önceki ağırlıkları ile SBF’de 1, 7, 14 ve 28 gün bekletildikten sonraki ıslak ve kuru ağırlıkları alınarak, zamanla yüzde ağırlık kaybı ve yüzde su absorplama değıerleri hesaplanmıştır.

45S5 biyoaktif camından üretilen numunelerin zamana bağıli yüzde ağırlık kaybı değıerleri Şekil 6.30 ve Şekil 6.31’de verilmiştir. SBF’de bekletme süresi arttıkça genel olarak, ağırlık kaybının arttığı görölmektedir. Aljinat kaplaması yapılmamış numunelerin ağırlık kaybı değıerleri, kaplama yapılan numunelere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durumda, aljinat kaplamanın yapı iskelesinin biyobozunurluğunu geciktirdiğı anlaşılmaktadır. SBF’de bekletme süresi arttıkça aljinatın su alıp şiştiğı ve bu nedenle de aljinat kaplı yapı iskelelerinin ağırlık kaybının daha az olduğı düşünölmektedir. Ayrıca, 45S5 biyoaktif camından üretilen aljinat kaplı numunelere bakır çapraz bağılama işleminin yapılması ile numunelerin ağırlık kaybı değıerleri, çapraz bağılama yapılmamış numuneler ile aynı değıerlerde seyretmektedir. Bu sonuçtan da, çapraz bağılama yapılmasının ağırlık kaybını çok fazla etkilemediğı anlaşılmaktadır. SBF’de 28 gün bekletildikten sonra, 45S5 biyoaktif camından

Üretilen yapı iskelelerinin (kaplama yapılmış ve yapılmamış) ağırlık kaybı değerleri %30'un altında ve birbirine yakındır (şekil 6.30 ve şekil 6.31).



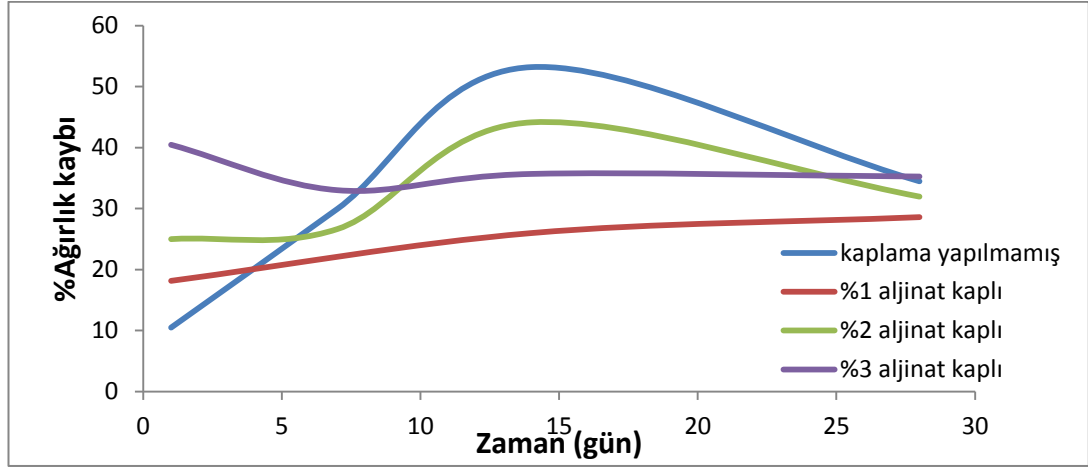
şekil 6.30 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % ağırlık kayıpları.



şekil 6.31 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır çapraz bağlı aljinat kaplı yapı iskelelerinin zamana bağlı % ağırlık kayıpları.

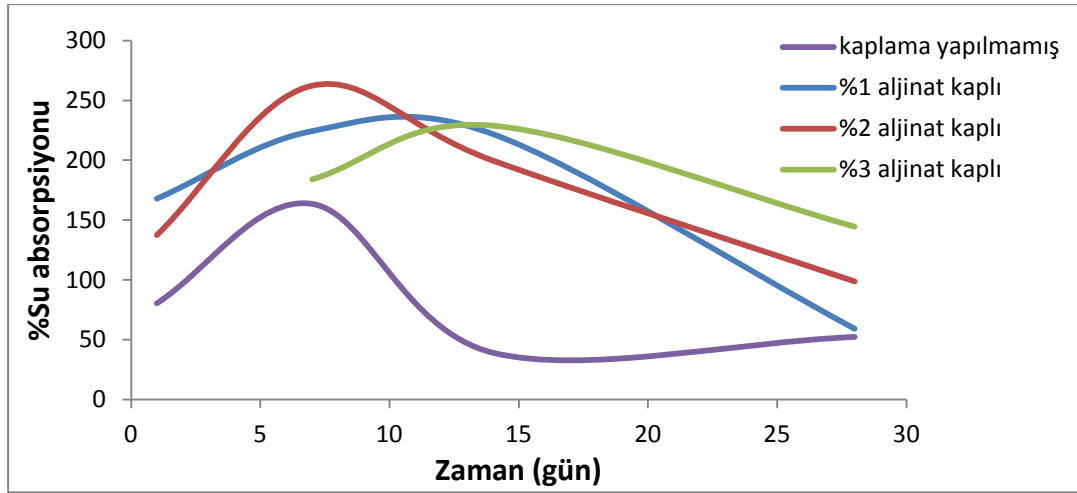
Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % ağırlık kaybı değerleri şekil 6.32'de verilmiştir. 45S5 biyoaktif camından üretilen numuneler ile kıyaslandığında, bakır katkılı camdan üretilen numunelerin 28. gün sonunda ağırlık kaybı değerleri daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, bakır katkılı camların biyobozunurluk hızlarının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Kalsiyum ile bakırın atom çapları birbirine yakın olduğu için, 45S5 cam bileşiminde kalsiyum oranı azaltılıp aynı oranda bakır ilavesi ile camın bileşimi değiştirilmiştir. Bakır katkılı camların daha çabuk biyobozunurluk göstermesi, camın bileşiminin değiştirilmesi ile sağlam bir yapının oluşmadığı sonucunu vermektedir. Ayrıca, 45S5

camından üretilen numunelerde olduğu gibi aljinat kaplanması ile ağırlık kaybının azalması, aljinatın su alıp şiştiğini ve yapı iskelelerinin biyobozunurluğunu geciktirdiğini göstermiştir.

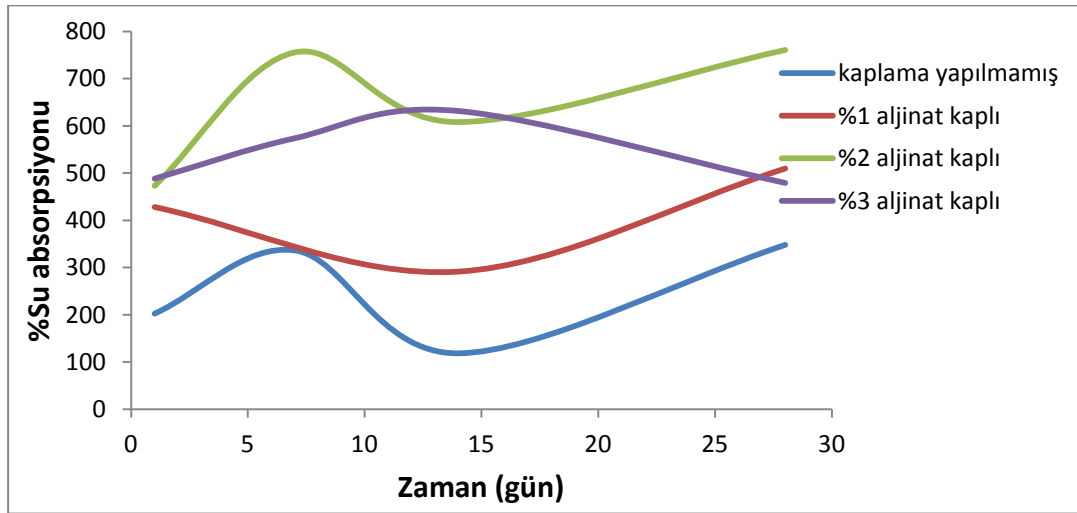


Şekil 6.32 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % ağırlık kayıpları.

Şekil 6.33 ve Şekil 6.34’de 45S5 ve bakır katkılı camlardan üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % su absorpsiyonları görülmektedir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere tasarlanan üç boyutlu yapı iskelelerinin su absorpsiyon kabiliyeti ile hücrelerin üç boyutlu yapı içerisine nüfuzu kolaylaşmaktadır. Su absorpsiyonu daha yüksek olan yapı iskeleleri daha geniş yüzey alanı/gözenek hacmine sahiptir [31]. Yapı iskelelerine kaplama yapılması ile su absorplama değerlerinin artması, aljinatın su alarak şiştiğini göstermektedir. İn vitro biyobozunurluk çalışmaları sonucunda, aljinat ile kaplı tüm yapı iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için uygun olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6.33 : 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % su absorpsiyonları.



Şekil 6.34 : Bakır katkılı camdan üretilen yapı iskelelerinin zamana bağlı % su absorpsiyonları.

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

7.1 Sonuçlar

45S5 (bileşimi ağırlıkça; %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅ ve %24.5 CaO) ve bakır katkılı (bileşimi ağırlıkça; %45 SiO₂, %24.5 Na₂O, %6 P₂O₅, %2 CuO ve %22.5 CaO) biyoaktif camlar esas alınarak kompozit yapı iskelesi üretiminin gerçekleştirildiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- 1) 45S5 ve bakır katkılı biyoaktif camlara 20 K/dakika'lık ısıtma hızı ile DTA uygulanması sonucunda, numunelerin camsı geçiş sıcaklıkları sırasıyla 852 K ve 819 K olarak saptanmıştır.
- 2) Bakır katkılı cam numunesine yapılan XRD analizi sonucunda, amorf camsı yapının oluştuğu gözlenmiştir.
- 3) Biyoaktif cam numunelerinin yapılarındaki kimyasal bağların belirlenmesi amacıyla yapılan FTIR analizi sonucunda, amorf camsı yapının göstergesi olan Si-O-Si ve Si-O bağlarına ait pikler görülmüş ve bakır katkısı ile camın yapısında belirgin bir farklılık oluşmadığı tespit edilmiştir.
- 4) Yapay vücut sıvısında 28 gün bekletilen yapı iskelelerine uygulanan XRD analizi sonucunda, tüm numunelerde hidroksiapatite ait karakteristik pik tespit edilmiştir.
- 5) 45S5 camından üretilmiş aljinat kaplı (bakır çapraz bağlı ve çapraz bağlama yapılmamış) ve bakır katkılı camdan üretilmiş aljinat kaplı ve kaplanmamış yapı iskelelerine SBF'de bekletilmeden önce uygulanan FTIR analizi sonucunda; kaplama yapılan numunelerde aljinatın karboksil, hidroksil, mannuronik asit ve guluronik asit bileşenlerine ait piklerin tespit edilmesi ile kaplamanın başarılı bir şekilde yapıldığı anlaşılmıştır. SBF'de 1 gün bekletildikten sonra numunelerin yapısında belirgin bir farklılık gözlenmezken, 28 gün bekletme sonrasında camsı yapıya ait Si-O-Si gerilme bandının yerini P-O asimetric gerilme bağı almış ve Si-O bağının yeri kayarak CO₃⁻² ve HPO₄⁻² iyonlarının ortak katkısı ile oluşan yeni bir pik ortaya çıkmıştır. Bu bağlar, 28 gün SBF'de bekletilen tüm numunelerin yüzeyinde hidroksiapatit tabakasının oluştuğunu göstermiştir.

6) Yapı iskelesi numunelerine SBF’de bekletilmeden önce uygulanan SEM analizi sonucunda, her iki camdan üretilen yapı iskelelerinin oldukça yüksek gözenekliliğe sahip oldukları ve gözenekler arasındaki bağlantılarının da iyi durumda olduğu gözlenmiştir. Aljinat kaplama ile numunelerin gözeneklerinde herhangi bir tıkanma olmadığı tespit edilmiştir. Numunelerin gözenek çapları 100-240 µm değerleri arasında bulunmuş ve bu da yapı iskelelerinin hücre kültürü çalışmalarında kullanılabilecek makrogözenekli yapıya sahip olduklarını göstermiştir. Ayrıca, tüm yapı iskelelerinin gözenek duvarlarının sağlam olduğu belirlenmiştir.

7) SBF’de 28 gün bekletilen yapı iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde, tüm numunelerin yüzeyinde belirgin bir şekilde oluşan hidroksiapatit kristalleri gözlenmiştir. Ancak, bakır katkılı ve aljinat kaplı yapı iskelelerinin yüzeylerinde daha yoğun bir HA tabakasının olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, bakır katkısı ile aljinatın yapı iskelelerinin biyoaktivitesini artırdığını göstermektedir. Ayrıca numunelerin yüzeylerinde çok sayıda oluşan küçük gözenekler, üretilen yapı iskelelerinin in vitro koşullarda biyobozunur özelliğe sahip olduklarını kanıtlamıştır.

8) ICP analizi sonucunda, 45S5 camından üretilen bakır ile çapraz bağlı aljinat kaplı yapı iskelelerinin bakır iyonu salımının, bakır katkılı camdan üretilen numunelere göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç; çapraz bağlı bakırın, cama bakır katılması ile kıyaslandığında, anjiyojenezi uyarma kapasitesini artırdığını göstermiştir. Ayrıca, tüm numunelerin bakır iyonu salımının, bakırın vücutta toksik etkiye neden olma sınırının (58 ppm) altında kaldığı belirlenmiştir.

9) Yapı iskelelerinin in vitro biyobozunurluk çalışmaları sonucunda, bakır katkılı camlardan üretilen yapı iskelelerinin ağırlık kaybı, 45S5 biyoaktif camından üretilen yapı iskelelerine göre daha fazla bulunmuş ve SBF’de bekletme süresi arttıkça ağırlık kaybının da arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, bakır katkılı biyoaktif camın biyobozunurluğunun daha yüksek olması ile açıklanabilir. Ayrıca, aljinat ile kaplanan numunelerin ağırlık kayıplarının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Aljinatın in vitro ortamda su emme kabiliyetinin yüksek olması nedeniyle, yapı iskelelerinin ağırlık kaybı azalmıştır. Bu sonuç, aljinat kaplı yapı iskelelerinin su absorpsiyon değerlerinin yüksek olmasını açıklamaktadır.

10) Tüm yapı iskelelerinin aljinat ile kaplanarak kompozit malzeme üretilmesiyle, gözenekli yapılarının ve biyoaktivite özelliklerinin çok fazla değişmediği, ancak biyobozunurluk özelliklerinin olumlu yönde etkilendiği saptanmıştır.

7.2 Öneriler

- 1) Üretilen yapı iskelelerinin hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilerek, in vitro koşullarda biyobozunma ve biyoaktiflik davranımları incelenebilir.
- 2) Bakır katkılı biyoaktif camlardan üretilen aljinat kaplı yapı iskelelerine, bakır iyonu çapraz bağlanarak in vitro koşullarda bakır iyonu salımı yükseltilerek numunelerin anjiyojenik özellikleri geliştirilebilir.
- 3) Yapı iskelelerine kaplama yapılırken, aljinat yerine doğal ya da sentetik farklı polimerler kullanılarak üç boyutlu kompozit yapı iskelesi üretimi gerçekleştirilebilir.
- 4) Yapay vücut sıvısında numuneler daha uzun süre bekletilerek, in vitro koşullarda biyobozunurluk davranımlarının zamanla değişimi gözlemlenebilir.
- 5) Yapı iskelesi numunelerinin mekanik özellikleri ayrıntılı olarak incelenerek, aljinatın etkileri aydınlatılabilir.
- 6) Bakır gibi teröpotik etkiye sahip başka iyonların da yapı iskelelerinin özelliklerine olan etkisi araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Leach, J.K., Kaigler, D., Wang, Z., Krebsbach, P.H., Mooney, D.J., (2006). Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration, *Biomaterials*, **27**, 3249-3255.
- [2] Wu, C., Zhou, Y., Xu, M., Han, P., Chen, L., Chang, J., Xiao, Y., (2013). Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, *Biomaterials*, **34**, 422-433.
- [3] Zhao, S., Wang, H., Zhang, Y., Huang, W., Rahaman, M.N., Liu, Z., Wangb, D., Zhang, C., (2015). Copper-doped borosilicate bioactive glass scaffolds with improved angiogenic and osteogenic capacity for repairing osseous defects, *Acta Biomaterialia*, **14**, 185–196.
- [4] Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M.N., Tomsia, A.P., (2011) Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives, *Materials Science and Engineering C*, **31**, 1245–1256.
- [5] Rezwana, K., Chena, Q.Z., Blakera, J.J., Boccaccini, (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterialia*, **27**, 3413-3431.
- [6] Rahaman, M.N., Day, D.E., Bal, B.S., Fu, Q., Jung, S.B., Bonewald, L.F., Tomsia, A.P., (2011). Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, **7**, 2355–2373.
- [7] Erol, M.M., Mourino, V., Newby, P., Chatzistravrou, X., Roether, J.A., Hupa, L., Boccaccini, A.R., (2012). Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, **8**, 792–801.
- [8] Hoppe, A., Boccaccini, A.R., (2014). Bioactive glass foams for tissue engineering applications. In *Biomedical Foams For Tissue Engineering Applications*, Bölüm 7, 191-212, Eds., Netti, P.A., Woodhead Publishing, UK.
- [9] Diba, M., Boccaccini, A.R., (2014). Silver-containing bioactive glasses for tissue engineering applications. In *Precious Metals for Biomedical Applications*, Bölüm 9, 177-211, Eds., Baltzer, N., Copponnex, T., Elsevier.
- [10] Hosseinabadi, M.E., Ashrafizadeh, F., Etemadifar, M., Venkatraman, S.S., (2011). Preparation and mechanical behavior of PLGA/nano-BCP composite scaffolds during in-vitro degradation for bone tissue engineering, *Polymer Degradation and Stability*, **96**, 1940-1946.

- [11] **Chen, Q., Roether, J. A., Boccaccini, A. R.,** (2008). *Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials*, Eds., Ashammakhi, N., Reis, R. and Chiellini, F., **Vol.4**, Bölüm 6, 1-21.
- [12] **He, Wei, Benson, R.,** (2011). Polymeric Biomaterials. In *Applied Plastics and Engineering Handbook*, Bölüm 10, 159-175, Ed., Ebnesajjad, S., Elsevier Inc., USA.
- [13] **Mallick, K. K., Winnett, J.,** (2014). 3D bioceramic foams for bone tissue engineering. In *Bone Substitute Biomaterials*, Bölüm 6, 118-141, Eds. Mallick, K., Elsevier Ltd, UK.
- [14] **Kulinets, I.,** (2015). Biomaterials and their applications in medicine. In *Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices*, Bölüm 1, 1-10, Eds., Amato, S. F., Ezzell, R.M., Woodhead Publishing, USA.
- [15] **Carvalho, S.M., Oliveira, A.A.R., Lemos, E.M.F., Pereira, L&M.M.,** (2013). Bioactive Glass Nanoparticles for Periodontal Regeneration and Applications in Dentistry. In *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*, Bölüm 15, 299-303, Eds., Subramani, K., Ahmed, W., Hartsfield, J.K., Elsevier, USA.
- [16] **Lee, E.J., Kim, H.W., Knowles, J.C.,** (2015). Ceramic Biomaterials as Tissue Scaffolds. In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Bölüm 12, 163-171, Eds., Vishwakarma, A., Sharpe, P., Shi, S., Ramalingam, M., Elsevier, UK.
- [17] **Kim, J., Bahattacharyya, S., Ducheyne, P.,** (2011). Bioactive Ceramics and Bioactive Ceramic Composite-Based Scaffolds, Bölüm 5.520, 255-265, Elsevier, USA.
- [18] **Shirtliff, V.J., Hench, L.L.,** (2003). Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair, *Journal of Material Science*, **38**, 4697-4707.
- [19] **Jones, J.R.,** (2007). Bioactive ceramics and glasses. In *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*, Bölüm 3, 52-71, Eds., Boccaccini, A.R., Gough, J., Woodhead Publishing.
- [20] **Cao, W., Hench, L.L.,** (1996). Bioactive Materials, *Ceramics International*, **22**, 493-507.
- [21] **Jones, J.R.,** (2013). Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomaterialia*, **9**, 4457-4486.
- [22] **Bui, X.V., Nguyen, V. B., Doc, Q. M.** (2013). "In vitro" Apatite Formation on the Surface of Bioactive Glass, *Glass Physics and Chemistry*, Cilt **39**, Sayı 1, 64-66.
- [23] **Ravarian, R., Moztarzadeh, F., Hashjin, M. S., Rabiee, S. M., Khoshaklagh, P., Tahriri, M.,** (2010). Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite, *Ceramics International*, **36**, 291-297.
- [24] **Pacheco, V.M., Hench, L.L., Boccaccini, A.R.,** (2015). Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues, *Acta Biomaterialia*, **13**, 1-15.

- [25] Wang, H., Zhao, S., Zhou, J., Shen, Y., Huang, W., Zhang, C., Rahamanc, M.N., Wang, D., (2014). Evaluation of borate bioactive glass scaffolds as a controlled delivery system for copper ions in stimulating osteogenesis and angiogenesis in bone healing, *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 8547-8557.
- [26] Zhao, S., Li, L., Wang, H., Zhang, Y., Cheng, X., Zhou, N., Rahaman, M.N., Liu, Z., Huang, W., Zhang, C., (2015). Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model, *Biomaterials*, 53, 379-391.
- [27] Goh, Y.F., Alshemary, A.Z., Akram, M., (2014). Bioactive Glass: An In-Vitro Comparative Study of Doping with Nanoscale Copper and Silver Particles, *International Journal of Applied Glass Science*, 5, 255–266.
- [28] Aina, V., Cerrato, G., Martra, G., Malavasi, G., Lusvardi, G., Menabue, L., (2013). Towards the controlled release of metal nanoparticles from biomaterials: Physico-chemical, morphological and bioactivity features of Cu-containing sol–gel glasses, *Applied Surface Science*, 283, 240-248.
- [29] Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., Kenny, J.M., (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polymer Degradation and Stability*, 95, 2126-2146.
- [30] Okamoto, M., John, B., (2013). Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds, *Progress in Polymer Science*, 38, 1487-1503.
- [31] Peter, M., Binulal, N.S., Nair, S.V., Selvamurugan, N., Tamura, H., Jayakumar R., (2010). Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering, *Chemical Engineering Journal*, 158, 353–361.
- [32] Nair, L.S., Laurencin, C.T., (2007). Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress In Polymer Science*, 32, 762–798.
- [33] Correlo, V.M., Oliveira, J.M., Mano, J.F., Neves, N.M., & Reis, R.L. (2011). Natural origin materials for bone tissue engineering–properties, processing, and performance. In *Principles of Regenerative Medicine*, Bölüm 32, Part 3, 557–586.
- [34] Zhang, Z., Ortiz, O., Goyal, R., Kohn, J., (2014). Biodegradable Polymers. In *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*, Bölüm 13, 303-325, Elsevier Inc.
- [35] Tripathi, A., Saravanan, S., Pattnaik, S., Moorthi, A., Partridge, N.C., Selvamurugan, N., (2012). Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 294-299.

- [36] **Sionkowska, A.**, (2011). Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review, *Progress in Polymer Science*, **36**, 1254– 1276.
- [37] **Catelas, I.**, (2011). Fibrin, In *Comprehensive Biomaterials*, Bölüm 2.217, 303-328, Eds., Ducheyne, P., Healy, K., Hutmacher, D.E., Grainger, D.W., Kirkpatrick, C.J., Elsevier.
- [38] **Collins, M.N., Birkinshaw, C.**, (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering-A review, *Carbohydrate Polymers*, **92**, 1262-1279.
- [39] **Ryszkowska, J.L., Auguscik, M., Sheikh, A., Boccaccini, A.R.**, (2010). Biodegradable polyurethane composite scaffolds containing Bioglass[®] for bone tissue engineering, *Composites Science and Technology*, **70**, 1894–1908.
- [40] **Samaverdi, S., Poindexter, L.K., Dyke, M.V., Goldstein, A.S.**, (2014). Synthetic Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. In *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*, Bölüm 7, 81-94, Elsevier Inc.
- [41] **Brown, J.L., Kumbar, S.G., Laurencin, C.T.**, (2012). Applications of Biomaterials in Functional Tissue Engineering. In *An Introduction to Materials Science, Society For Biomaterials*, Bölüm II.6.7, 1194-1214, Eds., Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., Academic Press.
- [42] **Rodriguez, G., Dias, J., Akira, M., Bártolo, P.**, (2013). Influence of Hydroxyapatite on Extruded 3D Scaffolds, *Procedia Engineering*, **59**, 263-269.
- [43] **Chatzistavrou, X., Newby, G.P., Boccaccini, A.R.**, (2011). Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. In *Bioactive Glasses Materials, Properties and Applications*, Eds., Ylänen, H.O., Bölüm 5, 107-128, Woodhead Publishing Limited.
- [44] **Rana, D., Arulkumar, S., Vishwakarma, A., Ramalingam, M.**, (2015). Considerations on Designing Scaffold for Tissue Engineering. In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Bölüm 10, 133-148, Eds., Vishwakarma, A., Sharpe, P., Shi, S., Ramalingam, M., Academic Press, UK.
- [45] **Salerno, A., Gutierrez, M.F., Barrio, J.S.R., Domingo, C.**, (2015). Bio-safe fabrication of PLA scaffolds for bone tissue engineering by combining phase separation, porogen leaching and scCO₂ drying, *J. of Supercritical Fluids*, **97**, 238–246.
- [46] **Liu, Y., Lim, J., Teoh, S.H.**, (2013). Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering, *Biotechnology Advances*, **31**, 688-705.
- [47] **Jones, J.R., Hench, L.L.**, (2003). Regeneration of trabecular bone using porous ceramics, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **7**, 301–307.

- [48] Jones, J.R., (2009). New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure, *Journal of the European Ceramic Society*, **29**, 1275–1281.
- [49] Bertolla, L., Dlouhy, I., Boccaccinib, A.R., (2014). Preparation and characterization of Bioglass®-based scaffolds reinforced by poly-vinyl alcohol/microfibrillated cellulose composite coating, *Journal of the European Ceramic Society*, **34**, 3379–3387.
- [50] Oladn, A., Azhar, F. F., (2014). The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite montmorillonite scaffold for bone tissue engineering, *Ceramics International*, **40**, 10061–10072.
- [51] Lacroix, J., Jallot, E., Lao, J., (2014). Gelatin-bioactive glass composites scaffolds with controlled, *Macroporosity Chemical Engineering Journal*, **256**, 9–13.
- [52] Fabbri, P., Valentini, L., Hum, J., Detsch, R., Boccaccini, A.R., (2013). 45S5 Bioglass®-derived scaffolds coated with organic–inorganic hybrids containing graphene, *Materials Science and Engineering C*, **33**, 3592–3600.
- [53] Fu, H., Fu, Q., Zhou, N., Huang, W., Rahaman, M.N., Wang, D., Liu, X., (2009). In vitro evaluation of borate-based bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication method, *Materials Science and Engineering C*, **29**, 2275–2281.
- [54] Fu, Q., Rahaman, M.N., Bal, S., Brown, R.F., Day, D.E., (2008). Mechanical and in vitro performance of 13–93 bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication technique, *Acta Biomaterialia*, **4**, 1854–1864.
- [55] How to prepare the simulated body fluid (SBF) and its related solutions,
<<http://mswebs.naist.jp/LABs/tanihara/ohtsuki/SBF/index.html>>,
24.04.2015.
- [56] Murugan, R., Ramakrishna, S., Rao, K.P., (2006). Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffold made of natural bone, *Materials Letters*, **60**, 2844–2847.
- [57] Romeis, S., Hoppe, A., Detsch, R., Boccacini, A.R., Schmidt, J., Peukert, W., (2015). Top-down processing of submicron 45S5 Bioglass® for enhanced in vitro bioactivity and biocompatibility, *Procedia Engineering*, **102**, 534 – 541.
- [58] Faure, J., Drevet, R., Lemelle, A., Jaber, N.B., Tara, A., Btaouri, H.E., Benhayoune, H., (2015). A new sol–gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst, *Materials Science and Engineering C*, **47**, 407–412.
- [59] Rezabeigi, E., Wood-Adams, P.M., Drew, R.A.L., (2014). Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol-gel process, *Materials Science and Engineering C*, **40**, 248–252.

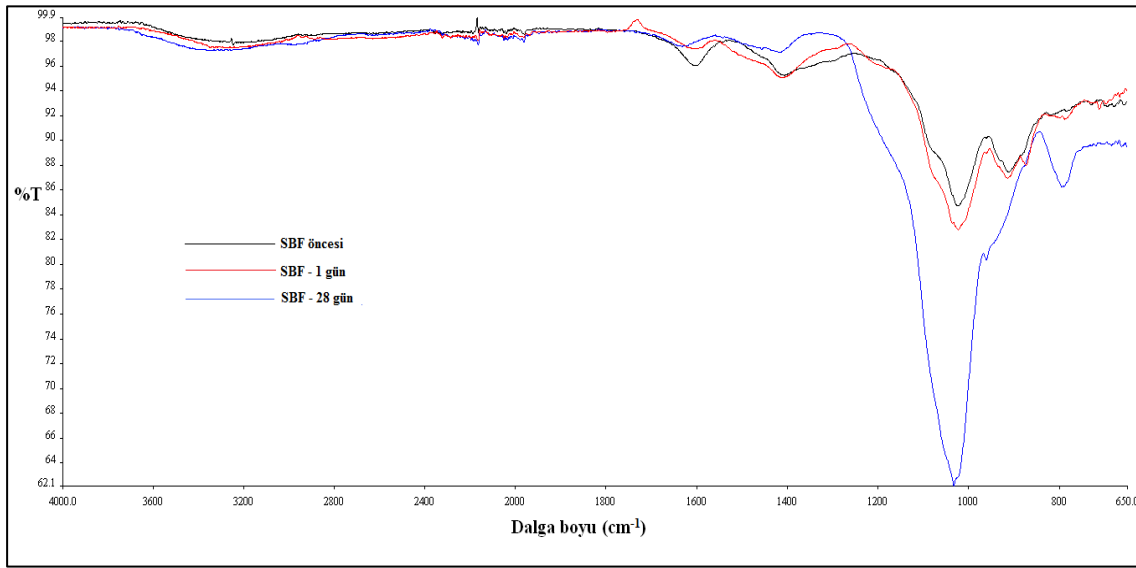
- [60] Ho, Y.C., Mi, F.L., Sung, H.W., Kuo, P.L., (2009). Heparin-functionalized chitosan–alginate scaffolds for controlled release of growth factor, *International Journal of Pharmaceutics*, **376**, 69–75.
- [61] Srinivasan, S., Jayasree, R., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Jayakumar, R., (2012). Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers*, **87**, 274–283.
- [62] Lin, K.L., Chang, J., Liu, Z., Zeng, Yi, Shen, R., (2009). Fabrication and characterization of 45S5 bioglass reinforced macroporous calcium silicate bioceramics, *Journal of the European Ceramic Society*, **29**, 2937–2943.
- [63] Khorami, M., Hesarakhi, S., Behnamghader, A., Nazarian, H., Shahrabi, S., (2011). In vitro bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass, *Materials Science and Engineering C*, **31**, 1584–1592.
- [64] Erol, M., Özyuğuran, A., Özarpıt, Ö., Küçükbayrak, S., (2012). 3D Composite scaffolds using strontium containing bioactive glass, *Journal of the European Ceramic Society*, **32**, 2747–2755.
- [65] Wang, Hui, Zhao, S., Zhou, J., Shen, Youqu, Huang, W., Zhang, C., Rahamanc,, M.N., Wang, D., (2014). Evaluation of borate bioactive glass scaffolds as a controlled delivery system for copper ions in stimulating osteogenesis and angiogenesis in bone healing, *Journal of Materials Chemistry B*, **2**, 8547–8557.

EKLER

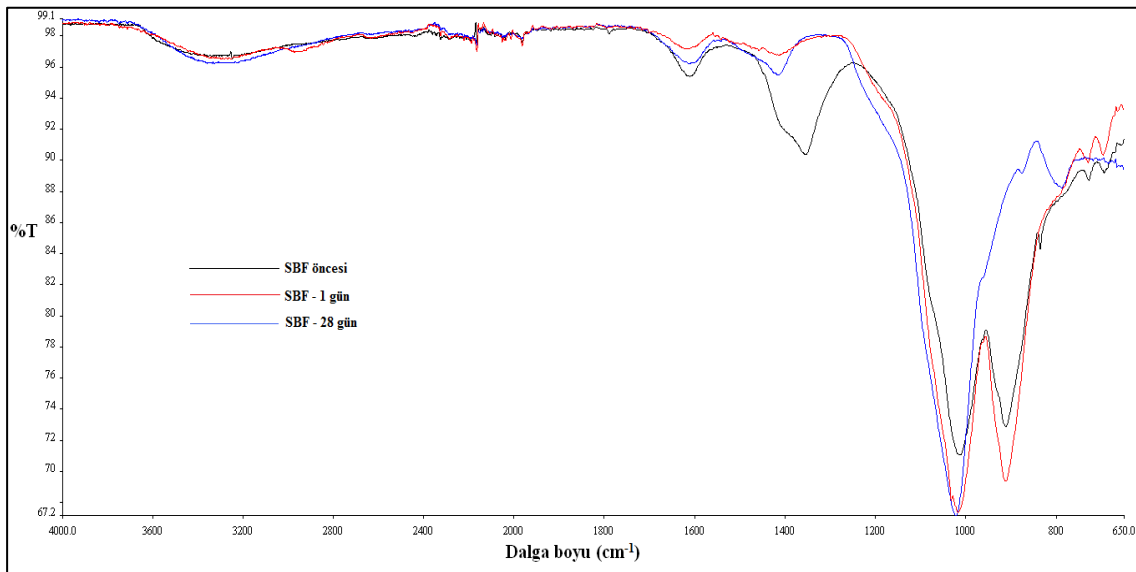
EK A : 45S5 ve bakır katkılı biyoaktif camlardan üretilen ağırlıkça %1 ve %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.

EK B : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri.

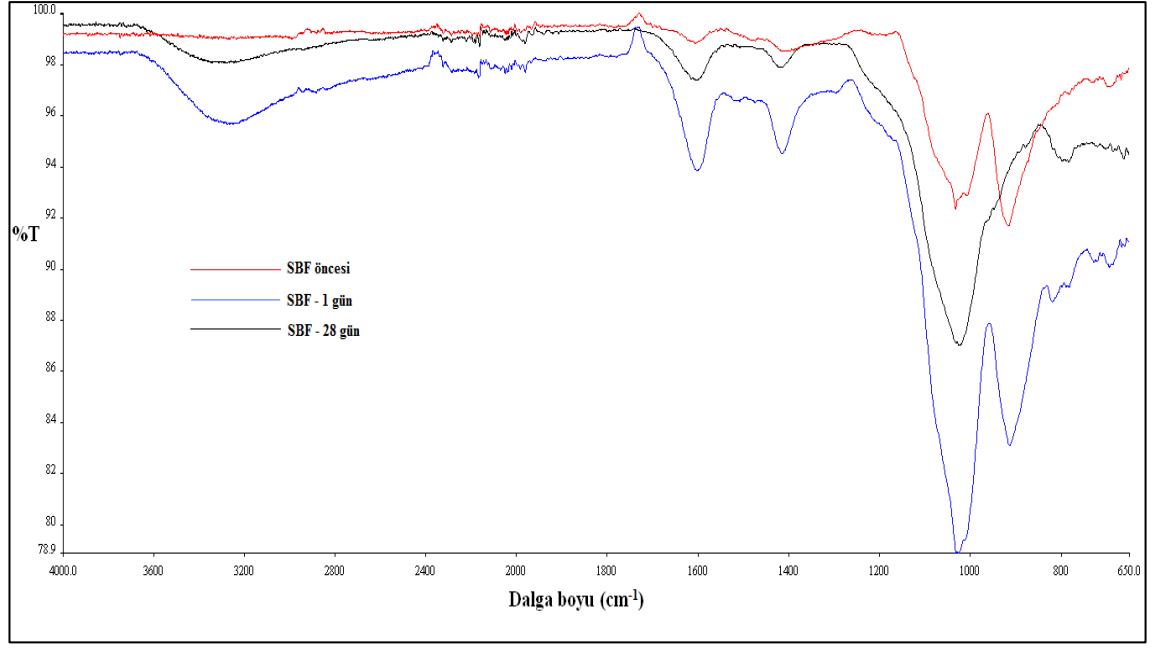
EK A



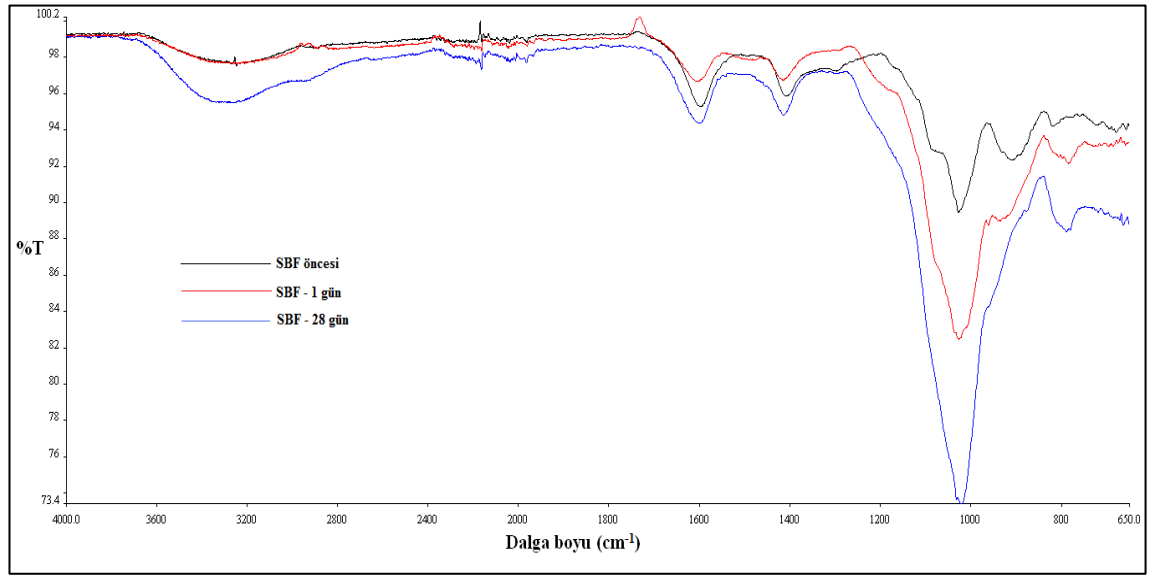
Şekil A.1 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.



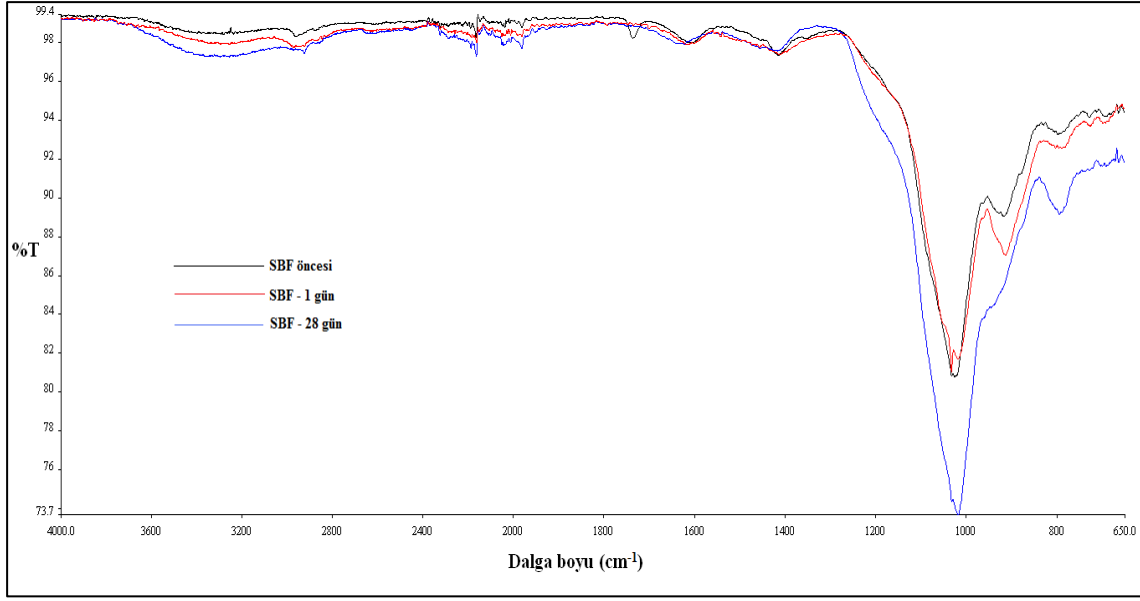
Şekil A.2 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır ile çapraz bağlanmış ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.



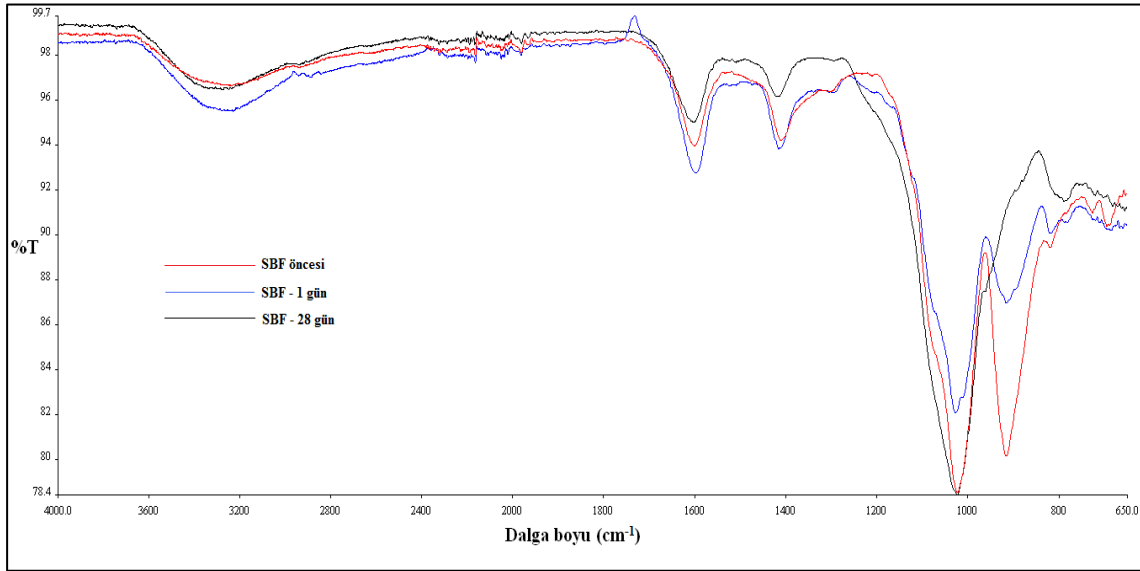
Şekil A.3 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.



Şekil A.4 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.

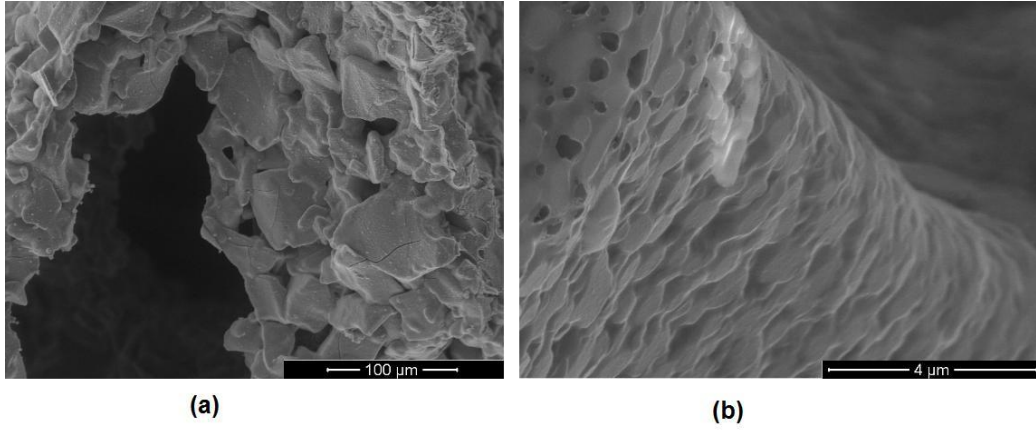


Şekil A.5 : 45S5 biyoaktif camından üretilen bakır ile çapraz bağlanmış ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.



Şekil A.6 : Bakır katkılı camdan üretilen ağırlıkça %3 aljinat kaplı yapı iskelelerinin FTIR grafikleri.

EK B



Şekil B.1 : 45S5 biyoaktif camından üretilen ağırlıkça %1 aljinat kaplı yapı iskelelerinin SEM görüntüleri (a) SBF’de bekletilmeden önce (b) SBF’de 28 gün bekletme sonrası.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad : Nuray Yerli

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul / 01.07.1990

E-Posta : yerli@itu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2012, Gazi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği