T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN KALSİYUM FOSFAT ESASLI BİYOSERAMİKLERDEN DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE ÜRÜN PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Ayşe Seda ERGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Malzeme Programı

Danışman

Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR

Ekim, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN KALSİYUM FOSFAT ESASLI BİYOSERAMİKLERDEN DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE ÜRÜN PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Ayşe Seda ERGÜN tarafından hazırlanan tez çalışması 31.10.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, Malzeme Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Burçin ÖZBAY KISASÖZ, Üye
Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Kalsiyum Fosfat Esaslı Biyoseramiklerden Doku İskelesi Üretimi Ve Ürün Performanslarının Karşılaştırılması" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ayşe Seda ERGÜN

İmza



Aileme...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, bilimsel ve manevi destekleri için danışmanım Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR'a içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin değerli tavsiyeleri, benim için birçok açıdan farklı bakış açıları kazanmamı ve kazandığım yeni bakış açılarını tez sürecinde etkili olarak kullanabilmemi sağlamıştır. Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR'ın rehberliğinde, tez çalışmaları ve mesleki faaliyetlerimde çalışma imkanı bulmak, kişisel ve profesyonel gelişimimde önemli bir rol oynamıştır. Kendisine olan minnettarlığım, sağladığı değerlerin bilincinde olmamı sürekli kılacaktır.

Öğr. Gör. Dr. Aysu AYDINOĞLU'na tez çalışmalarım sürecinde bilgi birikimi, rehberliği ve değerli katkılarıyla her zaman yanımda olduğu için teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bilgi paylaşımı, manevi destekleri ve laboratuvarda geçirdiğim her anı değerli kıldıkları için Ebru AYDIN, Abdullah TORAMAN ve Berkay ÇAĞDAŞ'a teşekkür ederim. Laboratuvar ortamında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmalarım süresince de beni destekleyen, başarılarıma ortak olan sevgili aileme teşekkür ederim. Onların sağladığı güven duygusu ve paylaştığımız heyecan, elde ettiğim ve edeceğim tüm başarıların temelini oluşturmuştur.

Ayşe Seda ERGÜN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ vii
KISALTMA LİSTESİ viii
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 4
2 KEMİK 5
2.1 Kemik 5
2.2 Kemik Travmaları ve Onarım Mekanizmaları 10
3 KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ 13
3.1 İdeal Kemik Doku İskelelerinde Bulunması Gerekli Olan Özellikler 14
3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Malzemeler 15
3.3 Kemik Doku Mühendisliği: Defekt Onarımı 17
3.4 Kemik Doku İskelelerinin Üretim Yöntemleri 19
3.4.1 Kemik Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Geleneksel Yöntemler 19
3.4.2 Kemik Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Modern Yöntemler 24
4 ANTİBAKTERİYEL KAPLAMA 37
5 DENEYSEL ÇALIŞMALAR 39
5.1 Materyal ve Yöntem 41
5.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar 41
5.1.2 Ticari Hidroksiapatit Biyoseramik Tozunun Özelliklerinin İncelenmesi 42
5.1.3 Geleneksel Yöntemle Doku İskelesi Üretimi ve Özelliklerinin İncelenmesi 42
5.1.4 Modern Yöntem (3B SLA Basım Tekniği) ile Doku İskelesi Üretimi 44
5.1.5 Antibakteriyel Kaplama İşlemi 55
5.1.6 Hücre Deneyleri ve Antibakteriyel Etki Testi 56
6 SONUÇLAR VE TARTIŞMA 59

6.1 Ticari Hidroksiapatit (THA) Biyoseramik Tozunun Özelliklerinin İncelenmesi 59
6.1.1 Ticari Hidroksiapatit (THA) Biyoseramik Tozunun Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi 59
6.2 Polimerik Sünger (PS) Yöntemi ile Üretilmiş Kemik Doku İskelelerine Ait Deneysel Sonuçlar ve Tartışma 60
6.2.1 Polimerik Sünger Yöntemi ile Üretilmiş Kemik Doku İskelelerinin Morfolojik Özellikleri 60
6.2.2 Polimerik Sünger (PS) Yöntemi ile Üretilmiş Kemik Doku İskelelerinin Kimyasal Özellikleri 62
6.3 Modern Yöntem (3B SLA Baskı) ile Üretilmiş Kemik Doku İskelelerine Ait Deneysel Sonuçlar ve Tartışma 62
6.3.1 Modifiye Ticari Hidroksiapatiti (mTHA) Biyoseramik Tozlarının Üretimi ve Özelliklerinin İncelenmesi 63
6.3.2 Biyoseramik Çamurun Kimyasal Özellikleri 65
6.3.3 Üç Boyutlu Basılmış Kemik Doku İskelelerinin Özellikleri 66
6.4 Çay Ağacı Yağı (ÇY) ile Kaplanmış Kemik Doku İskelelerine Ait Deneysel Sonuçlar ve Tartışma 72
6.4.1 ÇY ve ÇY Kaplı Kemik Doku İskelelerinin Kümülatif Salım İşlemi 72
6.4.2 Hücre Deneyleri ve Antibakteriyel Etki Testi 73
7 SONUÇ **77**
KAYNAKÇA **79**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **xci**

SİMGE LİSTESİ

dk	Dakika
g	Gram
MPa	Megapaskal
m	Metre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
θ	Teta

KISALTMA LİSTESİ

3B	Üç Boyutlu
ABS	Acrylonitrile Butadiene Styrene (Akrilonitril Butadien Stiren)
ALP	Alkaline Phosphatase (Alkalin Fosfataz)
BJ	Binder Jetting (Bağlayıcı Püskürtme)
BMP	Bone Morphogenic Protein (Kemik Morfojenik Proteini)
BTE	Bone Tissue Engineering (Kemik Doku Mühendisliği)
CAD	Computer Aided Design (Bilgisayar Destekli Tasarım)
CaP	Calcium Phosphate (Kalsiyum Fosfat)
CLIP	Continuous Liquid Interface Production (Sürekli Sıvı Arayüz Üretimi)
CO	Cinnamon Oil (Tarçın Yağı)
CO_2	Karbondioksit
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole)
DFO	Deferoxamine (Deferoksamin)
DLP	Digital Light Process (Dijital Işık Prosesi)
DOX	Doxycycline (Doksisiklin)
EBM	Electron Beam Melting (Elektron Işını Erimesi)
ECM	Extra Cellular Matrice (Ekstra Selüler Matris)
EO	Essential Oil (Uçucu Yağ)
EVA	Ethylene(vinyl acetate) [(Etilen(vinil asetat)]
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)
FDM	Fused Deposition Modelling (Eriyik Yığın Modelleme)
FN	Fibronectin (Fibronektin)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
GAG	Glycosaminoglycan (Glikozaminoglikan)
GC-MS/FID	Gas Chromatography-Mass Spectrometry/Flame Ionization Detector (Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Alev İyonlaştırma Detektörü)
HA	Hydroxyapatite (Hidroksiapatit)
LCD	Liquid Crystal Display (Sıvı Kristal Ekran)
MEO	Melissa Officinalis (Melisa Otu)
MJP	Multi Jet Printing (Çoklu Jet Baskı)
MSC	Mesenchymal Stem Cell (Mezenkimal Kök Hücre)
N_2	Nitrogen (Azot)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuzlu Su)
PCL	Poly(caprolactone) [Poli(kaprolakton)]
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)
PEG	Poly(ethylene glycol) [Poli(etilen glikol)]
PG	Proteoglycan (Proteoglikan)
PLA	Poly(lactic acid) [Poli(laktik asit)]
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid) [Poli(laktik-ko-glikolik asit)]
PU	Polyurethane (Poliüretan)
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)

SLA	Stereolithography (Sterolitografi)
SLM	Selective Laser Melting (Seçici Lazer Ergitme)
SLS	Selective Laser Curing (Seçici Lazer Kürleme)
Sp	Soy Protein (Soya Proteini)
STL	Standard Triangle Language (Standart Üçgen Dili)
TCP	Tricalcium Phosphate (Trikalsiyum Fosfat)
TGF-β	Transforming Growth Factor-β (Dönüşüm Büyüme Faktörü-β)
TIPS	Thermally Induced Phase Separation (Termal Olarak Indüklenen Faz Ayrımı)
ÇY	Tea Tree Oil (Çay Ağacı Yağı)
UV	Ultraviolet (Ultraviyole)
VAT	Variable Affinity Transfer (Değişken Afinite Transferi)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Hormone (Vasküler Endotelyal Büyüme Hormonu)
XRD	X-Ray Crystallography (X Işını Kristalografisi)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Kemik yapım-yıkım döngüsü 6

Şekil 2.2 Kemiğin makro boyuttan mikro boyuta yapısı 8

Şekil 2.3 Kemiğin yapısı 9

Şekil 3.1 Kemik doku mühendisliği stratejileri 13

Şekil 3.2 Kemik rejenerasyonu için kullanılan greftler ve biyolojik faktörler 18

Şekil 3.3 Çözücü döküm partikül uzaklaştırma yöntemi ile doku iskelesi üretim aşamaları 20

Şekil 3.4 Gaz köpüklendirme yöntemiyle doku iskelesi üretim aşamaları 21

Şekil 3.5 Faz ayrışması yöntemiyle ile doku iskelesi üretim aşamaları 22

Şekil 3.6 Dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskelesi üretim aşamaları 22

Şekil 3.7 Polimerik sünger yönteminin aşamaları 23

Şekil 3.8 Elektroeğirme cihazının bileşenleri 25

Şekil 3.9 3B baskı tekniğinin kullanım alanları 26

Şekil 3.10 3B baskı tekniğinin aşamaları 27

Şekil 3.11 MJ (Material Jetting) sistemi 29

Şekil 3.12 Eriyik yığma modelleme (Fused Deposition Modeling-FDM) sisteminde katmanlı üretim 30

Şekil 3.13 Eriyik çöktürme modelleme (Fused Deposition Modeling-FDM) basım tekniğine ait doku iskelesi üretim aşamaları 30

Şekil 3.14 Seçici lazer sinterleme (Selective Laser Sintering-SLS) yazıcısının ana bileşenleri 31

Şekil 3.15 Bağlayıcı püskürtme (Binder Jetting-BJ) yazıcısının ana bileşenleri 32

Şekil 3.16 Bağlayıcı püskürtme (Binder Jetting-BJ) basım yöntemine ait üretim aşamaları 33

Şekil 3.17 Seçici lazer sinterleme (Selective Laser Sintering-SLS) yukarıdan aşağıya basım tekniğinin şematik gösterimi 34

Şekil 3.18 Seçici lazer sinterleme (Selective Laser Sintering-SLS) aşağıdan yukarıya basım basım tekniğinin şematik gösterimi 34

Şekil 3.19 Değişken Afinite Transferi (Variable Affinity Transfer-VAT) polimerizasyonuna ait işlem adımları 35

Şekil 4.1 Uçucu yağların kullanım alanları ve uygulamaları 37

Şekil 5.1 Polimerik sünger yöntemiyle kemik doku iskelesinin üretim adımları. 43

Şekil 5.2 Biyoseramik çamur emdirilmiş PU sünger 43

Şekil 5.3 Basma testi 44

Şekil 5.4 Ticari hidroksiapatit (THA) biyoseramik tozunun stearik asit (SA) ile modifikasyon basamakları..... 46

Şekil 5.5 Slicer programında tasarlanmış olan numnenin görüntüsü 48

Şekil 5.6 Farklı miktarlarda fotobaşlatıcı kullanılarak 3B basım denemeleri yapılmış biyoseramik çamurların görüntüleri: a) HT-F0,5, b) HT-F1, c) HT-F1,5, d) HT-F2,5 49

Şekil 5.7 Ağırlıkça %1 BAPO ve TPO-L fotobaşlatıcıları içeren Biyoseramik/Polimer karışımlarının 5, 10, 15 ve 20 s boyunca UV ışık altında kürlendikten sonraki 3B görüntüleri..... 50

Şekil 5.8 Anton Paar reometre cihazı 52

Şekil 5.9 Fotokürlenebilir seramik çamurun hazırlanması ve üç boyutlu basım aşamaları..... 53

Şekil 5.10 Biyoseramik çamurun hazırlanması 54

Şekil 5.11 Anycubic Mono X 3B SLA Yazıcı 54

Şekil 5.12 Çay ağacı yağı (ÇY) kaplama işlemininin adımları 55

Şekil 5.13 Çay ağacı yağı (ÇY) ile kaplanmış numunelerin vakumlu etüvde kurutma işlemi..... 56

Şekil 6.1 THA biyoseramik tozunun XRD Spektrumu 59

Şekil 6.2 THA biyoseramik tozunun temas açısı ölçümüne ait görsel..... 60

Şekil 6.3 PS yöntem ile üretilmiş kemik doku iskelesine ait farklı büyütmelerde SEM görüntüleri: a) 50X, b) 100X, c) 120X ve d) 250X..... 61

Şekil 6.4 PS yöntemi ile üretilmiş kemik doku iskelesine ait XRD spekturumu. 62

Şekil 6.5 Islanabilirlik ön denemelerine ait görüntüler: a) %1 SA (E30THA-1), b) %5 SA (A30THA-3), c) %7 SA (A30THA-4)..... 63

Şekil 6.6 Temas açısı analizine ait görüntüler: a) A30THA-3 (155°), b) I30THA-3 (151°), c) A30THA-2 (140°) ve d) E30THA-3 (121°) 64

Şekil 6.7 a) THA ve b) A30THA-3 numunelerinin XRD spektrumları 65

Şekil 6.8 Ağ. %51 hidroksiapatit içeren HT-F-mH51 biyoseramik/polimer karışımının viskozite-kayma hızı değişimi 66

Şekil 6.9 3B SLA baskı yöntemi ile üretilmiş HT-F-mH51 numunesine ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: a) 62X, b) 108X, c) 124X ve d) 315X 67

Şekil 6.10 THA tozu ve HT-F-mH51 numunesi ile 3B basılmış kemik doku iskelesine ait FTIR spektrumu..... 68

Şekil 6.11 3B SLA ile basılmış kemik doku iskelesinin (HT-F-mH51) EDX analizi…… 69

Şekil 6.12 a) THA, b) A30THA-3, c) HT-F-mH50 isimli numunelerin XRD spektrumları..... 70

Şekil 6.13 3B basım (HT-F-mH51) ve polimerik sünger (PS) yöntemleri ile üretilmiş numunelere ait basma dayanımı değerleri 71

Şekil 6.14 ÇY salım grafiği 73

Şekil 6.15 Kaplama işlemi uygulanmamış (Referans) ve uygulanmış numunelerin yüzeyinde bulunan hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri (10X) .. 75

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Üç boyutlu basım teknikleri ve özellikleri..... 28

Tablo 5.1 Çalışmada kullanılan malzemeler…….…...41
Tablo 5.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları……42
Tablo 5.3 Stearik asit ile hidroksiapatit modifikasyon işleminde THA, SA ve çözücü miktarları…….....……46
Tablo 5.4 Farklı fotobaşlatıcı (BAPOveTPO-L) miktarlarının 4:1 oranında HDDA/ TEGDMA monomer karışımına ilavesinin 3B baskı performansına etkisi…….....……...49
Tablo 5.5 3B basım yönteminde kullanılan HA biyoseramik toz türü ve oranları...52
Tablo 5.6 Kaplama çözeltisindeki çay ağacı yağı (ÇY) konsantrasyonları……..55
Tablo 6.1 24 ve 72 saat hücre canlılık test sonuçları……74
Tablo 6.2 Referans ve kaplama işlemi uygulanmış kemik doku iskelelerinin anti bakteriyel test sonuçları…….....75

ÖZET

Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları için Kalsiyum Fosfat Esaslı Biyoseramiklerden Doku İskelesi Üretimi ve Ürün Performanslarının Karşılaştırılması

Ayşe Seda ERGÜN

Metalurji ve Malzeme Anabilim Dalı

Malzeme Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR

Doku mühendisliği; biyoloji, malzeme bilimi, biyokimya ve klinik tıp gibi bilimsel alanlardan faydalanarak dokuların işlevlerini iyileştirmeyi, sürdürmeyi ve geliştirmeyi amaçlayan disiplinler arası alandır. Kemik doku mühendisliği ise, kemik hasarları için sürdürülebilir tedavi stratejisi geliştirmek amacıyla tıp, biyoloji ve mühendislik bilimleri ile çalışan bir alandır. Kemik hasarları nedeniyle milyonlarca insan etkin bir tedavi yöntemine ihtiyaç duymaktadır. Kemik dokusu küçük boyutlu hasarlarda kendi kendini yenileyebilse de, hastaların yaklaşık %10'unda; kaynamama, geç iyileşme veya yanlış kaynama gibi sorunlar oluşmaktadır. Özellikle kaynamama problemlerinde, greft uygulamaları sıklıkla kullanılmaktadır. Greft türleri arasında; otogreft, allogreft, ksenogreft ve sentetik greftler yer almaktadır. İmmünolojik açıdan üstün avantajlar sunan ve altın standart kabul edilen otogreftler; yüksek morbidite, limitli donör sahası, cerrahi komplikasyon gibi dezavantajlara da sahiptir. Bu nedenle otogreftler, mevcut sorunların hepsine yanıt verememektedir.

Sentetik üretim yöntemleri geleneksel ve modern olarak ikiye ayrılmaktadır. Günümüzde; üretim süreçlerinin kolaylığı, düşük maliyet, karmaşık yapıları basitçe üretebilme gibi avantajlar nedeniyle üç boyutlu (3B) baskı gibi modern yöntemler ön plana çıkmaktadır. 3B basım yöntemi ile; kısıtlı donör sahası ve morbidite gibi problemlerin azaltılarak, hızlı ve ekonomik ürünlerin elde edilmesi hedeflenmektedir.

Tez çalışması kapsamında; kemik doku iskelelerinin üretiminde, ticari hidroksiapatit (THA) ve stearik asit ile modifiye edilmiş ticari hidroksiapatit (mTHA) seramik tozları kullanılmıştır. Doku iskeleleri, polimerik sünger (PS) ve 3B stereolitografi (SLA) baskı yöntemleri ile üretilmiş ve üretilen numunelerin kimyasal, fiziksel, morfolojik ve mekanik özellikleri karşılaştırılmıştır. Değerlendirmeler sonucunda 3B SLA yöntemi ile üretilen kemik doku iskeleleri hedeflenen özelliklere uygun bulunmuş ve bu numuneler çay ağacı yağı kullanılarak kaplanmıştır. Ardından, kaplamalı ve kaplamasız numunelere hücre canlılığı ve yapışması ile antibakteriyel testler uygulanmıştır. Sonuç olarak; ağırlıkça %51 mTHA içeren 3B SLA yöntemiyle üretilmiş doku iskelesinin; ortalama 5 MPa basma dayanımı, 97 µm-715 µm gözenek boyut aralığı, %84 hücre canlılığı, 72. saat sonunda iyi hücre yapışması, %30 oranında antibakteriyel etki gösterdiği ve tez kapsamında öngörülen hedefleri sağladığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, Kemik doku iskelesi, Üç boyutlu basım yöntemi, Polimerik sünger yöntemi, Antibakteriyel kaplama işlemi.

ABSTRACT

Production of Tissue Scaffolds from Calcium Phosphate Based Bioceramics for Bone Tissue Engineering Applications and Comparison of Product Performances

Ayşe Seda ERGÜN

Department of Metallurgy and Material

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR

Tissue engineering is an interdisciplinary field aiming to improve and develop tissue functions by leveraging knowledge from biology, materials science, biochemistry, and clinical medicine. Bone tissue engineering focuses on developing sustainable treatment strategies for bone injuries, combining insights from medicine, biology, and engineering. Millions of people require effective treatments for bone damage. Although bone tissue can self-regenerate in small injuries, approximately 10% of patients experience complications such as non-union, delayed healing, or malunion. In cases of non-union, graft applications are frequently employed. Types of grafts include autografts, allografts, xenografts, and synthetic grafts. Autografts considered the gold standard due to their superior immunological advantages, present disadvantages such as high morbidity, limited donor sites, and surgical complications. Consequently, autografts do not address all existing issues comprehensively.

Synthetic production methods are categorized into traditional and modern techniques. Today, modern methods like three-dimensional (3D) printing are favored due to their advantages, including ease of production, low cost, and the ability to produce complex structures. 3D printing method aims to mitigate problems such as limited donor sites and morbidity while achieving rapid and economical production.

In this thesis, commercial hydroxyapatite (THA) and stearic acid-modified commercial hydroxyapatite (mTHA) ceramic powders were used to produce bone tissue scaffolds. Scaffolds were fabricated using polymeric sponge (PS) and 3D stereolithography (SLA) printing methods. The chemical, physical, morphological, and mechanical properties of the produced samples were compared. Evaluations showed that bone tissue scaffolds produced using 3D SLA method met the desired properties and were coated with tea tree oil. Both coated and uncoated samples underwent cell viability, adhesion, and antibacterial tests. 3D SLA method produced scaffolds containing 51% mTHA by weight, 160 µm-1020 µm pore size range, demonstrating average compressive strength of 5 MPa, 84% cell viability, good cell adhesion at 72 hours, and 30% antibacterial effect, meeting thesis's objectives.

Keywords: Bone tissue engineering, Bone tissue scaffold, Three-dimensional printing technique, Polymer sponge technique, Antibacterial coating process.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kemik; su, kolajen dışı proteinler, lipidler, özelleşmiş kemik hücreleri içeren hidroksiapatit kristali ve osteoid matristen oluşan kompozit bir yapıdır. Kemik; yaşam boyunca kemik homeostazı olarak adlandırılan rezorpsiyon ve oluşum işlemlerinin sıralı döngüsü içindedir. Zaman içinde kemik rezorpsiyon hızının kemik oluşumu hızını aştığı durumlarda, kemik kaybı ve kemik mikromimarisinde bozulma meydana gelmekte ve kemiklerin kırılmaya daha yatkın hale gelmesine neden olmaktadır. Kemiğin yeniden şekillenme (remodelling) süreci için, mekanik dayanım, osteoindüktivite ve/veya osteokonduktivite gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir. Osteoindüktif özellik, yeni kemik oluşumunu teşvik ederken, osteokondüktif özellik, komşu kemik dokusuyla entegrasyonu kolaylaştırıp yeni doku büyümesine destek olmaktadır. Bu özellikler, kemik yapısının hem fonksiyonel hem de yapısal bütünlüğünün korunmasında kritik öneme sahiptir [1-2].

Son zamanlarda; yaşlılık, kazalar, tümör, enfeksiyon ve kaynamama gibi faktörler, kemik bozukluklarının ortaya çıkışını büyük oranda arttırmıştır [3-5]. Gecikmiş kaynama veya kaynamama oranının %5 ile %10 arasında olduğu kabul edilmektedir [6]. Santolini ve arkadaşlarının hazırladığı sistematik bir çalışmada; diyabet, yaş, ilaç alımı, mekanik stabilite ve enfeksiyon gibi etkenlerin kemiğin kaynamasında olumsuz rol oynadığı rapor edilmiştir [7]. Kırık parçalar arasındaki mesafe, iyileşme biçimi (primer veya sekonder iyileşme) ve süresini belirleyen diğer temel parametrelerden biridir [6]. Kemik kırıkları için hali hazırda uygulanan tedavi planı, minimum komplikasyon ile optimum fonksiyonel iyileşme sağlamaya yöneliktir. İntramedüler çivileme, plak ve Ilizarov yöntemi gibi fiksasyon yöntemleri ise kemik bozukluklarının tedavisi için mekanik stabilite sağlayabilmelerine rağmen; biyolojik uyaran kullanımının iyileşme sürecine olan etkilerinden dolayı kemik greftlerinin tercih edilmesi günümüzde yaygın hale gelmiştir [8].

Greftler kaynağına göre; otogreft, allogreft ve sentetik greftler olarak sınıflandırılmaktadır. Otogreft, hastanın kendi vücudundan alınırken; allogreft, donörden alınmaktadır. Doku mühendisliği bilimi ile uygulanmaya başlanan sentetik greftler, laboratuvar ortamında üretilmektedir. Greft uygulamalarında; yüksek biyouyumluluk ve düşük immün tepki özelliklerinden dolayı altın standart olarak otogreftler kullanılsa da, küçük çaplı bozuklukların tedavisine uygun olması, donör bölgelerinde ek cerrahi prosedürlere ihtiyaç duyulması ve sağlık sorunlarına yol açabilme riskleri gibi dezavantajları bulunmaktadır [9-11]. Bu nedenle kemik doku mühendisliği, otogreft ve allogreftlerden daha iyi performans gösteren malzemeler tasarlamayı amaçlamaktadır [12].

Günümüzde, çözücü döküm ve partikül uzaklaştırma, gaz köpürtme gibi geleneksel teknikler kemik greftlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Bununla birlikte geleneksel yöntemlerin; minimal kontrol edilebilirlik, kompleks geometri üretimindeki zorluklar ve yüksek maliyet gibi dezavantajları bulunmaktadır. Son yıllarda, üretim kolaylığı, maliyet, zaman ve kompleks geometriye sahip yapıların üretilebilme kolaylığı gibi pek çok avantaj sağlayan 3 boyutlu baskı teknolojileri giderek ilgi görmeye başlamıştır [12]. Doku iskelesi üretiminde çeşitli üç boyutlu baskı teknikleri kullanılmaktadır. Yan ve arkadaşlarının kemik rejenerasyonunun arttırılmasına yönelik yaptıkları bir çalışmada, eriyik yığın modelleme (fused deposition modelling; FDM) tekniği kullanılmıştır. Demir zehirlenmesi durumunda kullanılan deferoksamin (deferoxamine; DFO)'in aynı zamanda vaskülarizasyon ve kemik rejenerasyonunu destekleyebileceği belirtilmiş olup, çalışmada 3B basılan polikaprolakton (polycaprolactone; PCL) doku iskeleleri, DFO ile muamele edilmiştir. DFO-PCL doku iskelelerinin hücre tutunmasına etki etmediği ancak kemik büyümesi ve vaskülarizasyonda önemli bir artış sağladığı belirtilmiştir [13]. Bose ve arkadaşları, bağlayıcı püskürtme tekniği (Binder Jetting; BJ) ile Magnezyum (Mg^{2+}) ve Silisyum (Si^{4+}) içeren trikalsiyum fosfat (tricalcium phosphate; TCP) kemik doku iskeleleri üretmişlerdir. Çalışmada 3B basılmış kemik doku iskelelerine, Mg^{2+} ve Si^{4+} eklenmesi ile osteogenez ve anjiyogenezin artması hedeflenmiştir. 4 ile 20 hafta arasındaki incelemeler sonucunda farklı boyutlardaki gözeneklilik (porozite) ile doku iskelesine eklenen Mg^{2+} ve Si^{4+} katkılarının anjiyojenik kemik yenilenmesine etkileri incelenmiştir [14]. Günümüzde, 3B basım

teknikleri kullanılarak yeni çalışmalar yapılmaktadır. 2024 yılında yapılan bir çalışmada, eriyik yığın modelleme (Fused Deposition Modelling; FDM) ile stereolitografi (Stereolithography; SLA) teknikleri bir arada kullanılmış ve yüksek mukavemete sahip hidroksiapatit bazlı kemik doku iskeleleri üretilmiştir [15].

Cerrahi işlemler sırasında ve/veya sonrasında, hastada bakteriyel enfeksiyonların oluşma ihtimali yüksektir. Bu nedenle, kemik doku iskelelerinin biyouyumluluk, mekanik dayanım ve osteojenik özelliklerinin sağlamasının yanında enfeksiyon gibi oluşabilecek komplikasyonların giderilebilmesi için antibakteriyel özellik göstermesi büyük önem taşımaktadır. Doku iskelelerinde antibakteriyel özellik; ilaç-iyon yüklemesi veya kaplama işlemi gibi fiziksel yöntemler ile sağlanabilmektedir [16]. 2023 yılında Alves ve arkadaşları, doğrudan mürekkeple yazma (Direct Ink Writing; DIW) 3B baskı tekniği kullanılarak üretilmiş beta trikalsiyum fosfat (Beta-Tri Calcium Phosphate; β-TCP) - biyocam (Bio Glass; BG) esaslı kemik doku iskelelerini, çay ağacı yağı (ÇY) ile kaplamıştır. ÇY, içeriğindeki terpen ve türevlerinden dolayı antibakteriyel özelliğe sahiptir. Çalışma kapsamında yapılan bakteri testinde, ÇY ile kaplanan doku iskelelerinde antibakteriyel etki gözlemlenmiştir [17].

1.2 Tezin Amacı

Tez çalışmasının temel amacı; doku mühendisliği ilkelerini kullanarak, kemik defektleri, kemik kanseri ve kırıkların tedavisi için üç boyutlu (3B) baskı yöntemi ile kemik dokusu iskeleleri üretmektir. Üç boyutlu (3B) basım teknolojisinin kullanılması ile; otogreft uygulamalarında karşılaşılan donör sahasından kaynaklanan problemler, donör bölgesinde ağrı-enfeksiyon ve operasyon sırasında oluşabilecek iç organ yaralanması gibi riskler azaltılarak; hızlı, düşük maliyetli ve biyouyumlu ürünlerin üretiminin mümkün olması hedeflenmektedir.

Çalışma kapsamında, geleneksel yöntem olarak polimerik sünger (PS) ve modern yöntem olarak üç boyutlu stereolitografi (3B SLA) baskı tekniği kullanılmıştır. Polimerik sünger yöntemi, kemiğin birbirine bağlı gözenekli yapısını taklit edebildiği ve stereolitografi 3B baskı yöntemi ise yüksek yüzey kalitesi ile karmaşık geometrilerin üretilebilmesini sağlayabildiği için seçilmişlerdir. Çalışma kapsamında geleneksel ve modern yöntemler ile üretilmiş kemik doku iskelelerinin

mekanik, kimyasal ve morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Çay ağacı yağı ile kaplama işlemi ise, kemik doku iskelelerine antibakteriyel özellik kazandırmak amacıyla kullanılmıştır. Çalışma ile sentetik greft uygulamalarında karşılaşılan yetersiz mekanik dayanım, komplikasyon riski ve düşük hücre-doku etkileşimi sorunlarının çözülmesi öngörülmektedir. Belirtilen amaçlar doğrultusunda ulaşılması beklenen başlıca hedefler aşağıda sunulmuştur:

1. Ticari hidroksiapatit (THA) biyoseramik tozuna uygulanan modifikasyon işlemi sonucunda biyoseramik çamur içerisindeki toz yüklenme oranının arttırılması ve 3B baskı ile üretilen doku iskelesinin mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi.
2. 3B baskı ile üretilen kemik doku iskelelerinde, yapının tasarlanan şekilde basılabilmesi için uygun viskozite ve yükleme oranının belirlenmesi.
3. Geleneksel ve modern yöntemler ile üretilen kemik doku iskelelerinin kimyasal, mekanik ve morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması.
4. Karşılaştırma verilerine göre optimum koşulları sağlayan yöntemin belirlenmesi.
5. Seçilen yöntem ile üretilen kemik doku iskelelerine antibakteriyel kaplama işlemi yapılması, kaplama işlemi uygulanmış ve uygulanmamış doku iskelelerinin antibakteriyel özelliklerinin karşılaştırılması.
6. Doku iskelelerinin vücutta hücrelerle olan etkileşimini simüle etmek için hücre canlılığı testlerinin uygulanması.

1.3 Hipotez

Bu çalışmanın hipotezi; kemik doku rejenerasyonunda karşılaşılan mevcut problemlere yenilikçi bir çözüm sunma potansiyelini değerlendirmektir. Temel hipotez; 3B basım teknolojisi ve çay ağacı yağı ile kaplama işlemi entegrasyonunun, geleneksel greft üretim yöntemine göre avantaj sağlayacağı yönündedir. Bu kapsamda, kısıtlı donör alanı ve morbidite gibi zorlukların aşılması ile antibakteriyel özellik sayesinde implantasyon sonrası hastada enfeksiyon riskinin azaltılacağı varsayılmaktadır. Bu çalışma, 3B basım yöntemiyle üretilen kemik doku iskelelerinin mekanik, kimyasal ve biyolojik özellikleri açısından geleneksel yöntemlere göre üstünlüklerini araştırarak, bu teknolojinin klinik uygulamalardaki potansiyelini ortaya koymayı hedeflemektedir.

2
KEMİK

2.1 Kemik

Kaslara destek veren, iç organları koruyan, hareket etmeye ve kan üretimine yardım eden, kalsiyum, fosfor gibi minerallerin depolanması ile temel elektrolitlerin homeostazında rol oynayan bir bağ dokusudur [18-19]. Tüm dokular gibi kemik dokusu da, hücrelerin ve hücresel olmayan bileşenlerin bir karışımı olan ekstraselüler matris (Extracellular Matrix; ECM) içerir. ECM; hücrenin büyümesi, çoğalması ve farklılaşması gibi süreçleri düzenlemektedir. Yapısında organik ve inorganik bileşenler ile su bulunmaktadır. Kolajen, elastin, fibronektin (Fibronectin; FN), lamininler, glikoproteinler, proteoglikanlar (proteoglican; PG'ler) ve glikozaminoglikanlar (glycosaminoglycans; GAG) gibi lif oluşturucu proteinler, ECM'in temel bileşenlerini oluşturmaktadır [20].

Hidroksiapatit (Hydroxyapatite; HA), kalsiyum ve fosfordan oluşan inorganik bir bileşen olup, kemik dokusunun mekanik dayanımını arttırmaktadır. Organik kısım, %90 kolajen I ve geriye kalanı tip III ve IV kolajen ile fibrinden oluşan bir yapıdır. Kemiğin inorganik kısmı, yapıya mekanik dayanım ve yük taşıma kapasitesi sağlarken; organik kısımlar yapının elastikliğini arttırmaktadır [21-22].

Kemik, hem fonksiyonel hem de yapısal çeşitliliği olan bir dokudur. İnsan vücudunda, 200 adetten fazla sayıda kemik bulunmaktadır [18]. Kemikler yapılarına göre uzun, kısa, yassı ve düzensiz kemik olarak dört farklı çeşide sahiptir. Femur ve tibia gibi kemikler, uzun kemik; karpal ve tarsal kemikler, kısa kemik; kafatası ve kaburga kemikleri yassı kemik; vertebra ise düzensiz kemik sınıfında yer almaktadır [23]

Kemik oluşumu (osteogenez), iki şekilde meydana gelebilmektedir:

1. Endokondral ossifikasyon
2. İntramembranöz ossifikasyon

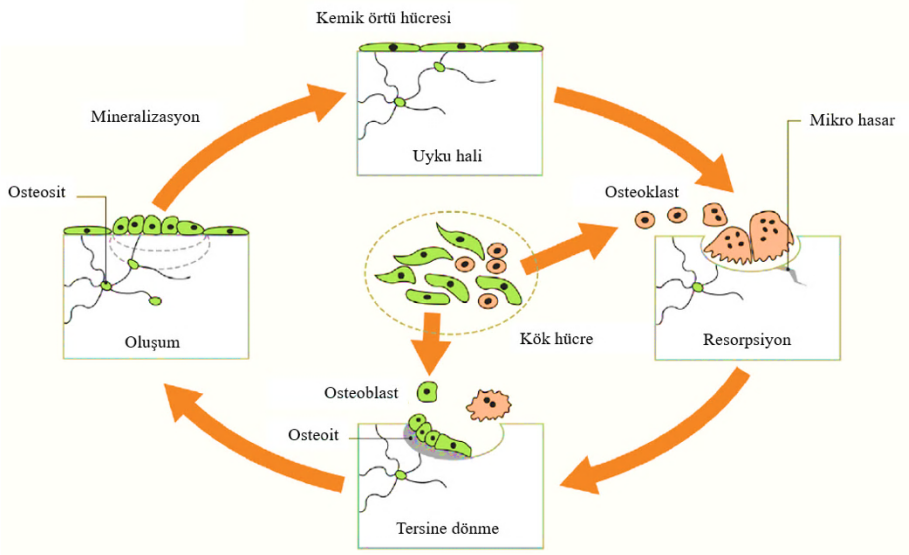
Endokondral kemikleşme sürecinde kıkırdak (kallus) dokunun yerini kemik iliği almaktadır. İlk aşamada kıkırdak doku oluşur. Zamanla kıkırdak, kalsifiye olmaya başlar ve kıkırdakta bulunan kondrositler apoptoza uğrar. Zaman ilerdikçe kalsifiye

kıkırdakla örülü membrandaki mezenkimal kök hücreler, osteoblastlara dönüşmeye, hematopoitik kök hücreler ise osteoklastlara dönüşmeye başlar. Böylece osteoklast-osteoblast döngüsü başlamış olur [19]. İnsan vücudundaki femur gibi uzun kemikler, endokondral ossifikasyon ile oluşmaktadır. İntramembranöz kemikleşmede ise mezenkimal kök hücreler, doğrudan osteoblastlara farklılaşır, bu nedenle yukarıda belirtilen kıkırdak dokunun yerini alması gibi bir süreç bulunmamaktadır. Kafatası kemiği gibi kısa kemiklerde ise intramembranöz kemikleşme görülmektedir. İki süreçte de mezenkimal kök hücrelerin (Mesenchymal Stem Cells; MSC) sayılarının artması ve farklılaşma aşamaları ortaktır [9,12].

Kemik dokusu içerisinde dört tip kemik hücresi bulunmaktadır [21]:

1. Osteoblastlar
2. Osteoklastlar
3. Osteoprogenitör hücreler
4. Osteositler

Osteoblast ve osteoklast hücreleri, kemiğin yapım-yıkım aktivitelerini dengelemektedir (Şekil 2.1). Böylece kemiğin fazla oluşumu ya da yıkımı kontrol altına alınmaktadır [24].



Şekil 2.1 Kemik yapım-yıkım döngüsü [25]

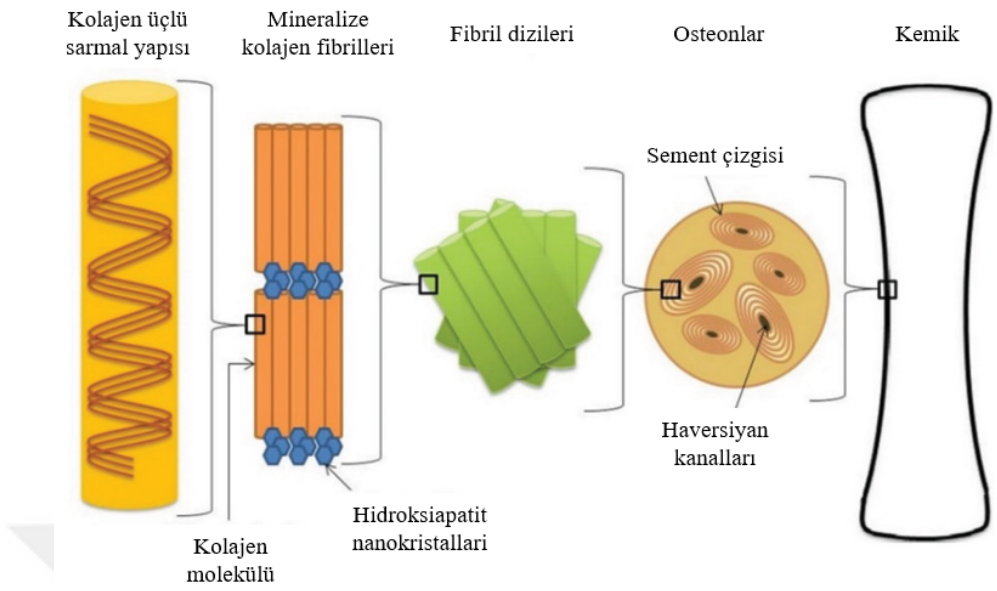
Osteoprogenitör hücreler; kemikte onarım ve gelişim aşamalarında görev yapan osteoblast hücrelerin öncülleri olan kök hücrelerdir. Aynı zamanda pre-osteoblast ya da osteojenik hücre olarak da adlandırılmaktadırlar [26].

Osteoblastlar; kemik dokusunun yapımından sorumlu olan hücrelerdir ve genellikle kemik yüzeyine yakın bir biçimde yerleşmişlerdir [27]. Bu hücreler; kolajen tip I, glikozaminoglikanlar (GAG) ve kemik morfojenik protein (Bone Morphogenic Protein-BMP) gibi organik bileşenleri sentezlemesinin yanı sıra, kolajenin mineralizasyon sürecinde de aktif rol almaktadır [28]. Başlangıç aşamasında osteoblastlar, mineralize olmamış kolajen matrisi olan osteoid ve kolajen lifleri boyunca kalsiyum ve fosfat depolayan alkalin fosfataz (Alkaline Phosphatase; ALP) enzimini salgılamaktadır. Zaman içinde osteoblastlar, mineralize kemik matrisinin eş eksenli katmanları ile çevrili hale gelmekte ve sonunda osteositlere dönüşmektedirler [12].

Osteositler; mineralize kemik matrisine gömülü durumda bulunan ve genellikle inaktif osteoblast hücreleri olarak tanımlanan hücrelerdir. Bu hücreler, matris içerisinde sitoplazmik yollar aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurmaktadırlar [24], [28].

Osteoklastlar; kemik dokusunun emiliminde görev alan, monosit-makrofaj kökenli çok çekirdekli hücrelerdir. Bu hücreler, asidik bir ortam oluşturarak kemik dokusunun inorganik bölümlerini çözündürebilmekte ve aynı zamanda spesifik enzimler vasıtasıyla organik bölümleri parçalayabilmektedirler [28].

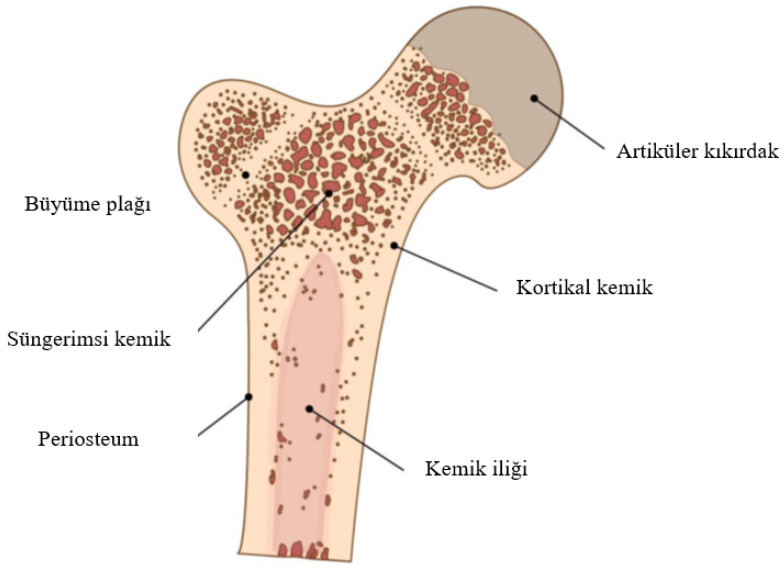
Kemik matrisinin ana organik bileşeni tip I kolajen adı verilen bir fibriler proteindir. Tip I kolajen, üç polipeptit zincirinden [İki alfa-1 zinciri (α1) ve bir alfa-2 zinciri (α2)] meydana gelir. Bu üç zincir, birbirine sıkı bir şekilde sarılarak üçlü sarmal (triple helix) yapısını oluşturur (Şekil 2.2) [29].



Şekil 2.2 Kemiğin makro boyuttan mikro boyuta yapısı [29]

Kolajen, başlangıçta propeptid adı verilen bir öncül formda üretilir. Bu propeptid, osteoblast adı verilen kemik hücrelerinden salgılandıktan sonra, hücre dışına çıktığında özel enzimler tarafından parçalanır. Bu enzimler, kolajenin uç kısımlarındaki amino ve karboksil gruplarını keser. Daha sonra, kolajen molekülleri, üçlü sarmal yapılar oluşturmak için bir araya gelir ve bu yapılar düzenli bir şekilde birleşerek kolajen fibrilleri oluşturur. Fibriller, kemiğin çekme dayanıklılığını arttıran özel kovalent bağlar ile uçlarından birbirine bağlanır. Bu yapı, kemiklerin güçlü ve dayanıklı olmasını sağlar. Kemik parçalandığında, bu çapraz bağlar hücre dışı sıvıya salınır ve konsantrasyonları kan veya idrarda ölçülebilir, bu da kemik emiliminin biyokimyasal belirteçlerini sağlar. Kemiğin organik bileşeni, mineralizasyonun meydana geldiği bir çerçeve oluşturur. Mineralizasyon; kemiğe, kemik kolajeninden türetilen gerilme mukavemetini ve elastikiyetini tamamlayan mekanik sertlik özelliği verir. Kemik minerali esas olarak kalsiyum ve fosfat içeren hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Kalsiyum ve fosfatın yetersiz olduğu durumlarda kemik mineralizasyonunda kusurlar (raşitizm ve osteomalazi) meydane gelir. Kusurlu mineralizasyon hipofosfatazide de meydana gelir; buna normalde bir mineralizasyon inhibitörü olan pirofosfatı parçalayan ALP enzimini etkileyen genetik mutasyonlar neden olur. Hipofosfatazide pirofosfat birikir ve normal olarak kemik matrisinin mineralleşmesini önler [25].

İskelet sisteminde, kortikal ve trabeküler olmak üzere iki farklı yapıya sahip kemik türü bulunmaktadır [25]. Kortikal (kompakt) kemik, yüksek mineral içeriğine sahip olması sebebi ile daha yüksek sertliğe ve düşük tokluğa sahiptir. Yoğun ve sert yapısı, iç tarafta yer alan trabeküler kemik için koruyucu bir katman görevi görmektedir (Şekil 2.3) [9]. Trabeküler (süngerimsi) kemik; kortikal kemiğe göre daha düşük yoğunluğa ve daha geniş yüzey alanına sahiptir. Yapısı; kemik iliği ile doldurulmuş boşluklarla ayrılmış, birbirine bağlı kemik trabekül ağlarından oluşmaktadır [9]. Gözenek (por) dağılımı kortikal kemikte %5-30, trabeküler kemikte ise %30-90 aralığında değişmektedir. Bu nedenle trabeküler kemik daha gözenekli bir yapıya sahiptir [25,30]. İki kemik türünün mekanik dayanımları birbirinden farklıdır. Kortikal kemik 100-230 MPa, trabeküler kemik ise 2-12 MPa basma dayanımına sahiptir [30]. İskeletteki kemiğin çoğunluğu (%80) kortikal yapı olup, kortikal ve trabeküler kemiklerin dağılımı iskeletin farklı bölgelerinde değişiklikler göstermektedir. Örneğin; uzun kemiklerin distal kısımları, vertebral cisimler ve kalkaneus trabeküler kemik yapısında bulunuyor iken, uzun kemiklerin ve femur boynunun şaft kısımlarında kortikal kemik hakim durumdadır. Trabeküler kemiğin yüksek yüzey alanına sahip olması ve kortikal kemikten daha hızlı yeniden şekillenmesi, bu farklılıkların klinik açıdan önem taşımasına neden olmaktadır [25].



Şekil 2.3 Kemiğin yapısı [9]

2.2 Kemik Travmaları ve Onarım Mekanizmaları

Hastalıklı veya hasar görmüş kemik dokusu, günümüzde nakil gerektiren ikinci en yaygın dokudur [29]. Kemik hasarına sebep olan durumlara örnek olarak; osteoporoz, travma, kaza, kemik rezorpsiyonu ve enfeksiyon verilebilir [31]. Kemik defektleri; türüne, boyutuna, hasara bağlı olarak değişebilmekte ve kullanılan tedavi yöntemleri de çeşitlilik gösterebilmektedir. Kemikte oluşan defekt bölgenin iyileşme sürecinde; primer veya sekonder iyileşme mekanizması devreye girmektedir. Primer iyileşmede, kemik uçları birbirlerine yakındır, aralarında kaynaşmayı engelleyecek kadar boşluk bulunmadığı için bu tip iyileşmelerde callus oluşumu görülmez. Kırık boyunca kompresyon ve stabilite sağlayan sabitleme yöntemleri doğrudan iyileşmeye veya kaynamaya olanak tanır. Açık redüksiyon ve rijit internal tespit sonrasında herhangi bir boşluk oluşmadan primer iyileşme gerçekleşir. Kesici konilerin uçlarında bulunan osteoklastlar, osteoblastlar tarafından rejeneratif kemikle doldurulan uzunlamasına boşluklar oluşturur. Havers kanallarının oluşturulmasını kan damarlarının penetrasyonu takip eder, bu da katmanlı kemikte doğrudan yeniden şekillenmeye ve kallus oluşumu olmadan kırık iyileşmesine yol açar [32-34]. Sekonder iyileşmede ise, kemik uçları birbirlerine birincil tip iyileşmede görüldüğü kadar yakın değildir, bu iyileşme mekanizmasında callus oluşumu görülmektedir. Intramedüller çiviler, köprüleme plakaları, greft çeşitleri veya eksternal fiksatörler kullanılarak kırık parçalar arasında sabitleme işlemi gerçekleştirilir. Kemiğin kıkırdak oluşmadan doğrudan yapılandığı intramembranöz ossifikasyonun aksine, endokondral ossifikasyon kıkırdağın mineralizasyonunu içerir. İkincil kırık iyileşmesi; inflamatuar, fibroplazi veya onarım ve yeniden şekillenme dahil olmak üzere üç aşamaya ayrılabilir. İlk aşama hematom fazıdır ve 0-5 gün aralığında devam etmektedir. Lenfosit, monosit gibi enflamatuar hücreler, hematom adı verilen kanın damar dışına çıkıp toplandığı hasarlı alana doğru nüfuz ederler. Burada interlökin, tümör nekröz faktör-α (Tumor Necrosis Factor-α; TNF-α) gibi enflamatuar sitokinler, BMP ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) gibi çeşitli büyüme faktörlerini salgılarlar. İkinci aşama, kallus yapısının oluştuğu onarıcı fazdır ve 1-4 hafta aralığında gerçekleşir. Hasarlı bölgeye destek amaçlı önce yumuşak kallus oluşur, mineralizasyon tamamlandıktan sonra yumuşak kallus yerini sert kallusa

bırakır [9], [34], [35], [36]. Osteoblastların en yüksek seviyedeki aktivitesi, sert kallus aşamasında görülür. Son aşama, "remodeling" olarak da adlandırılan kemiğin yeniden şekillenmesidir. Yeni oluşan doku zamanla normal dokudan ayırt edilemez hale gelir. Bu aşamanın tamamlanma süresi bazen yıllar alabilmektedir. Çünkü kemik kırığının tipi, hasta yaşı, hastalık koşulları gibi pek çok parametre nedeniyle kişiden kişiye farklılık gösterebilmektedir [35].

Kemiğin iyileşme döngüsüne yardım eden bazı biyolojik faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlere; dönüşen büyüme faktörü beta (Transforming Growth Factor-β; TGF-β), kemik morfojenik protein (Bone Morphogenic Protein-BMP), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet Derived Growth Factor; PDGF) ve vasküler fendotelyal büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) örnek olarak verilebilir.

- TGF-β; mezenkimal kök hücrelerin (Mesenchymal Stem Cells; MSC), fibroblastların, kondrositlerin, osteoblastların hücresel aktivitelerini etkinleştirme, ECM sentezi, hücre içi sinyal iletimi ve diğer büyüme faktörleriyle etkileşimleri koruma işlevlerine sahiptir.
- BMP; hücresel göç, farklılaşma, bölünme ve matris sentezi için sinyal görevi görür.
- PDGF; anjiyogenezi teşvik etmek için hücre göçünü, büyümesini ve bölünmesini düzenleyerek kemik oluşumunda rol almaktadır.
- VEGF; anjiyogenezi uyaran bir sinyal proteinidir. Kemik oluşumunu doğrudan etkiler, osteoblast farklılaşmasını ve proliferasyonunu uyarır [37].

Bozuk bir iyileşme süreci; gecikmiş bir birleşme veya birleşmemiş bir duruma yol açabilmekte, böylece **kaynamama problemi** oluşabilmektedir. Gecikmiş birleşmenin birleşmemeye ilerleyişini belirleyen net bir sınır yoktur ancak iyileşme sürecini olumsuz etkileyebilecek faktörler bulunmaktadır. Bunlardan en önemli olanlar aşağıda sunulmuştur:

Mekanik instabilite: Kaynamama durumunun oluşmasında rol oynayan kritik bir faktördür. Kas aktivitesi ve dış yükleme sırasında yüksek parçalar arası harekete neden olan kırık bölgesindeki instabilitedir. Ortaya çıkan lokal doku gerilimi belirli

bir seviyeyi aşarsa, daha fazla fibröz doku oluşur ve kıkırdak replasmanı ve kemik oluşumu engellenir.

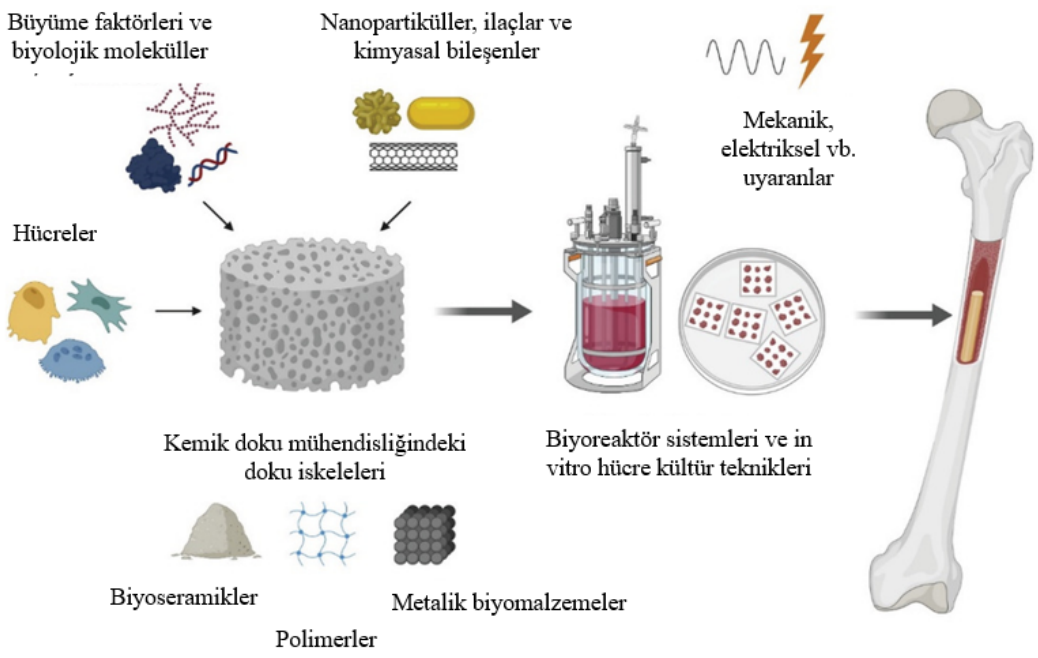
Değişen inflamatuar yanıt: Yaş, obezite, şiddetli travma, ağır tipte ağrı kesici ilaç kullanımı gibi faktörlere bağlı olarak iyileşme sürecinde oluşan ve kallus oluşumunu etkileyen inflamatuar yanıt ve süresi değişiklik gösterebilmektedir. Bu da hastaları risk altına sokmaktadır.

Yetersiz vaskülarizasyon: Kemiğin iyileşme sürecinde yeterli miktarda besin ve oksijen temin edebilmesi önemlidir. Aksi durumda, hipoksik ortam oluşmaktadır. Cerrahi işlem, stabilizasyon yöntemi gibi nedenlerden dolayı vaskülarizasyonda sorunlar oluşabilmekte ve yeterli kan temini sağlanamayabilmektedir.

Belirtilen faktörlerin dışında; kallus yapısının yeniden şekillenmesinde problem oluşması, enfeksiyon oluşumu, progenitör hücrelerin yetersizliği de kaynamama problemine sebep olabilmektedir. Kemiğin kaynamama durumunun tedavisi için stabilizasyon ve özellikle kemik greftleri sıklıkla kullanılmaktadır [8].

3
KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Kemik doku mühendisliği (Bone Tissue Engineering; BTE), Robert Langer ve Joseph P. Vacanti'nin öncülüğünde geliştirilmiş olup; kimya, biyoloji, biyokimya, tıp, malzeme bilimleri ve mühendislik gibi çeşitli disiplinlerden yararlanarak, hasar görmüş dokuların iyileştirilmesini ve yeni dokuların üretilmesini hedeflemektedir. Bu multidisipliner bilim dalı, son yıllarda, hasarlı dokuların tedavisi ve organ nakli gibi yüksek ihtiyaç duyulan alanlarda, mevcut yöntemlere alternatif bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır [38]. Doku mühendisliği stratejileri; biyomalzemeler, hücreler ve büyüme faktörleri gibi temel unsurlar üzerine odaklanmaktadır (Şekil 3.1). Seramik, polimer veya metal malzemeler kullanılarak gözenekli doku iskelelerinin oluşturulması, in vitro ortamda hücre büyümesinin teşvik edilmesi ve doku iskelesinin vücuda yerleştirilip dokunun onarımı ve rejenerasyonunun sağlanmasını hedeflemektedir [39,9].



Şekil 3.1 Kemik doku mühendisliği stratejileri [29]

Kemik Doku Mühendisliği temel olarak; biyouyumluluk, gözeneklilik, osteogenez ve mekanik dayanım gibi özellikler açısından kemiği taklit edebilecek malzeme ve doku iskelelerinin üretilmesini hedeflemektedir [40]. Üretilen kemik doku

iskelelerinin tedaviye olumlu cevap verebilmeleri için biyouyumluluk, uygun gözenek büyüklüğü ile dağılımı, dokuyla uyumlu mekanik davranış ve vaskülarizasyon gibi bazı özelliklere sahip olmaları gerekmektedir.

3.1 İdeal Kemik Doku İskelelerinde Bulunması Gerekli Olan Özellikler

Biyouyumluluk: Vücuda yerleştirilen biyomalzeme ve cihazlar için en önemli parametrelerden birini oluşturmaktadır. Bu kavram, kullanılan biyomalzemenin hedeflenen işlevi başarıyla yerine getirmesini ve tedavi sürecinde vücutta herhangi bir istenmeyen lokal veya sistematik yanıta neden olmamasını ifade etmektedir. Biyobozunur malzemelerin yan ürünleri, bazen yetersiz vaskülarizasyon ve azalmış dolaşım hızı nedeniyle vücutta çeşitli problemlere yol açabilmektedir. Sıcaklık, pH gibi fiziksel koşullar ve hastanın metabolik aktivitesi, biyouyumluluğun belirlenmesinde önemli faktörler arasındadır [41].

Gözeneklilik (porozite), gözenek (por) büyüklüğü ve dağılımı: Hücre adezyonu, hücreler arası etkileşim ve malzemenin biyoaktivasyonu gibi birçok önemli süreçte temel roller oynamaktadır [42]. Gözeneklilik; hücrelerin doku iskelesine yapışması, büyümesi, çoğalması ve göç etmesi için kritik bir parametredir. Aynı zamanda besin alımı ve atık maddelerin uzaklaştırılması açısından da önemlidir. [43]. Makro gözeneklilik, hücrelerin büyümesine, çoğalmasına ve göçüne bir ölçüde fayda sağlamaktadır. Doku vaskülarizasyonu ve yeni doku oluşumu daha hızlı gerçekleşebilmektedir. Bununla birlikte mikrogözeneklilik, etkili hücre yapışması ve yayılması için gereklidir. Aynı zamanda yapı iskelesi ve doku arasındaki mekanik dayanıklılığı kolaylaştırmak için önemlidir [44]. Araştırmalarda, uygun gözenek boyutlarına ve miktarlarına sahip kemik doku iskelelerinde osteogenez (kemik oluşumu) ve mekanik dayanımın arttığı gözlemlenmiştir. İdeal gözenek boyutları en az 100 mikron (μm) olmalıdır [43]. 300-500 μm arasındaki gözenek boyutları, neovaskülarizasyonu desteklemekte ve bu aralık, osteogenez için uygun olarak değerlendirilmektedir [43,45].

Mekanik Özellikler: Üretilen kemiğin mekanik özellikleri, hedeflenen dokunun biyomekanik özelliklerine yakın olmalıdır. Vücuttaki daha yoğun yapılı kortikal kemik 100-230 MPa; daha gözenekli yapıya sahip trabeküler kemik ise 2-12 MPa

basma dayanımına sahiptir. Bu bilgiler, üretilen kemik materyallerinin, doğal kemik dokusunun mekanik gereksinimlerini karşılayabilmesi açısından önemli bir rol oynamaktadır [25,30].

Vaskülarizasyon: Yeni doku oluşumu sırasında vaskülarizasyon ve anjiyogenez ile kan damarlarının oluşumu, hücrede gaz alışverişi ve atıkların uzaklaştırılmasında büyük önem taşımaktadır. Vaskülarizasyonun yetersiz olduğu doku oluşum süreçlerinde; kemik kaynamasının gecikmesi, tamamen gerçekleşememesi veya kemik dokusunun düzgün bir şekilde oluşmaması gibi problemler gözlemlenebilmektedir [46].

Osteokondüksiyon: ECM yapısının taklit edilmesi, osteokondüksiyon için temel bir gerekliliktir. Bu süreçte, hücre yüzey reseptörleri ve ECM'nin etkileşimi, doku iskelesi ve progenitör hücreler arasında da benzer şekilde taklit edilmelidir. Osteokondüktif özelliklere sahip malzemeler, osteoprogenitör hücreler için hem taşıyıcı rolü üstlenmekte hem de kemiğin gelişimi için gerekli olan hücrelerin farklılaşabileceği ve vaskülarize kemiği oluşturabileceği uygun bir mikroçevre sunmaktadır [47,11].

Osteoindüksiyon: Kritik boyut altındaki kemik hasarlarında iyileşme süreci, ilik veya yağ dokusundan elde edilen ve ilerleyen evrelerde osteoblastlara dönüşerek yeni kemik oluşumunda rol alacak olan mezenkimal kök hücrelerinin defekt bölgesine gönderilmesiyle başlamaktadır. Progenitör hücrelerin belirlenen bölgeye hareket etmesi ve farklılaşması; mekanik, biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerin etkisiyle gerçekleşen osteoindüksiyon süreç olarak adlandırılmaktadır [47,11].

3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Malzemeler

Sentetik ve doğal biyomalzemeler, kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu malzemeler arasında seramik, metal ve polimer gibi farklı malzeme grupları bulunmaktadır [48-49]. Ayrıca, biyomalzemeler tek başına kullanılabileceği gibi, iki veya daha fazla malzemenin birleştirilmesiyle oluşturulan kompozit malzemeler şeklinde de kullanılabilmektedir [50].

Seramik: 1960'lardan itibaren seramik malzemeler, osteoindüktif ve/veya osteokondüktif özellikleri sayesinde kemik ve dental doku mühendisliğinde sıkça tercih edilmektedir [51]. Bu malzeme grubu içinde hidroksiapatit, trikalsiyum

fosfat ve biyoaktif cam gibi malzemeler bulunmaktadır. Seramikler, yüksek basma dayanımı, osteokondüksiyon kabiliyeti ve biyouyumluluk özellikleri nedeniyle bu alanlardaki çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [30,52,53]. Sinterleme sıcaklığı, doku iskelesinin yüzey topografisi ve gözenekliliği üzerinde etki göstermektedir [54].

Hidroksiapatit, kemiğin yapısında bulunan kalsiyum fosfat esaslı inorganik bir biyoseramik malzemedir. Sahip olduğu yüksek biyouyumluluk, biyoaktivite, yapısı ve gözeneklilik bakımından kemiğe olan benzerliği, mekanik dayanım gibi özelliklerinden dolayı pek çok farklı alanda kullanılmaktadır. Bu alanlar arasında; ilaç dağıtım sistemleri, implantlar ve kaplamalar yer almaktadır [55]. İlaç dağıtım sistemlerine yönelik yapılan bir çalışmada Soriano-Souza ve ark., periodontitis ve peri-implantitis tedavisinde kullanılan doksisiklin (Doxycycline; DOX) isimli antibiyotik ile yüklü hidroksiapatit seramik mikroküreleri üretip, bunların osteoblast canlılığı üzerindeki etkilerini ve antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmişlerdir [56]. Hoon-Um ve arkadaşlarının çalışmasında ise, hızlı ve tek adımda titanyum implant yüzeyine HA ile kaplama yapılmıştır. In vivo çalışmalarda HA ile kaplanan yüzeylerin daha stabil olduğu, osteokondüktivite ve biyouyumluluk açısından da başarılı olduğu gözlemlenmiştir [57]. Hidroksiapatit; kalsiyum, fosfat ve hidroksil gibi vücutta kendiliğinden bulunan bileşenleri içerdiğinden implantasyon prosesinde de toksisite oluşturmamaktadır. İmplante edildiğinde biyolojik ortama maruz kalan implant yüzeyi, vücutta bulunan doğal apatite bağlanır ve böylece ortopedik implantlarda kemik oluşumunu destekler [58]. Trikalsiyum fosfat (TCP) kristalin yapıda olup, biyouyumluluğu yüksek bir biyomalzemedir. Biyocam, biyoseramik malzemeler içerisinde sıklıkla kullanılan bir diğer malzemedir. Kırılgan yapısından kaynaklı olarak gözenekli yapılarda deformasyonlar meydana gelebilmektedir. Biyoseramik malzemelere bir başka örnek alümina (Al_2O_3) seramik bileşiğidir. Güçlü bağ yapısı nedeniyle yüksek erime noktasına sahiptir. Elastik modülü yüksek ve kimyasal aşınmalara karşı da dirençlidir [59].

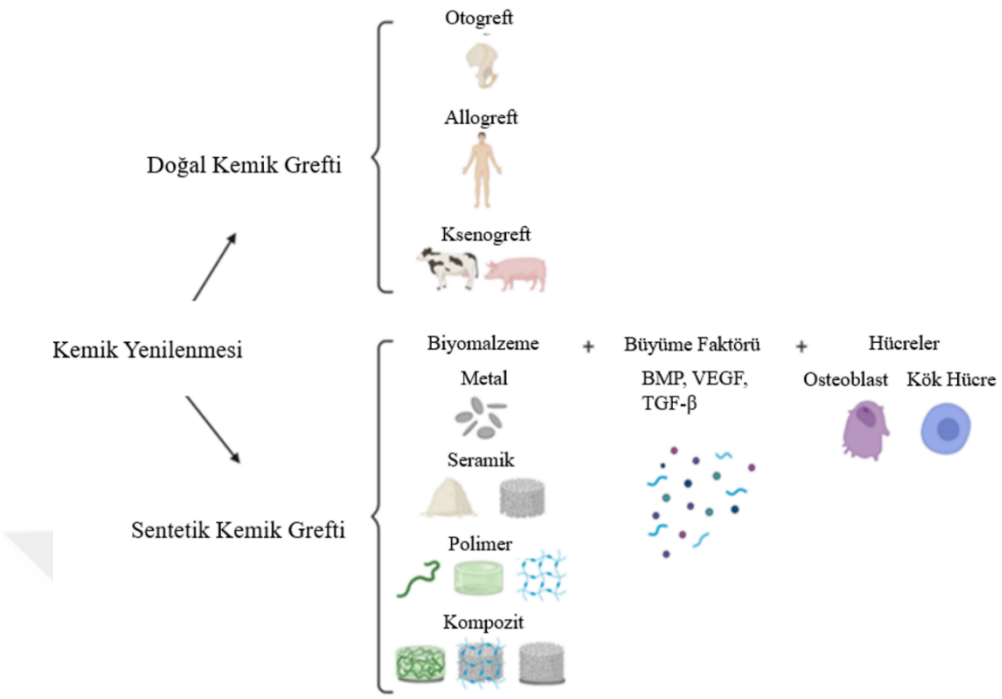
Polimer: Hem doğal hem de sentetik olarak kullanılabilen bir malzeme grubudur ve geniş bir malzeme çeşitliliğine sahiptir. Doğal polimerler, hücresel dış matris (ECM) ile benzerlikleri nedeniyle gerekli mikroçevreyi uygun şekilde

oluşturabilmektedirler [52]. Yüksek derecedeki biyouyumlulukları ve düşük immünolojik riskleri ile kitosan, aljinat, kolajen ve jelatin gibi doğal polimerler, araştırmalarda ve ticari ürünlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak zayıf mekanik özellikler, hızlı degredasyon süresi ve sınırlı üretim kapasitesi gibi dezavantajlara sahiptirler. Sentetik polimerler doğal polimerlere göre düşük biyouyumluluk, yüksek enflamatuvar risk ve zayıf hücre adezyonuna sahip olsa da; mekanik mukavemet, üretim kolaylığı, uzun saklama ömrü ve düşük maliyetinden dolayı avantajları vardır [27]. Sentetik polimerlerin degradasyon süreleri polimerin kompozisyonu değiştirilerek kontrol edilebilmektedir [53]. Polietilen glikol (PEG), polilaktik asit (PLA), polikaprolakton (PCL) gibi malzemeler, sentetik polimerler arasında yer almaktadır [52].

Metal: Metaller ve alaşımları; yüksek korozyon direnci, biyouyumluluk ve üstün mekanik dayanım gibi avantajlara sahiptir. Ancak, doğal kemik yapısından daha yüksek sertliğe sahip olmaları nedeniyle kemik rezorpsiyonunu tetikleyerek implantların başarısızlığına neden olabilecek "Gerilme Kalkanı" oluşumuna yol açabilirler [60]. Metalik biyomalzemelere örnek olarak paslanmaz çelik, titanyum, tantalyum, niobium ve alaşımları örnek verilebilir [10].

3.3 Kemik Doku Mühendisliği: Defekt Onarımı

Kemik defektlerinin tedavisinde kullanılan greftler doğal veya sentetik olabilmektedir (Şekil 3.2). Doğal greftler içinde; otogreft, allograft veya ksenograft yer almaktadır [62].



Şekil 3.2 Kemik rejenerasyonu için kullanılan greftler ve biyolojik faktörler [61]

Otogreft, hastanın kendi vücudundaki farklı bir bölgeden alınan greft çeşididir. Vücut tarafından reddedilme veya hastalık bulaşma riski olmadığı için otogreftler, greft türleri arasında altın standart olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanında; sınırlı toplama alanı, uzun operasyon süresi, ameliyat sonrası hastada enfeksiyon riski ve oluşabilecek komplikasyonlar dezavantajlarından bazılarıdır [36]. Berlet ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre; yaşlı hastalardan toplanan MSC'lerin kemik oluşturma (osteojenik) potansiyeli ve hareket etme (göç) yeteneği azalmış durumdadır. Bu, kullanılan en yaygın greft materyallerinden biri olan otogreftin yaşlı hastalarda genç hastalar kadar etkili olmayabileceğini göstermektedir [62]. Kullanılan bir başka greft çeşidi allogreftlerdir. Allogreft, aynı türden farklı genetiğe sahip bireylerden alınan greft türüdür. Greftler, kadavradan sağlanabildiği gibi bir başka bireyden de alınabilmektedir [19]. Kullanım esnekliği, farklı boyut ve şekillerde bulunabilme kolaylığı, hastada ek bir operasyon işleminin gerçekleşmemesi gibi avantajlara sahiptir, ancak zaman zaman sterilizasyon kaynaklı problemler oluşabilmektedir. Otogreftler ile karşılaştırıldığında; daha immunojenik, daha az osteindüktif ve osteokondüktif özelliktedir [19,36]. Diğer yandan, Van de Vijfeijken ve arkadaşlarının sistemik incelemelerinde, otolog greftlerin allogreftlere kıyasla daha yüksek komplikasyon riski taşıdığı

belirtilmiştir. Operasyon sonrası komplikasyonlar arasında hematom, seroma ve enfeksiyon en sık rastlanan sorunlar arasında yer almaktadır [63]. Diğer bir greft çeşidi ise ksenogrefttir. Ksenogreftler, insan dışındaki türlerden alınan greftlerdir. Maliyet ve temin edilebilecek greft miktarı yönünden avantaja sahiptir [64]. Diğer yandan; hastalık bulaşma riski, implantasyondan sonra konakçı dokunun bağışıklık sistemine karşı tepki oluşturma olasılığı gibi bir takım biyolojik zorluklar ile karşılaşılabilmektedir [65]. Sentetik greftler; seramik, polimer, metal gibi farklı malzeme veya malzeme gruplarından oluşabilen, gözeneklilik, yüzey özellikleri, mekanik dayanım gibi parametrelerin ayarlanabildiği doku materyalleridir [64].

İdeal kemik grefti seçiminde; defekt bölgesi, kullanılacak greftin boyutu ve şekli, işlem maliyeti, etik konular, biyomekanik özellikler gibi farklı parametreler rol oynasa da, hastanın tercihleri de değerlendirilmektedir. Klinik uygulamalarda kullanılan greft çeşitleri hastaların yaklaşımları ve sosyokültürel durumlardan kaynaklı olarak değişebilmektedir. Dental alanda yapılan bir çalışmada; hastaların tercihlerinden kaynaklı en çok reddedilen ksenogreft (%67) olup, daha sonra allogreftler (%54), ekstraoral otojen greftler (%28), sentetik greft (%13) ve intraoral otogreft (%11) gelmektedir [66]. İyileşme sürecinde pek çok faktör rol oynamaktadır. Hastada diyabet, obezite, enflamatuar artrit gibi rahatsızlıkların bulunması kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca sigara ve alkol tüketimi de iyileşme için risk teşkil etmektedir. Alkol, hücrelerin çoğalmasını etkilerken; sigara, ateroskleroza ve kan akışının yavaşlamasına sebep olmaktadır [67].

3.4 Kemik Doku İskelelerinin Üretim Yöntemleri

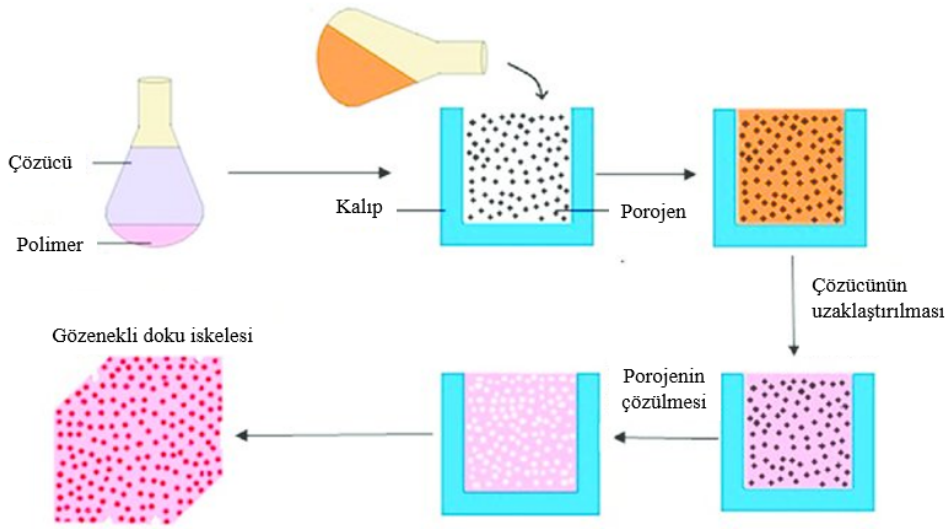
Kemik doku iskelelerinin üretimi için kullanılan pek çok teknik bulunmaktadır. Gaz köpüklendirme tekniğinden üç boyutlu basım yöntemine kadar her teknikte; fizikokimyasal, morfoloji ve mekanik açıdan kemiği taklit edebilecek doku iskelelerinin üretimi hedeflenmektedir [12,68].

3.4.1 Kemik Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Geleneksel Yöntemler

3.4.1.1 Çözücü Döküm Partikül Uzaklaştırma Tekniği

Çözücü döküm partikül uzaklaştırma metodu; sıklıkla kullanılan, kolay uygulanan ve gözenek büyüklüklerinin kontrol edilebildiği bir üretim yöntemidir. Polimerlerin

gözenekli bir yapı oluşturması için izlenen yöntemde ilk olarak polimer, organik bir çözücü içinde çözülüp bir çözelti elde edilir. Çözeltinin içine suda çözünebilen (sodyum klorür gibi) bir porojen (gözenek oluşturucu madde) eklenir ve karıştırılır. Karışım, istenen şekli alabilmesi için bir kalıba dökülür. Daha sonra, karışımdan çözücüyü uzaklaştırmak için buharlaştırma veya liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yöntemlerinden biri kullanılır. Son olarak, polimer-porojen karışımı su yardımı ile filtre edilir. Böylece porojen madde çözülüp, gözenekli doku iskelesi elde edilir (Şekil 3.3). Yöntemde ekstra bir ekipmana ihtiyaç duyulmamakla birlikte, toksik çözücü yeteri kadar uzaklaştırılamadığında biyomoleküllerin aktivitesini azaltarak denatürasyona sebep olabilir [69-70].

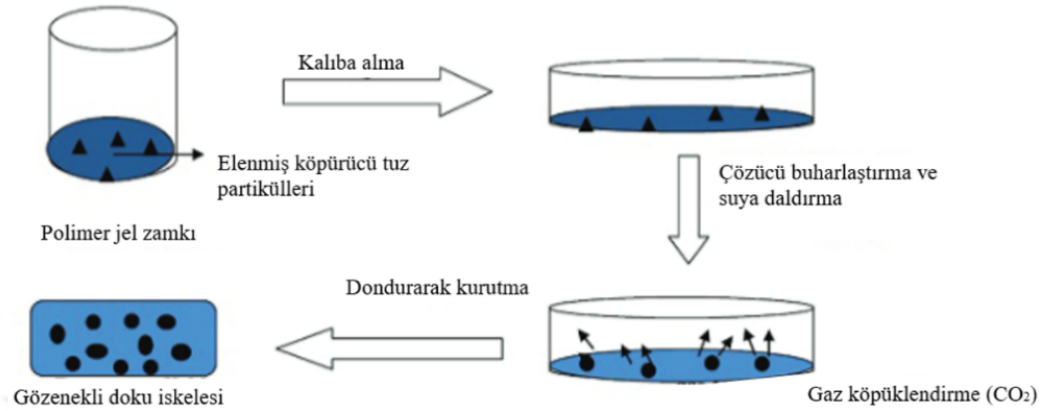


Şekil 3.3 Çözücü döküm partikül uzaklaştırma yöntemiyle doku iskelesi üretiminin aşamaları [71]

3.4.1.2 Gaz Köpüklendirme Tekniği

Gözenek oluşturmak için organik çözücülerin yerine inert gazın köpüklendirme ajanı olarak kullanıldığı doku iskelesi üretim yöntemidir (Şekil 3.4) [70]. İnert özelliklerinden dolayı gaz köpüklendirme ajanı olarak karbondioksit (CO_2) ve azot (N_2) gazları kullanılmaktadır. Gaz köpüklendirme tekniği, uygun maliyetli ve işlemin hızlı gerçekleştiği bir yöntemdir [38]. Bu yöntem ile üretilen doku iskelelerinde gözenek oranı genellikle %85-%93, gözenek boyutu ise 30-700 µm aralığında değişmektedir. Hücrelerin yüksek yoğunlukta olduğu ideal polimerik iskelelerin üretiminde kullanılabilir [38,72]. Doku iskelelerinde birbirine bağlı

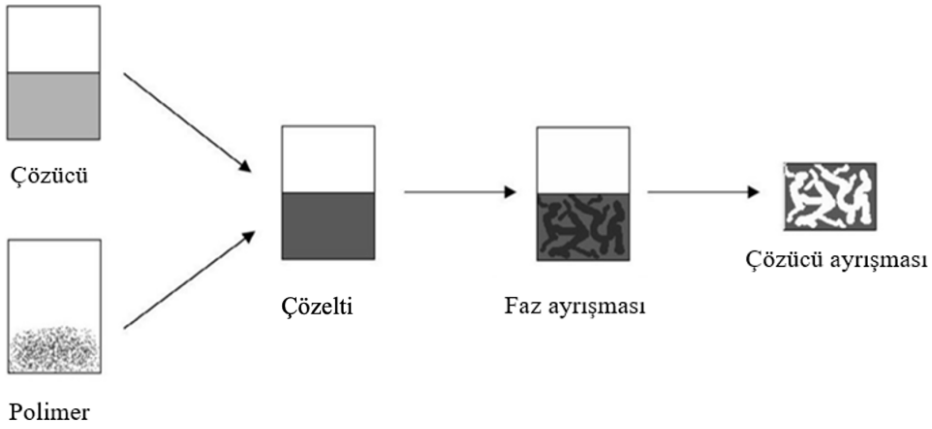
gözeneklerin oluşturulması ve karmaşık geometrilere sahip iskele yapısının üretilmemesi tekniğin dezavantajlarından bazılarıdır [38].



Şekil 3.4 Gaz köpüklendirme yöntemiyle doku iskelesi üretiminin aşamaları [73]

3.4.1.3 Faz Ayrımı Tekniği

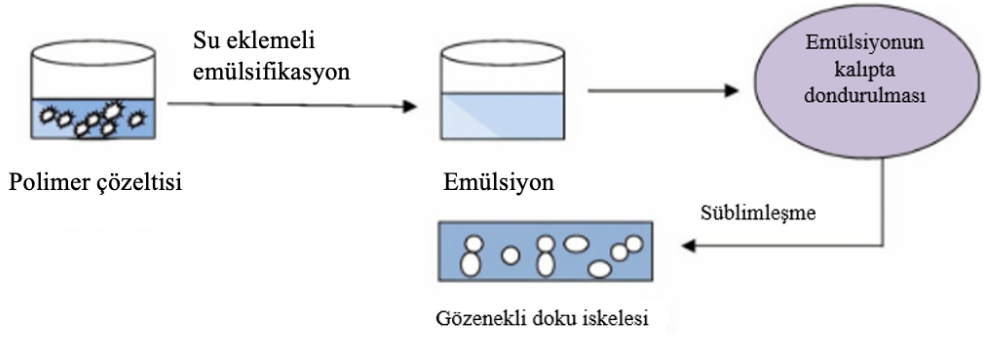
Faz ayrımı tekniğinde ısı indüklemesi ile solventsiz ortamdan gözenekli membran veya filmler oluşturulabilmektedir (Şekil 3.5). Ancak solvent kullanılmadan uygulanan faz ayrımı işleminde, genelde heterojen gözenekler meydana geldiği için doku mühendisliği uygulamalarında çok sık tercih edilmemektedir [74]. Gözenek yapıcı ajan (porojen) kullanımı ile üç boyutlu doku iskelesinde oluşan gözenek büyüklükleri kısmen kontrol edilebilmektedir [74-75]. Termal olarak indüklenen faz ayrımı (Thermally Induced Phase Separation; TIPS) yönteminde, polimer çözeltisi yüksek sıcaklıkta homojen bir şekilde hazırlandıktan sonra düşük sıcaklıkta faz ayrışımını uyarmak için sıcaklık değişimi kullanılır. Bu teknikle polimer, ayrı fazlar haline getirilir. Dondurarak kurutma işlemiyle gözenekli bir iskelet yapısı oluşur ve nanometre ölçeğinde gözenekli elyaflar oluşturulur [38].



Şekil 3.5 Faz ayrışması yöntemiyle ile doku iskelesi üretiminin aşamaları [76]

3.4.1.4 Dondurarak Kurutma

Liyofilizasyon olarak da bilinen dondurarak kurutma tekniğinde polimer, öncelikle uygun bir çözücü ile çözündürülür ve elde edilen çözelti, donma noktasının altında bir sıcaklığa soğutulur. Bu işlem sonrasında, vakum altında süblimleşme gerçekleştirilerek gözenekli doku iskelesi üretilmektedir (Şekil 3.6). Liyofilizasyon yönteminde, doku iskelesinin gözeneklilik oranı ve gözenek boyutu çeşitli parametreler (polimer çözeltisinin konsantrasyonu ve viskozitesi, sistem içinde dağılmış sulu fazın miktarı) kontrol edilerek ayarlanabilmektedir. Üretim sırasında su ve buz kristalleri gibi medikal uygulamalara uygun malzemeler tercih ediliyor olsa da, polimerin karışması için sitotoksik çözücüler de kullanılabilmektedir [38], [77].

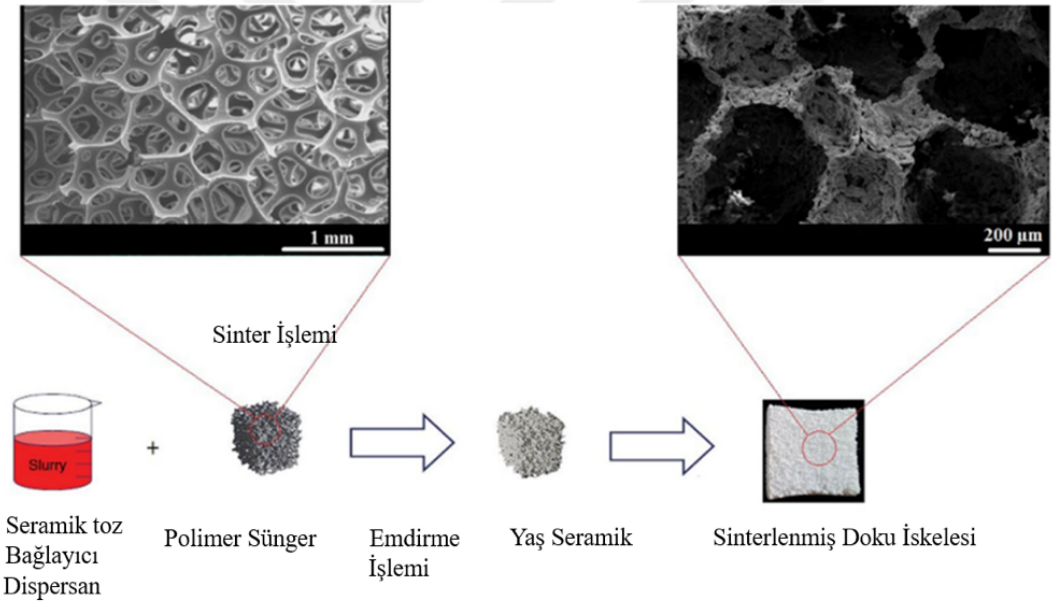


Şekil 3.6 Dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskelesi üretiminin aşamaları [72]

3.4.1.5 Polimer Sünger (Replika) Yöntemi

Polimer sünger (Polymeric Sponge; PS) yöntemi, seramik bir çamurun polimerik bir süngere emdirilmesinin ardından kurutma ve sinterlenme adımlarının

uygulandığı doku iskelesi elde etme tekniğidir. Kullanılan polimer sünger, gözenekli yapı iskelesi için bir şablon görevi görmektedir. Kararlı bir bulamaç oluşturmak için seramik parçacıkları ve suyun yanı sıra bağlayıcı (polivinil alkol ve polivinil bütil) ve dağıtıcı (trietil fosfat ve polietilen glikol) gibi malzemeler de kullanılmaktadır [78-80]. Doku iskelesi üretiminde poliüretan (PU) sünger, seramik bulamaca daldırılmaktadır (Şekil 3.7). Bu işlemi takiben, süngerin seramik bulamacı emmesi ve kurutma işlemi gerçekleştirilmektedir. Kurutma işleminden sonra, 1000-1300˚C sıcaklık aralığında süngerin yanması sağlanmaktadır. Son ürün; gözenekleri arasında yüksek bağlantıya sahip bir doku iskelesidir. Yüksek termal ve kimyasal kararlılık özellikleri nedeniyle polimerik sünger yöntemi, doku iskelesi üretim yöntemleri arasında yaygın şekilde kullanılmaktadır [81].



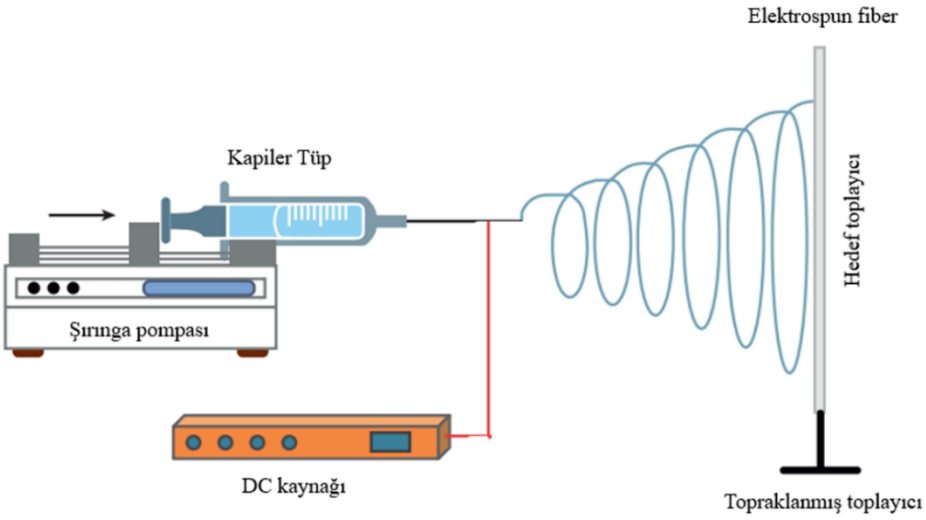
Şekil 3.7 Polimerik sünger yönteminin aşamaları [68]

Bu yöntem, mekanik olarak, trabeküler kemiğe benzer kemik doku iskelelerinin elde edilebilmesi için uygundur. Ayrıca, %90'a kadar ulaşabilen yüksek gözeneklilik oranı sayesinde birbirine bağlı gözenek yapısının oluşturulması da gerçekleştirilebilmektedir. İskelelerin mimarisi kontrol edilebilir olup; bu teknik kullanılarak seramik, metal ve kompozit esaslı doku iskelelerinin üretimi mümkün olabilmektedir [68].

3.4.2 Kemik Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Modern Yöntemler

3.4.2.1 Elektroeğirme Tekniği

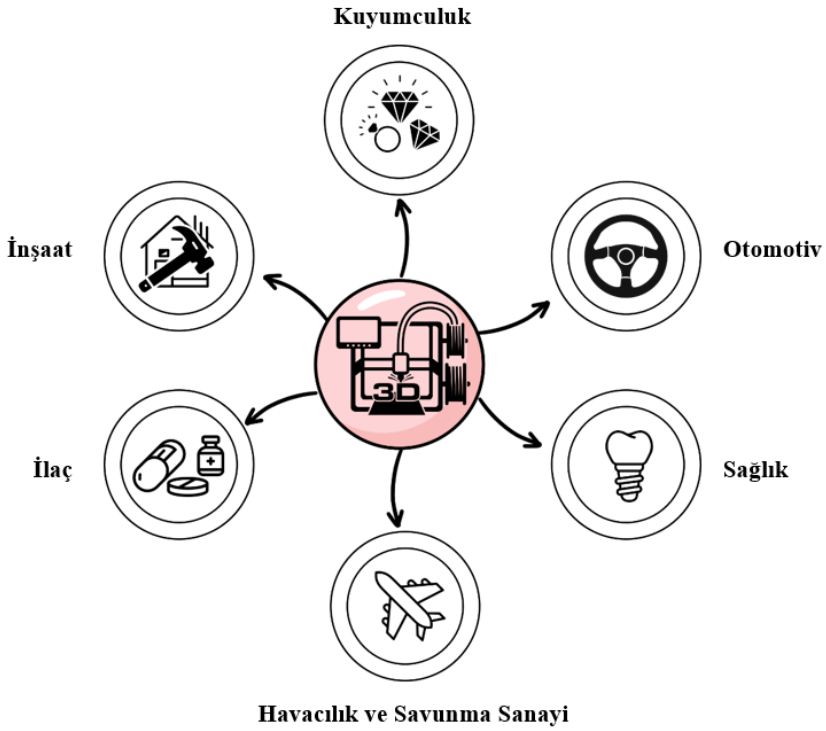
Şırınga içindeki çözeltiden çıkan polimer damlacıkları, elektrostatik alan varlığında voltaj uygulandığında kollektör levha üzerinde birikerek mikro veya nano ölçekte ince lifler halinde elde edilmektedir [29, 76, 82]. Bu yöntem, nanometre boyutlarında fibriller üretebildiği için ECM yapısını da taklit edebilmektedir [82]. İşlemi etkliyen parametreler arasında; çözelti, üretim ve ortam faktörleri bulunmaktadır. Çözelti parametreleri arasında konsantrasyon, molekül ağırlığı ve viskozite değişimleri; üretim parametreleri arasında, nanoliflerin morfolojisi yer almaktadır. Konsantrasyonun düşük olduğu çözeltilerde, yüzey gerilimi etkilerinden kaynaklanabilecek istenmeyen damlacıklar oluşabilmektedir. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlu çözeltilerde ise çözeltinin yüksek viskozitesi nedeniyle elyaf yapısında sorunlar oluşabilmektedir. Ayrıca, polimer konsantrasyonunun artmasıyla fiberlerin çapı da artabilmektedir. Uygulanan gerilim, çözeltinin besleme hızı, şırınga ile kollektör arasındaki mesafe işlem parametreleri arasında yer almaktadır. İşlemin yapıldığı ortamın nemi ve sıcaklığı ortam parametreleri olarak etki etmektedir [83]. Bu teknoloji; yapay organ bileşenleri, doku mühendisliği iskeleleri, implant malzemeleri, ilaç taşıma sistemleri ve yara örtüsü gibi biyomedikal cihaz ve malzemelerin üretiminde kullanılabilmektedir [76]. Yüksek voltaj güç kaynağı, şırınga ve toplayıcı kısımlarından oluşan elektroeğirme cihazı Şekil 3.8'de gösterilmektedir.



Şekil 3.8 Elektroeğirme cihazının bileşenleri [38]

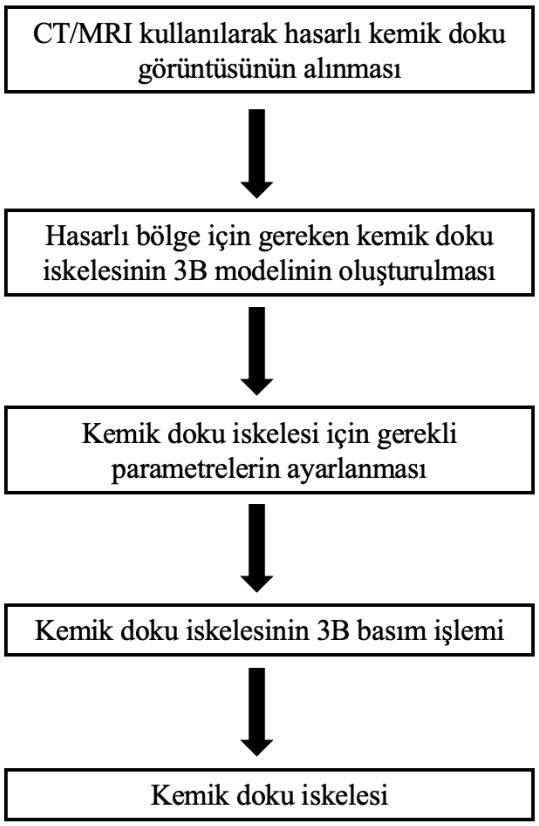
3.4.2.2 Üç Boyutlu Baskı Tekniği

Eklemeli imalat olarak da bilinen üç boyutlu basım teknolojisi, tasarlanan üç boyutlu dijital modelin, 3B (üç boyutlu) yazıcı aracılığı ile katman katman basılarak üretimini içeren bir teknolojidir [84]. Üç boyutlu basımın yaygınlaşmasında; üretim maliyeti (iş gücü, kalıp maliyeti vb.), zaman ve atık oluşumunda sağlanan tasarruf, karmaşık geometrilere sahip modellerin yüksek çözünürlükle basılabilmesi gibi faktörler büyük rol oynamaktadır. Geleneksel işlemlerle daha uzun sürede tamamlanacak çalışmalar, üç boyutlu basım tekniği sayesinde çok daha kısa sürede tamamlanabilmektedir [85]. Üç boyutlu basım, özellikle son yıllarda medikal, inşaat, otomotiv, elektronik gibi pek çok farklı alanlara entegre edilmiş ve en yaygın kullanılan teknolojilerden biri haline gelmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 3B baskı tekniğinin kullanım alanları [86-89]

Üretilmesi hedeflenen yapının üç boyutlu olarak basılabilmesi için belirli aşamaların uygulanması gerekmektedir. Bu adımların sıralaması Şekil 3.10'da verilmektedir. İlk adımda, basılmak istenen parçanın üç boyutlu modeli, bir bilgisayar destekli tasarım (Computer Aided Design; CAD) aracılığıyla tasarlanmaktadır. Daha sonra, bu model "stereolitografi" (STL) adı verilen dosya formatına dönüştürülmektedir. STL formatı, üç boyutlu tasarlanan modellerin yüzeylerini matematiksel bir sıralama ile çok sayıda üçgene bölerek tanımlamaktadır. Modelleme adımını takiben parçanın modeli yazdırılabilir katmanlara dilimlenmektedir. Dilimleme programında; katmanların kürleme süreleri, ışık yoğunluğu ve katman kalınlığı gibi parametreler ayarlanmaktadır. Son adım olan basım işleminde, katmanlar üst üste eklenerek hedeflenen nesne üretilmektedir. Bu teknoloji ile, geleneksel yöntemin dezavantajları olan kalıp gereksinimi ve uzun işlem adımları ortadan kaldırılarak, ekonomik ve homojen yapılar elde edilebilmektedir [87].



Şekil 3.10 3B baskı tekniğinin aşamaları [90]

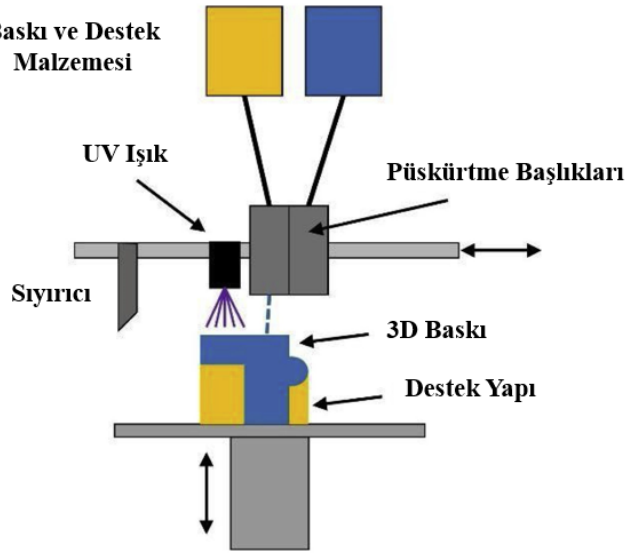
Günümüzde farklı üç boyutlu basım teknikleri mevcuttur. Tablo 3.1'de ASTM F2792 standardına göre kategorize edilmiş üç boyutlu basım teknikleri verilmektedir.

Tablo 3.1 Üç boyutlu basım teknikleri ve özellikleri

3B Basım Tekniği	Avantaj	Dezavantaj	Malzeme	Ref.
Malzeme Püskürtme (MJ)	Yüksek yüzey kalitesi Üretim hassasiyeti İnce katman kalınlığı	Püskürtme başlıklarının tıkanması Yüzey pürüzlülüğü	PLA ABS Poliamid	[91-92]
Toz Yatağı Füzyonu (PBF)	Yüksek hassasiyet Karmaşık parçaların üretilebilirliği Modelin destek yapıya ihtiyaç duymaması	Düşük yüzey kalitesi	Ti Ti6Al4V 316-paslanmaz çelik CaP Bileşikleri Biyoaktif camlar Plastik	[93-96]
Bağlayıcı Püskürtme (BJ)	Yüksek çözünürlük Yüksek yüzey kalitesi ile çoklu ürün üretebilme Destek yapıya ihtiyaç duyulmaması	Basım sonrası kürleme işlemi gereksinimi Ürünlerde mekanik olarak daha düşük dayanım	CaP bileşikleri Biyoaktif camlar	[93, 94, 95, 97]
Malzeme Ekstrüzyonu (ME)	Düşük maliyetli üretim Yüksek esneklik	Düşük yüzey kalitesi Boyutu büyük parçaların yavaş üretimi	PCL ABS Poliamidler	[93-95]
VAT Polimerizasyonu (VP)	Yüksek yüzey kalitesi ve pürüzsüz bitiş Karmaşık parçaların üretilebilirliği	Model oluşturulurken destek yapıya ihtiyaç olması Basım sonrası kürleme işlemi gereksinimi Basım yapılabilecek alan kısıtı	Biyopolimer Seramik kompozitler Kolajen PCL PLLA PLGA	[93, 94, 95, 97]

Malzeme püskürtme (Material Jetting; MJ) yönteminde, sıvı formdaki fotopolimerler damlacık şeklinde yüzeye püskürtülür ve damlacıklar halindeki fotopolimerin UV ışık ile kürleme işlemi gerçekleştirilir. Katman kürlendikten sonra yapı platformu belirli bir katman kalınlığı seviyesine indirilir ve bir önceki

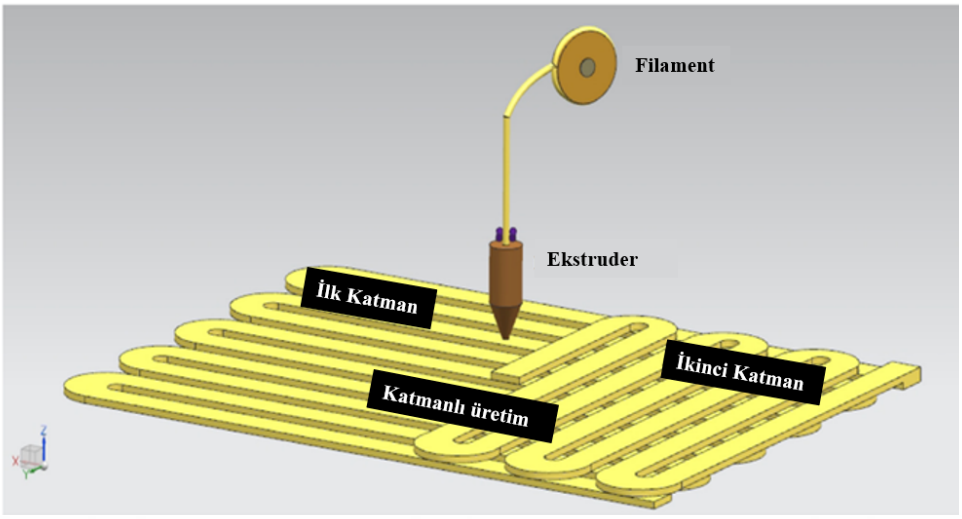
katmanın üzerine yeni sıvı malzeme püskürtülür. MJ ve stereolitografi (Stereolithography; SLA) yöntemleri, kullanılan malzeme ve ışık kaynağı yönlerinden benzerlik göstermektedir. Ancak MJ teknolojisinde malzeme damlacık formunda yüzeye püskürtülüp kürleme yapılırken, SLA tekniğinde malzeme bir tankta bulunur ve lazer ışık, malzemeyi katman katman katılaştırarak yapıyı inşa etmektedir. MJ doğrudan yüzeye uygulama yaparken, SLA tank içindeki sıvı üzerinde çalışır ve numune yavaşça yükseltilerek yapı oluşturulmaktadır [91-92]. Şekil 3.11'de MJ yazıcı sistemi gösterilmektedir.



Şekil 3.11 Malzeme püskürtme (MJ) sistemi [91]

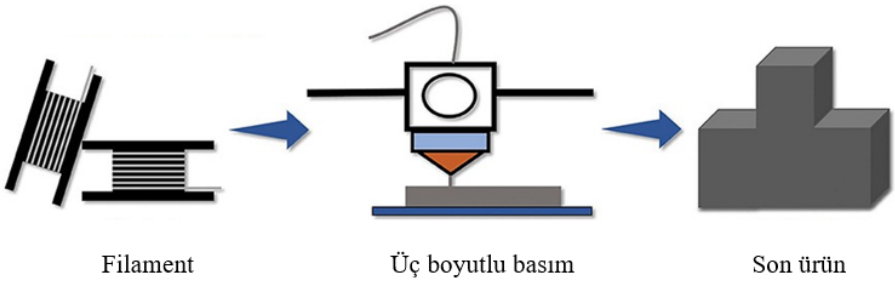
MJ teknolojisinin avantajları arasında; yüksek baskı hızı, üretim hassasiyeti ve düşük maliyet yer alırken; püskürtme başlıklarının tıkanması tekniğin başlıca dezavantajları arasında yer almaktadır [91].

Malzeme ekstrüzyonü (Material Extrusion; ME) kategorisinde yer alan ve en sık kullanılan basım tekniklerinden biri olan eriyik yığın modelleme (Fused Deposition Modelling; FDM) teknolojisinde; termoplastik filament, camsı geçiş sıcaklığına kadar ısıtılıp eriyik haline getirilmekte ve katmanlar halinde basılmaktadır. Şekil 3.12'de FDM türü üç boyutlu yazıcıdaki basım işlemi gösterilmiştir.



Şekil 3.12 FDM sisteminde katmanlı üretim [98]

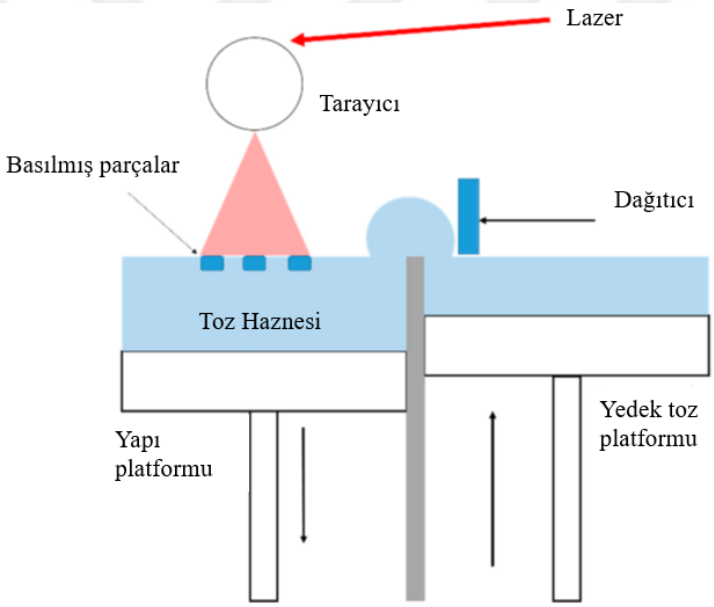
Üç boyutlu basım teknikleri arasında, düşük üretim maliyeti ve kullanımı sırasında detaylı bilgi gerektirmemesi nedeniyle FDM tekniği yaygın olarak tercih edilmektedir. FDM tekniğindeki sınırlayıcı en önemli faktörlerden biri, yalnızca termoplastik polimerlerin kullanılabilmesidir. Ekstrüzyon temelli 3B basım uygulamalarında, PCL (polikaprolakton) ve PLGA (polilaktik-ko-glikolik asit) gibi biyomalzemeler kullanılmaktadır [93, 99]. FDM sisteminde şekillerin ince filament katmanlarından oluşturulması, filamanın termoplastisitesinin bu süreçte önemli bir rol oynamasına neden olmaktadır. Bu durum, filamentin baskı işlemi sırasında katmanlar arasında bağ oluşturma kabiliyetini ve baskı sonrasında oda sıcaklığında katılaşma yeteneğini belirler. Katmanların kalınlığı, genişliği ve filamentin yönelimi, basılan parçanın mekanik özelliklerini etkileyen önemli işlem parametrelerinden bazılarıdır (Şekil 3.13) [100].



Şekil 3.13 FDM basım tekniği ile doku iskelesi üretim aşamaları [93]

Toz Yatak Füzyonu (Powder Bed Fusion; PBF) teknolojisinde, ürünün istenilen forma erişebilmesi için tozun eritilmesi gerekmekte ve bu süreç için bir ısı

kaynağına ihtiyaç duymaktadır. Kullanılan ısı kaynakları arasında ısı, elektron ve lazer bulunmaktadır. Bu teknik, toz malzemenin bir yayıcı tarafından yapı platformu üzerine dağıtılmasını ve ardından yazıcı başlığının ısı kaynağından alınan termal enerji ile malzemeyi birleştirerek üç boyutlu bir yapı haline getirilmesini içermektedir [96, 101]. Eritme ve birleştirme amacıyla kullanılan termal enerjinin kaynağına ve ısıtma seviyesine bağlı olan bu teknoloji içerisinde; selektif lazer sinterleme (Selective Laser Sintering; SLS), selektif lazer eritme (Selective Laser Melting; SLM) ve elektron ışın eritme (Electron Beam Melting; EBM) teknikleri bulunmaktadır [9]. SLM tekniği metal malzemelerde, SLS tekniği plastiklerde, EBM tekniği ise hem plastik hem de metallerde kullanılabilmektedir [96]. Şekilde 3.14'de SLS üç boyutlu yazıcının bölümleri gösterilmiştir.

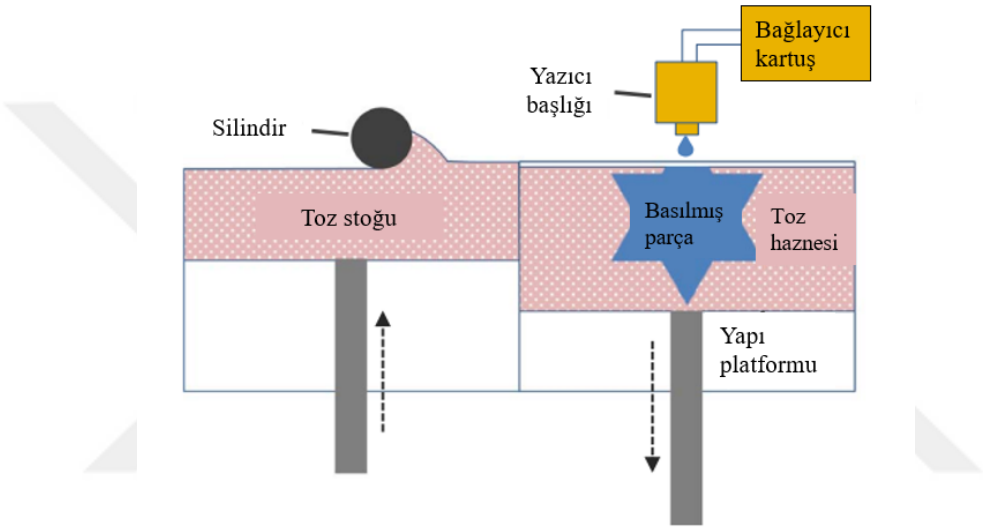


Şekil 3.14 SLS yazıcının ana bileşenleri [102]

İlk olarak, toz malzemenin bulunduğu rezervuar platformu, nesnenin inşa edileceği yapı platformuna doğru yukarı hareket etmektedir. Bu hareket sonrasında, toz malzemenin yapı platformuna ilerlemesi ve tüm alana eşit şekilde dağıtılabilmesi için bir dağıtıcı kullanılmaktadır. Daha sonra, nesnenin belirlenmiş tasarımına uygun olarak, toz yatağını X ve Y eksenleri boyunca belirli bir düzende tarayan mavi diyot lazer devreye girmektedir. Bu lazer, toz parçacıklarına iletilen enerji miktarına bağlı olarak, parçacıkların kısmen ya da tamamen birleşmesini sağlamaktadır. Bu birleşme gerçekleştikten sonar yapı platformu bir alt katmana

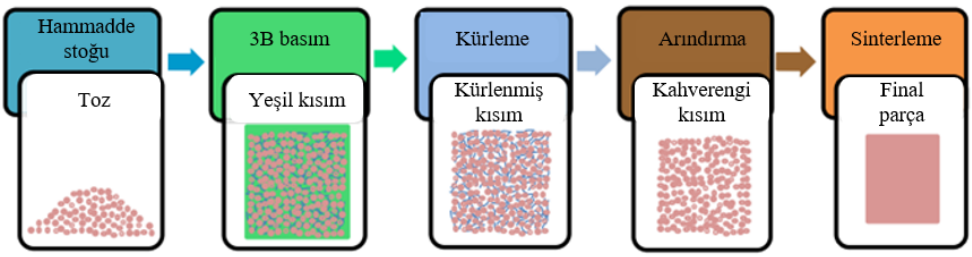
inmekte ve sinterlenmiş katmanın üzerinde yeni bir toz katmanı oluşturularak, nesnenin Z ekseni boyunca katman katman oluşturulmasına olanak tanınmaktadır. Bu süreç, nesne tamamlanana kadar tekrarlanmaktadır [102].

Bağlayıcı Püskürtme (Binder Jetting; BJ) tekniğinde kullanılan üç boyutlu yazıcının ana bileşenleri arasında toz stoğu, yapı platformu, silindir, bağlayıcı kartuş ve yazıcı başlığı yer almaktadır. Bağlayıcı püskürtme yazıcısının yapısı Şekil 3.15'de sunulmuştur [97].



Şekil 3.15 Bağlayıcı püskürtme yazıcısının ana bileşenleri [97]

Bağlayıcı püskürtme tekniğinde ilk olarak silindir, toz stoğundan ince bir toz tabakasını yapı platformunun üzerine yayarak toz haznesine aktarmaktadır. Ardından yazıcı başlığının uç kısmı 3B modelde tanımlanan alanlarda bulunan toz parçacıklarını bağlamak üzere, bu bölgelere bağlayıcı sıvı püskürtmektedir. Bir katmanın tamamlanmasını takiben yapı platformu aşağı indirilmekte ve toz stoğu yukarı kaldırılmaktadır. Ardından, sinterlenmiş katmanın üzerine yeni bir toz katmanı yayılmaktadır. Adımlar, parça tamamen basılana kadar tekrar edilmektedir. Basım işlemi tamamlandıktan sonra parça kürlenmekte ve bağlanmamış tozdan ayrıştırılarak hazır hale getirilmektedir [97]. Şekil 3.16'da bağlayıcı püskürtme basım yönteminin aşamaları gösterilmiştir.



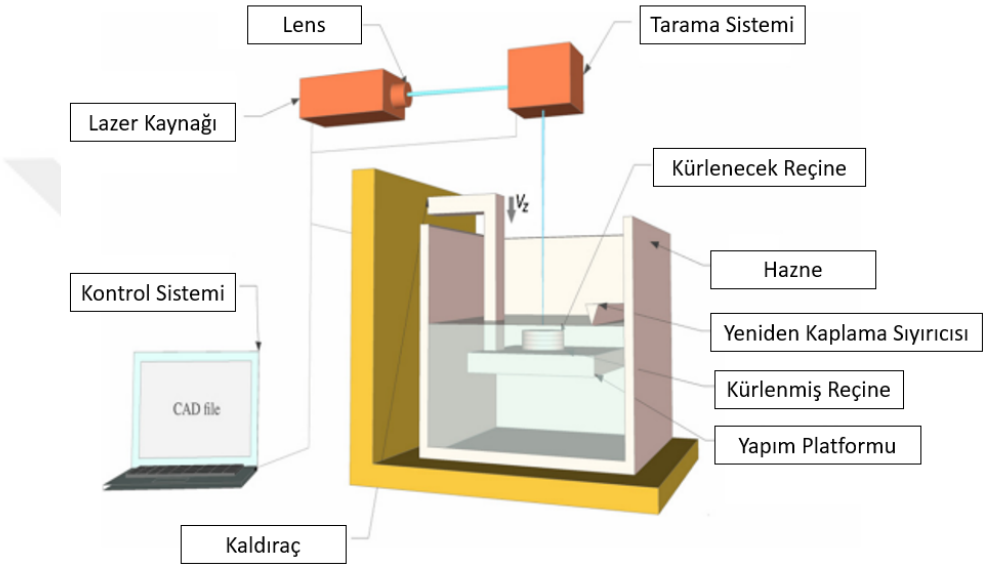
Şekil 3.16 Bağlayıcı püskürtme basım yönteminin işlem aşamaları [97]

Basılan parçaya "Yeşil Kısım" (Green Part) denilmektedir. Yeşil kısım, kürlenme (curing) adımında belirli bir sıcaklığa ısıtılır, bu sıcaklık yaygın olarak 200°C civarındadır ve bu sırada bağlayıcı kimyasalın buharlaşması, çapraz bağlanma veya yeşil kısmın güçlendirilmesi gerçekleştirilir. Arındırma (debinding) adımında özelliklerini iyileştirmek için malzeme genellikle 400°C ila 800°C arasında yakılarak "Kahverengi Parça" (Brown Part) üretilmektedir. Son adımda ise yoğunluğu ve mekanik özellikleri arttırmak için parça sinter işlemine tabi tutulmakta ve işlem bittiğinde son ürün elde edilmektedir [97].

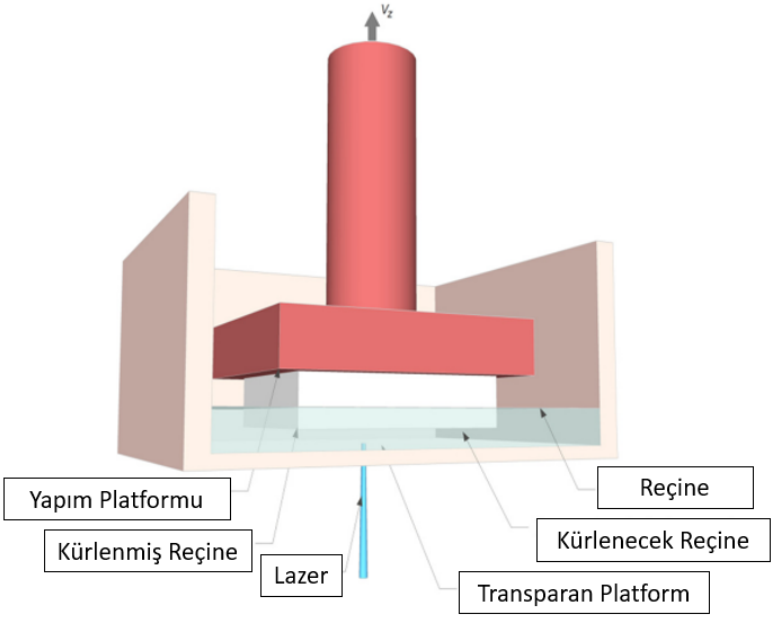
VAT polimerizasyon (VAT Polimerization; VP) basım teknolojisinde, fotopolimerizasyon adı verilen işlem uygulanmaktadır. Bu işlem, bir ışık kaynağı kullanılarak sıvı malzemelerin katman katman basılarak katı parçalara dönüştürülmesini içermektedir. Proseste "reçine" adı verilen ve ışıkla reaksiyona giren termoset malzemeler kullanılmaktadır. Reçineler belirli dalga boylarındaki ışık altında bekletildiklerinde, monomerler bir araya gelerek katı veya esnek geometriye sahip polimerlere dönüşmektedirler [103]. Monomer, oligomer, fotobaşlatıcı seçimi ve oranları gibi kritik noktalara ek olarak, kullanılan ışık kaynağının da sadece ışık miktarı değil ışığın dalga boyu da büyük öneme sahiptir. 200-400 nm aralığındaki ultraviyole (UV) ışık ile 400-700 nm aralığındaki görünür ışığın her ikisi de fotopolimerizasyon işleminde kullanılabilmektedir. Çoğunlukla çalışılan reçineler için gereken dalga boyu mavi bölge aralığında olanlardır [104], [105]. SLA (Sterolitografi), dijital ışık prosesi (Digital Light Process; DLP) ve sıvı kristal ekran (Liquid Crystal Display; LCD) 3B basım teknikleri ışık yolu ile basım teknolojisinde yer almaktadır ve fotopolimerizasyon yolu ile ürün elde edilebilmektedir. Belirtilen tekniklerin tümünde ışık kaynağı kullanılsa da;

kullanılan ışık türü, dalga boyu ve basım kalitesi gibi birçok parametre farklılık göstermektedir [104].

Şekil 3.17 ve 3.18'de gösterildiği gibi, SLA tekniğinin yukarıdan aşağı (top-down) ve aşağıdan yukarı (bottom-up) olmak üzere iki farklı türü mevcuttur. DLP türü basım teknolojisinde, SLA'deki lazer ışık kaynağı yerine malzemenin kürlenebilmesi için UV ışık kaynağı kullanılmaktadır [9].



Şekil 3.17 SLA yukarıdan aşağıya basım tekniğinin şematik gösterimi [105]

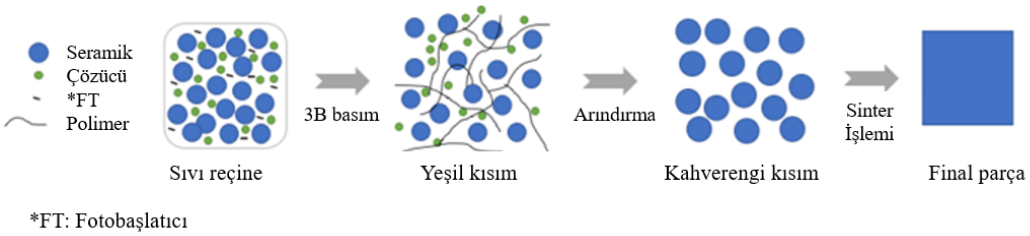


Şekil 3.18 SLA aşağıdan yukarıya basım basım tekniğinin şematik gösterimi [105]

Fotopolimerler tek başına kullanıldığında mekanik olarak yüksek değerler vermeyebilmektedir. Stereolitografi tekniği sadece polimer malzemelerin kullanımı ile sınırlı olmayıp, metal veya seramik tozlarının da kullanımı mevcuttur. Reçinenin, metal veya seramik tozun yanında bağlayıcı olarak kullanıldığı durumlarda yapının daha uzun süre dayanabildiği gözlemlenmiştir. Kullanılan tozlara; silika, alumina, hidroksiapatit, alüminyum ve bakır tozları örnek verilebilir. Ancak tozların reçine ile beraber 3B basım yolu ile kullanılabilmesi için bazı koşulları sağlaması gerekmektedir. Bu koşullar aşağıda sunulmuştur:

- Basım işlemi sonrasında oluşturulan yapıların, kürlenmemiş kısımlarının temizlenmesi ve sinterleme işlemlerine tabii tutulması.
- Hazırlanan seramik çamur viskozitesinin, yazıcı başlığını yeniden kaplayabilmesi için uygun değerlerde olması.
- Seramik çamurun yeterli miktarda biyoseramik toz içermesi [106].

Fotokürlenebilir reçine; monomer-oligomer, fotobaşlatıcı ve gerekli durumlarda dispersan maddeden oluşmaktadır.



Şekil 3.19 VAT polimerizasyon tekniğine ait işlem adımları [103]

"Yeşil kısım" tabiri, polimerik bir matris içinde süspanse edilmiş seramik ve polimerik karışımdan meydana gelen polimerize nesneleri tanımlamaktadır. Seramik yeşil kısımların üretimi sonrasında uygulanan en önemli iki işlem; seramik ürüne ileri mekanik özellikler kazandıran yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen "sinterleme" işlemi ve seramik bileşenden polimerik bağlayıcıyı çıkaran "bağ giderme" işlemidir. Bağ giderme süreci, polimer bağlayıcıyı ham gövdeden çıkarmakla görevlidir ve bu süreç; zayıf mekanik özellikler, yüksek iç gözeneklilik ve düşük yoğunluk gibi özelliklere sahip bir seramik bileşenin elde edilmesini sağlamaktadır (Şekil 3.19). Sinterleme, seramik üretim süreçlerinde yaygın uygulanan son işlem olup, polimerik bağlayıcıdan arındırılmış nesnenin mekanik

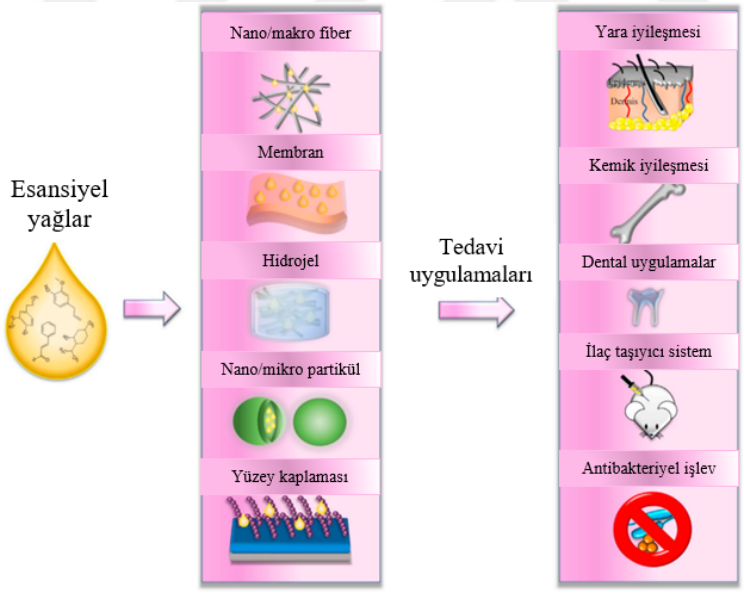
özelliklerini ve mikro yapısını iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Sıcaklık ve çalışma ortamı, sinterleme sırasında bileşenlerin mekanik özelliklerini ve mikro yapılarını etkilemektedir [103].

Fotopolimerler, ışığın etkisiyle fiziksel veya kimyasal özelliklerinde değişiklik gösteren maddelerdir [107]. Fotopolimerizasyon ise, ışığın uyarımıyla başlatılan bir polimerleşme reaksiyonudur. Bu süreçte, çoğu monomerin ışık altında yeterli verimle serbest radikaller veya iyonlar üretememesi nedeniyle genellikle bir fotobaşlatıcı veya redoks reaksiyonu kullanılmaktadır. Isıl polimerizasyon ile karşılaştırıldığında, fotopolimerizasyonun sunduğu avantajlar arasında, kısa reaksiyon süreleri ve düşük sıcaklıkta polimerizasyon yer almaktadır [108].

In vivo testlere ait derleme literatür çalışması; 3B basılmış kemik doku iskelelerinin in vivo ortamda kullanımıyla ilgili çeşitli olumlu sonuçlar elde edildiğini belirtmektedir. Bu sonuçlar; defekt bölgesinde daha hızlı iyileşme, tedavi edilen hayvanlarda kolajen liflerinin yoğunluğunun artışı, yeniden epitelizasyonun uyarılması ve yeni kan damarı oluşumunun teşvik edilmesi olarak belirtilmiştir. Ayrıca, 3B kemik greftlerinin, hücre göçünü ve kemik iyileşmesini destekleyen mikro ortamlar oluşturmak için umut verici olduğuna dikkat çekilmektedir. Bu etkinin nedenleri arasında, ayarlanabilir gözenek boyutları ve düzenli katmanların varlığı gibi özellikler bulunmaktadır [109].

4
ANTİBAKTERİYEL KAPLAMA

Biyomedikal uygulamalar kapsamında; enzimler, proteinler, polisakkaritler ve vitaminler gibi çeşitli biyoaktif bileşiklerin kullanımı uzun yıllardır araştırılmaktadır. Bu bileşikler arasında, fenol ve aromatik bileşen grubunu bulunduran uçucu yağlar (Essential Oil; EO); tıp, farmasötik, kozmetik, gıda ve parfümeri sektörlerinde fitoterapötik ajan olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Uçucu yağların; antibakteriyel, anti-inflamatuar, anti-kanser ve antioksidan gibi özellikleri ile tanındığı bilinmektedir. Son yıllarda uçucu yağların biyomalzemelerle entegre edilmesi sonucunda üretilen medikal yapıların biyolojik performansı iyileştirilmiştir. Bu nedenle uçucu yağların; nanofiberler, fiberler, yüzey kaplamaları, hidrojeller gibi çeşitli biyomedikal ürünlerde kullanılması yaygınlaşmaya başlamıştır (Şekil 4.1) [86].



Şekil 4.1 Uçucu yağların kullanım alanları ve uygulandığı ürünler [86]

Klinik çalışmalar; cerrahi işlem ve implantlardan kaynaklanan bakteriyel enfeksiyonlar oluşma ihtimalinin yüksek olduğunu ve hastalarda ikinci bir cerrahi işlem gereksinimine yol açtığını göstermektedir. Ortopedik enfeksiyonların tedavisindeki başlıca zorluklar; implantlar üzerinde bakteri kolonizasyonu ve

biyofilm oluşumudur. Bu durum ilaçların etkisini azaltmanın yanında vücut bağışıklığının düşmesine sebep olmasından dolayı kemik yenilenmesi geciktirir.

Günümüzde antibakteriyel stratejilerin etkin kullanımı ve yeni antibakteriyel ajanların geliştirilmesi, oluşabilecek bakteriyel enfeksiyonlar için büyük önem taşımaktadır. İlaç ve/veya iyon yüklemesi ve kaplama işlemi gibi fiziksel yöntemler ile doku iskelelerine antibakteriyel özellik kazandırabilmektedir [16].

İyigündoğdu ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir araştırmada, limon otu olarak da bilinen melisa/oğulotu (Melissa Officinalis-MEO) bitkisinden elde edilen antibakteriyel özellikli uçucu yağ kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında üretilen MEO uçucu yağı içeren PCL membranların, bakterilen %99'undan fazlasını inhibe edebildiği gözlemlenmiştir [110]. Ünalan ve ekibinin tarçın uçucu yağı kullanılarak yürüttüğü kemik doku mühendisliği çalışmasında ise, antibakteriyel ve antioksidan etkilerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Replika yöntemi ile üretilen kemik doku iskelelerinin, tarçın uçucu yağı (Cinnamon Oil; CO) ve soya proteini (Soy Protein; SP) ile kaplandığı ve CO yüklü iskelelerin antibakteriyel aktivite testlerinde etkili bir inhibisyon bölgesi oluşturduğu; antioksidan aktivite testlerinde ise CO yüklü doku iskelelerinin antioksidan aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir [111].

Avustralya'ya has olan çay ağacı yağı/ÇY (Tea Tree Oil-TTO); antiseptik, antibakteriyel, antifungal, antiinflamatuar, antioksidan, antikanser ve antiviral gibi çok yönlü biyolojik aktiviteleri sayesinde hem farmasötik hem de kozmetik sektörlerde ticari değeri yüksek bir esansiyel yağ olarak kullanılmaktadır. ÇY'nin geniş uygulama yelpazesi, terpenoidler, monoterpenler ve seskiterpenler ile bunların oksijenli türevlerinin katkısıyla daha da artmaktadır [112]. Yapısındaki hidroksil grubu mikroorganizmalarla temas ettiğinde, hücresel membranın geçirgenliğini artırarak, pH dengesizliği ve membran hasarına yol açması sonucu antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir [113]. Alves ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir araştırmada, ÇY'nin kemik defektleri tedavilerinde antibiyotik kullanımını azaltma potansiyeli incelenmiştir. ÇY ile kaplanan kemik doku iskeleleri üzerinde yapılan bakteriyel testler sonucunda, ÇY'nin *Staphylococcus Aureus*'a karşı etkili olduğu ve hücre canlılığı açısından pozitif sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir.

5
DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışması kapsamında; polimerik sünger (Polymeric Sponge-PS) ve 3B stereolitografi (SLA) yöntemleri ile ticari hidroksiapatit (THA) biyoseramik tozu kullanılarak kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik doku iskelesi üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle her iki yöntemle doku iskeleleri üretilmiş; fiziksel, kimyasal, mekanik ve in vitro biyouyumluluk özellikleri incelenmiştir. Doku iskelelerinin morfoloji, gözenek yapısı ve oranı, basma dayanımı, hücre canlılığı ve hücre adezyonu verileri değerlendirilerek biyolojik uyumluluk açısından en uygun olan numunelere antibakteriyel etkinlik kazandırmak amacıyla çay ağacı yağı (ÇY) ile kaplama yapılmıştır. Bu kapsamda aşağıdaki hedeflere odaklanılmıştır:

1. **Kimyasal yapı:** Kemik; ağırlıkça %22 organik, %9 su ve %69 inorganik bileşenlerden oluşmaktadır. İnorganik komponent olarak hidroksiapatit [HA: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, kalsiyum hidroksi fosfat] bulunmakta olup, yapıya mekanik dayanım sağlamaktadır [70, 114]. Bu nedenle çalışma kapsamında doğal kemik yapısını en iyi şekilde taklit edebilmek için kemik doku iskelesi hazırlanmasında ticari hidroksiapatit (THA) kullanılmıştır.
2. **Gözenek (por) yapısı ve büyüklüğü:** Birbirine bağlı gözenek yapısı; hücre büyümesi, çoğalması ve tutunması, metabolik ürünlerin hücre içi alışverişi ve yapı iskelelerinin bozunma ürünlerinin uzaklaştırılmasına olanak tanır. Gözenek boyutu hücrelerin göçüne izin verecek ölçüde büyük, ancak hücrelerin iskeleye bağlanmasına izin verecek ölçüde de küçük olmalıdır [70, 115]. Kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan gözenek boyutları 100-900 µm arasında değişmektedir. 100 µm değerinden küçük gözenekler, hücrelerin iskele yapısına göç etmesini zorlaştırmakta ve doku iskelesi çevresinde fibröz doku oluşumuna neden olmaktadır. Bu durum anjiyogenez sürecini olumsuz etkilemektedir. 900 µm boyutundan büyük gözenekler ise doku iskelesinin mekanik dayanımını azaltabilmektedir [116-118]. Trabeküler kemikte gözenek boyutları 300-600 µm arasında bulunmaktadır [118]. Bu nedenle çalışmalar

kapsamında üretilecek doku iskelelerinde 100-900 µm arasında gözenek botutuna ulaşılması hedeflenmiştir.

3. **Mekanik dayanım**: Trabeküler (spongioz veya süngerimsi) yapı, bulunduğu kemik türüne ve işlevine göre farklı basma dayanımları oluşturabilmektedir. Örneğin; trabeküler yapının yer aldığı omur kemiği 2.4 MPa, kaval kemiği 5.3 MPa ve uyluk kemiği 6.4 MPa basma daynımı değerlerine sahiptirler. Bu nedenle trabeküler yapının yer aldığı kemiklerde basma dayanımı 0.1-16 MPa arasında değişmektedir [10, 119]. Bu veriler göz önüne alınarak tez çalışması kapsamında üretilecek doku iskelelerinin basma dayanımlarının 2-7 MPa arasında olması hedeflenmiştir.
4. **Biyouyumluluk:** Doku iskelelerinin biyouyumluluk özellikleri, genellikle, hücre canlılğı, hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşması incelenerek belirlenmektedir. Doku iskelesinde hücre yapışması hücrelerin çoğalması için kritik bir öneme sahiptir [120]. Literatür çalışmaları HA esaslı doku iskelelerinde hücre canlılığı için en az %70 değerinin sağlanması gerektiğini belirtmektedir [117, 121]. Bu veriler doğrultusunda tez çalışması kapsamında üretilecek doku iskelelerinin en az %80 hücre canlılığı sağlanması diğer bir hedef olarak belirlenmiştir.
5. **Antibakteriyel Etki:** Kemik enfeksiyonları kemik nakli ameliyatları için risk oluşturur**.** In vitro denemelerdeki başarılara rağmen, cerrahi işlem sırasında enfeksiyon nedeniyle in vivo deneyler sırasında başarısızlıklar yaşanabilmektedir [122]. Bakteri kolonizasyonu oluşumuna üç boyutlu yapılarda da karşılaşılabilmektedir. Zamanla bakteriler, doku iskelesinin iç kısmına nüfuz etmeye ve orada yerleşmeye başlar. Bu nedenle enfeksiyon riskini azaltabilecek doku iskeleleri geliştirilmektedir [123]. Çalışma kapsamında ÇY ile kaplama yapılarak kemik doku iskelelerine antibakteriyel özellik kazandırılması hedeflenmiştir.

Deneysel çalışmalara ait aşamalar aşağıda sunulmuştur:

1. Ticari hidroksiapatit (THA) biyoseramik tozunun özelliklerinin incelenmesi.
2. THA biyoseramik tozunun stearik asit ile modifikasyonu ve özelliklerinin incelenmesi.

3. Polimerik Sünger (PS) yöntemi kullanılarak ticari hidroksiapatit (THA) biyoseramik tozundan doku iskelesi üretimi ve özelliklerinin incelenmesi.
4. Ticari hidroksiapatit (THA) ve modifiye ticari hidroksiapatit (mTHA) biyoseramik tozları ile HDDA (1,6-Hexanediol diacrylate) ve TEGDMA (Triethylene glycol dimethacrylate) polimerleri kullanılarak 3B SLA basım yöntemiyle doku iskelesi üretimi ve özelliklerinin incelenmesi.
5. PS ve 3B SLA baskı yöntemiyle üretilmiş doku iskelelerinin özelliklerinin değerlendirilmesi ve doku mühendisliği uygulamalarına uygun özellikte (hedefler kısmında sunulan özellikler) doku iskelelerinin belirlenmesi.
6. 5. madde kapsamında özellikleri belirlenmiş doku iskelelerine; hücre canlılığı, hücre yapışması ve antibakteriyel testlerin yapılması ve sonuçların değerlendirilmesi.

5.1 Materyal ve Yöntem

Bu bölüm kapsamında; deneysel çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar ile özellikleri, polimerik sünger yöntemiyle doku iskelesi üretimi, ticari hidroksiapatit biyoseramik tozu ve modifiye edilmiş hidroksiapatit biyoseramik tozlarının özelliklerinin karşılaştırılması, 3B SLA baskı yöntemiyle doku iskelesi üretimi ve antibakteriyel kaplama çalışmaları yer almaktadır.

5.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemelerin isimleri, marka ve saflık değerleri ile kullanım amaçları Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1 Çalışmada kullanılan malzemeler

Malzeme Adı	**Marka**	**Saflık (%)**	**Kullanım Amacı**
Hidroksiapatit	Acros Organic	96	Doku iskelesi Üretimi
1,6-Heksandiol Diakrilat	Sigma Aldrich	90	Doku iskelesi Üretimi
Trietilen Glikol Dimetakrilat	Sigma Aldrich	95	Doku iskelesi Üretimi
Etil (2,4,6-trimetilbenzoil) fenilfosfinat	Rahn	95	Fotobaşlatıcı Doku iskelesi Üretimi
Bis(2,4,6-trimetilbenzoil) Fenilfosfin Oksit	Rahn	98	Fotobaşlatıcı Doku iskelesi Üretimi
Stearik Asit	Acros Organic	97	THA Modifikasyonu
Etanol	Sigma Aldrich	97	Çözücü
Aseton	Sigma Aldrich	97	Çözücü
Isopropil Alkol	Sigma Aldrich	98	Çözücü

Metil Selüloz	Acros Organics	95	Gözenek yapıcı (porojen)
Trietil Fosfat	Sigma Aldrich	99	Bağlayıcı
Çay Ağacı Yağı	Mecitefendi	-	Antibakteriyel ajan

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların adları, marka ve modelleri ile kullanım amaçları Tablo 5.2'de verilmiştir.

Tablo 5.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihaz Adı	**Marka/Model**	**Kullanım Amacı**
Etüv	JP SELECTA/2005141	Kurutma işlemleri
Üç Boyutlu Yazıcı	Anycubic Photon Mono X	Doku iskelesi üretimi
UV Kürleme Cihazı	Anycubic Wash and Cure Plus	Doku iskelelerinin kürlenmesi
Hassas Terazi	AND/GR-200	Kimyasalların tartımı
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph Instruments Mr HeiStandard	Sentez ve karıştırma
Mekanik Karıştırıcı	Isolab	Çözelti karıştırma
Sinter Cihazı	Protherm	Doku iskelelerinin sinterlenmesi
Saf Su Cihazı	Millipore/Direct Q 3 UV	Çözelti hazırlama

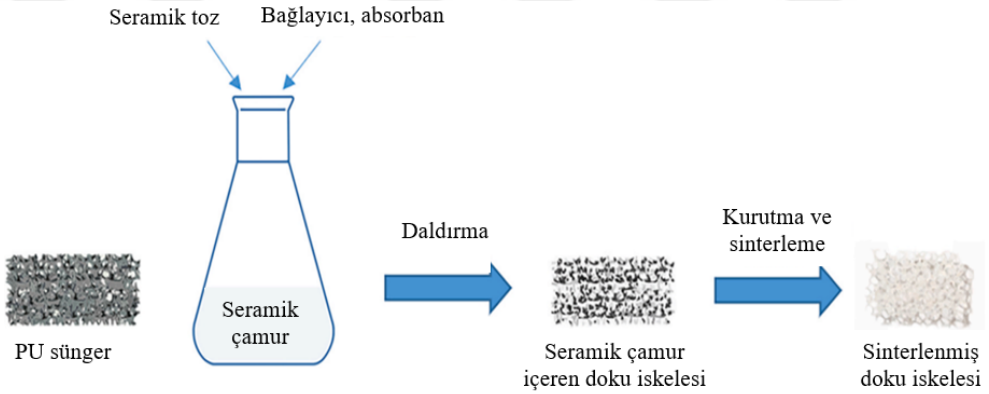
5.1.2 Ticari Hidroksiapatit Biyoseramik Tozunun Özelliklerinin İncelenmesi

Ticari hidroksiapatit (THA) biyoseramik tozu Malvern Panalytical Empyrean XRD cihazı ile analiz edilerek kristal yapısı incelenmiştir. Analiz sırasında tarama aralığı 20-60°, tarama hızı ise 1°/dk olarak seçilmiştir. THA tozlarının ıslanabilirlik özelliklerinin incelenebilmesi temas açısı ölçümü yapılmıştır. Analiz; Biolin Scientific Attension Theta Lite temas açısı ölçüm cihazı ile yapılmış olup, numune yüzeyine çift distile saf su damlatılmıştır. Her ölçümde 5 µg/L damla hacmi sarf edilmiştir ve damlatılma işleminin başlaması ile birlikte 10 saniye boyunca damlacığın açısı kayda alınmıştır. Sonuçlar kayıt altına alınan 10 saniyelik süreçteki tüm temas açılarının ortalaması alınarak belirlenmiştir.

5.1.3 Geleneksel Yöntemle Doku İskelesi Üretimi ve Özelliklerinin İncelenmesi

Polimerik sünger (yönteminde poliüretan (PU) sünger tercih edilmiştir. Yöntemde izlenen adımlar sırasıyla aşağıda sunulmuştur (Şekil 5.1):

1. PU süngerler, boy x en x yükseklik 1x1x1 mm boyutlarında olacak şekilde kesilmiştir.
2. 10 g THA tozu, 0,4 g metil selüloz, 5,75 mL trietil fosfat ve 24 mL saf su, bir gün boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır.
3. Biyoseramik çamur içerisine, PU süngerler ilave edilmiştir. Süngerler karışım içerisinde bir gün boyunca bekletilmiştir (Şekil 5.2).
4. Süngerler çamuru emdikten sonra bir gün boyunca 60°C'lik etüvde kurutulmuş ve ardından sinterlenmiştir. Sinterleme programı 600°C'ye kadar 1°C/dk hızda ısıtma, 600°C'de bir saat bekletme, 1200°C'ye kadar 5°C/dk hızda ısıtma, 1200°C'de 5 saat bekletme olarak ayarlanmıştır [80].



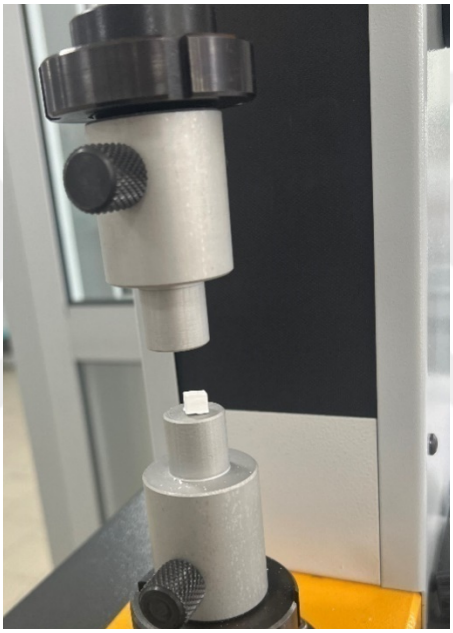
Şekil 5.1 Polimerik sünger yöntemiyle kemik doku iskelesinin üretim adımları



Şekil 5.2 Biyoseramik çamur emdirilmiş PU sünger

Polimerik sünger yöntemi ile üretilen kemik doku iskelelerinin kimyasal, morfolojik ve mekanik özellikleri incelenmiştir. Kimyasal analiz çalışmalarında

XRD yöntemi kullanılmıştır. Tarama aralığı 20-60°, tarama hızı ise 1°/dk olarak seçilmiştir. Morfolojik analizler SEM cihazı ile yapılmıştır. Kemik doku iskelelerinin basma dayanımlarının belirlenmesi için Labotek marka basma test cihazı (Şekil 5.3) kullanılarak mekanik özellikler belirlenmiştir. Basma testinde, polimerik sünger yöntemi ile üretilmiş kemik doku iskeleleri test başlıklarının ortasına yerleştirilmiştir ve cihazın basma hızı 0,5 mm/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Uygulanan yük, testin başlangıcından itibaren numune kırılana kadar kaydedilmiştir. Basma dayanımları MPa cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 5.3 Basma testi

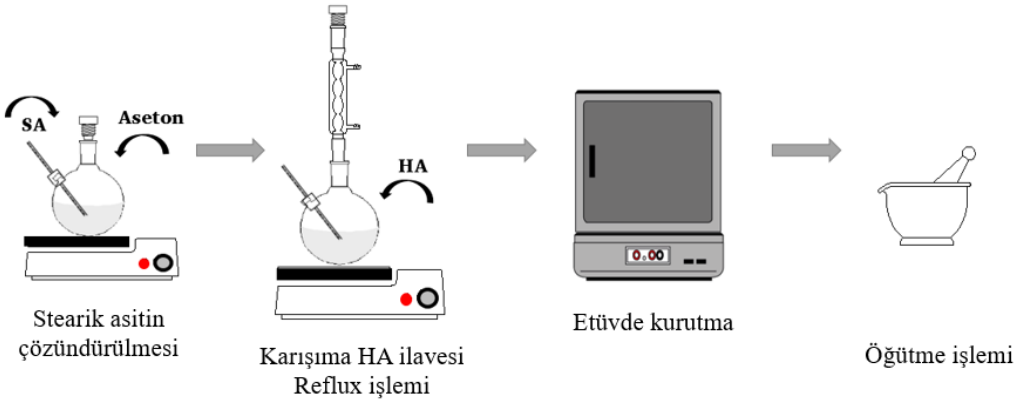
5.1.4 Modern Yöntem (3B SLA Basım Tekniği) ile Doku İskelesi Üretimi

Modern yöntem (3B SLA Basım Tekniği) kullanılarak kemik doku iskelesi üretiminin ilk adımı olarak, biyoseramik çamurda bulunan biyoseramik toz miktarını artırmak amacıyla THA tozları stearik asit ile modifiye edilmiştir. Ardından 3B baskı için gerekli olan model tasarımı ile parametrelerin seçim işlemi yapılmış ve biyoseramik çamur hazırlanmıştır. Hazırlanan biyoseramik çamur, 3B baskı cihazının haznesine doldurulmuş ve baskı işlemi başlatılmıştır. Mekanik, kimyasal ve fiziksel testlerde en iyi sonuç alınan doku iskelesine antibakteriyel kaplama işlemi uygulanmıştır.

5.1.4.1 Modifiye Hidroksiapatit (mTHA) Biyoseramik Tozlarının Üretimi ve Özelliklerinin İncelenmesi

Hidrofilik yapısı nedeniyle hidroksiapatitin polimer matrisler ile oluşturduğu kompozit malzemelerde ara yüzey bağlantıları zayıf olabilmektedir. Bunun nedeni; THA'nın su moleküllerini çekerek arayüzeyde istenmeyen katman oluşturabilmesidir. Bu katman, THA ile polimer matris arasındaki bağları zayıflatarak kompozit malzemenin mekanik dayanımını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu durum, doku iskelesi vücuda yerleştirildiğinde, ara yüzey bağlantısının stres veya fizyolojik sıvılar nedeniyle ayrılmasına yol açabilmektedir. Silan gibi bağlayıcı ajanlar, hidroksiapatitin polimer matris ile uyum sağlaması için sıklıklıkla kullanılmaktadır. Ancak hidroliz sonrası toksik özellik gösterebildiği için hücrenin zarar görmesine neden olabilmektedir [124-125]. Bu sebeple alternatif olarak biyouyumlu olduğu bilinen L-laktik asit oligomeri ve stearik asit gibi ajanlar biyoseramik tozların arayüzey uyumunu arttırmak için tercih edilmektedir. [108-109]. Çalışmada kullanılan fotokürlenebilir reçineler hidrofobik yapıdadır. Hem reçine ile biyoseramik toz arasındaki arayüzey uyumlarını geliştirmek hem de biyoseramik çamur içindeki toz yüklenme oranını arttırmak için ticari hidroksiapatit, stearik asit (SA) ile modifiye edilmiştir. Stearik asit, biyouyumlu doymamış bir yağ asididir [125]. Stearik asit ile gerçekleştirilen biyoseramik toz modifikasyon çalışmasına ait aşamalar aşağıda verilmiştir (Şekil 5.4):

1. Stearik asit (SA), farklı çözücü ve oranlar ile 60℃'de manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür.
2. 3 g ticari hidroksiapatit (THA), stearik asit-çözücü karışımına ilave edilmiştir.
3. Karışım, etüvde 60℃'de 6 saat kurutulmuştur.
4. Kurumuş biyoseramik tozlar, agat havan yardımı ile öğütülmüştür.



Şekil 5.4 Ticari hidroksiapatit (THA) biyoseramik tozunun stearik asit (SA) ile modifikasyon basamakları

THA biyoseramik tozunun modifikasyon çalışmalarında; aseton (A), etanol (E) ve isopraponal (I) çözücüleri kullanılmıştır (Tablo 5.3). Tüm numuneler için THA miktarı 3 gram alınmıştır.

Tablo 5.3 Stearik asit ile hidroksiapatit modifikasyon işleminde THA, SA ve çözücü miktarları

Numune Kodu	**THA Miktarı (g)**	**Stearik Asit Miktarı (% Ağ.)**	**Çözücü Adı**	**Çözücü Miktarı (mL)**
E30THA-1	3	1	Etanol	30
E30THA-2	3	3	Etanol	30
E30THA-3	3	5	Etanol	30
E30THA-4	3	7	Etanol	30
E30THA-5	3	9	Etanol	30
A30THA-1	3	1	Aseton	30
A30THA-2	3	3	Aseton	30
A30THA-3	3	5	Aseton	30
A30THA-4	3	7	Aseton	30
A30THA-5	3	9	Aseton	30
I30THA-1	3	1	Izopropil alkol	30
I30THA-2	3	3	Izopropil alkol	30
I30THA-3	3	5	Izopropil alkol	30
I30THA-4	3	7	Izopropil alkol	30
A100THA	3	5	Aseton	100
E100THA	3	5	Etanol	100

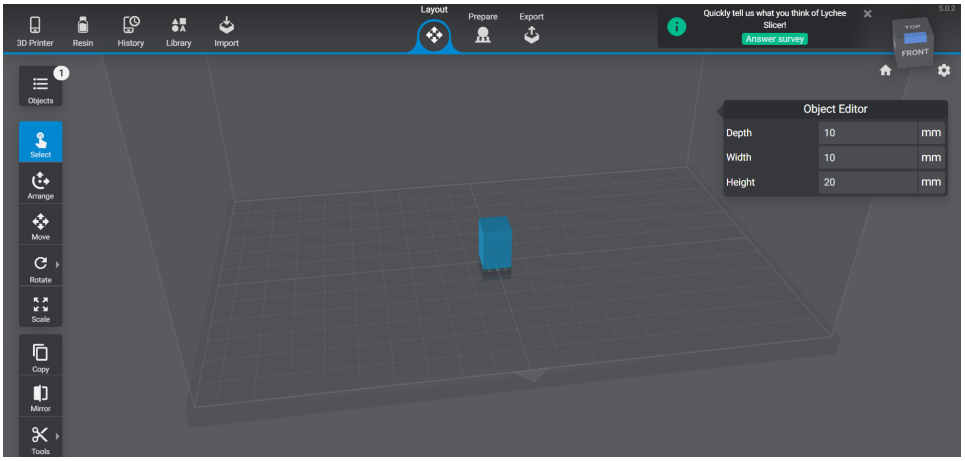
THA: Ticari hidroksiapatit; **E:** Etil alkol; **A:** Aseton; **I:** Izopropil alkol (IPA)

Modifiye edilmiş THA biyoseramik tozları; XRD ve temas açısı analizleri ile incelenmiştir. Temas açısı analizi öncesinde, numunelerin ıslanabilirlik özelliklerini değerlendirmek amacıyla, Tablo 5.3'te listelenen numunelerin

yüzeylerine saf su damlatılarak ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Yüzeyine su damlatılması sonrasında küresel veya küresele yakın damlacık oluşumu gösteren numunelere temas açısı analizi uygulanmıştır. Ölçümler, Biolin Scientific Attension Theta Lite temas açısı ölçüm cihazı ile yapılmış olup, numune yüzeyine çift distile saf su damlatılmıştır. Her ölçümde 5 µL damla hacmi sarf edilmiştir ve damlatılma işleminin başlaması ile 10 saniye boyunca damlacığın açısı kayda alınmıştır. Sonuç değerler kayıt altına alınan 10 saniyelik süreçteki tüm temas açılarının ortalaması alınarak belirlenmiştir. Modifiye edilmiş numunelerin, kimyasal yapılarının incelenmesi ve kristallik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Malvern Panalytical Empyrean cihazı ile XRD analizi yapılmıştır. Tarama aralığı 20-60° ve tarama hızı 1°/dk olarak seçilmiştir.

5.1.4.2 Kemik Doku İskele Yapısının Üç Boyutlu Modellenmesi ve Dilimleme İşlemi

3B baskı için ilk aşama model tasarımıdır. Çalışma kapsamında doku iskeleleri bilgisayar destekli tasarım (Computer Aided Design; CAD) programı kullanılarak modellenmiştir. İlk olarak seçilen reçinenin (HDDA+TEGDMA) basılabilirliğini değerlendirmek amacıyla boy x en x yükseklik değerleri 1x1x1 mm boyutlarında 3B küp modeli oluşturulmuştur. Reçine ile basımının ardından tasarlanan model esas alınarak hazırlanan biyoseramik çamurun basımı gerçekleştirilmiş ve 10x10x20 mm boyutlarında küp modeli tasarlanmıştır. 3B model tasarımını, katman basım süresi ve katman kalınlığı gibi parametrelerin optimizasyonu için kullanılan dilimleme (slicer) aşaması takip etmektedir. Çalışma kapsamında dilimleme programı olarak 3B yazıcının kendi programı olan Anycubic Slicer tercih edilmiştir (Şekil 5.5). Optimum katman basım süresi, fotobaşlatıcılarla deneme yapılarak elde edilmiştir (5.1.4.3)



Şekil 5.5 Slicer programında tasarlanmış olan numnenin görüntüsü

5.1.4.3 Hidroksiapatit Katkılı Reçinelerin Hazırlanması

Çalışmada SLA 3B basım teknolojisi kullanılması nedeniyle düşük viskozite ve yüksek çapraz bağlanma kabiliyetine sahip HDDA (1,6-heksandiol diakrilat) ve TEGDMA (trietilen glikol dimetakrilat) monomerleri seçilmiştir [126-128]. HDDA ve TEGDMA reçinelerinin seçiminde; modifiye edilmiş THA (mTHA) biyoseramik tozunun hidrofobik karakteri ve biyoseramik çamur içerisindeki toz yüklenme oranını artırma potansiyelleri göz önünde bulundurulmuştur [129]. Model oluşturma çalışmalarında HDDA/TEGDMA oranları 1:1, 2.1, 3:1 ve 4:1 (a/a) olacak şekilde kullanılmıştır. Palmese ve ark.'nın yaptığı çalışmada, HDDA'nın, TEGDMA'ya kıyasla 4 kat daha fazla su tuttuğu belirlenmiş ve bu nedenle formülasyonda 4:1 HDDA:TEGDMA oranının kullanıldığı belirtilmiştir [130]. Model oluşturma çalışmalarında dört farklı oranda oluşturulan modeller benzer performans göstermişlerdir. Su tutma kapasitesinin hidrofobik karakter üzerinde etkisi sebebiyle 4:1 HDDA:TEGDMA oranı seçilmiştir.

Fotobaşlatıcı olarak düşük toksisiteye sahip olması ve UV ışık altında kolay kürlenebilmesi nedeniyle TPO-L [Etil (2,4,6-trimetilbenzoil) fenilfosfinat] ve BAPO [Bis(2,4,6-trimetilbenzoil) fenilfosfin oksit] tercih edilmiştir [131]. Yapılan çalışmalarda fotobaşlatıcı kullanım oranları ağırlıkça %0,5-8 değerleri arasında değişmektedir [132-134]. Tez çalışması kapsamında ağırlıkça %0,5-2,5 aralığında fotobaşlatıcı miktarı denenmiştir. Yapının büzülme göstermesi nedeniyle ağırlıkça %2,5 oranından daha yüksek miktarlar kullanılmamıştır.

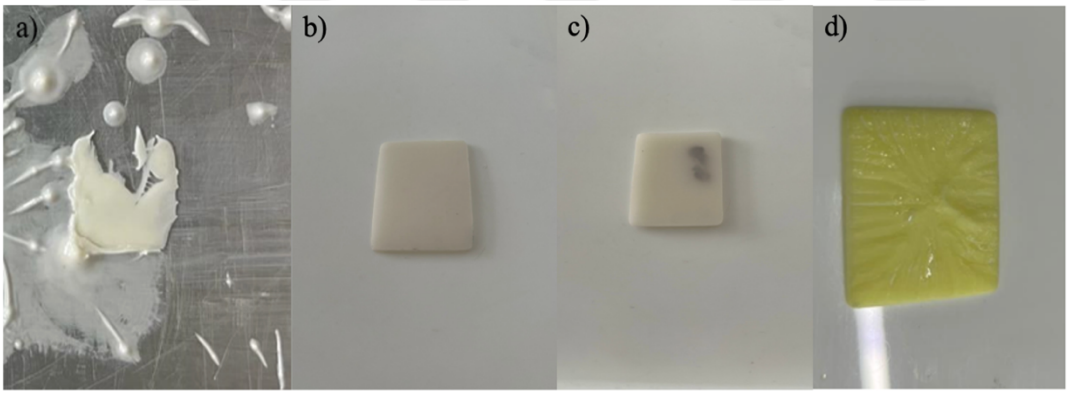
TPO-L ve BAPO, reçinenin ağırlıkça %0.5, %1, %1.5 ve %2.5 oranlarında olacak şekilde eklenmiştir. İki fotobaşlatıcı için de dört farklı oran ile formülasyonlar denenmiş ve sonuçlar Tablo 5.4'te verilmiştir.

Tablo 5.4 Farklı fotobaşlatıcı (BAPO ve TPO-L) miktarlarının 4:1 oranında HDDA/TEGDMA monomer karışımına ilavesinin 3B baskı performansına etkisi

Numune Adı	**HDDA/TEGDMA Oranı**	**Fotobaşlatıcı Oranı (% Ağ.)**	**Sonuç**
HT-F0,5	4:1	0,5	Yapının kürlenmesi için fotobaşlatıcının miktarı yetersiz gelmiştir.
HT-F1	4:1	1	3B baskı alınmıştır.
HT-F1,5	4:1	1,5	3B baskı alınmıştır.
HT-F2,5	4:1	2,5	Aşırı kürlenme malzemede büzülme oluşturmuştur.

HT: HDDA/TEGDMA; **F:** Fotobaşlatıcı; **HT-F:** HDDA/TEGDMA/Fotobaşlatıcı içeren monomer karışımı

Tablo 5.4'te yer alan HT-F0,5, HT-F1, HT-F1,5 ve HT-F2,5 kodlu numunelerin 3B basım performansları Şekil 5.6'da sunulmuştur.



Şekil 5.6 Farklı miktarlarda fotobaşlatıcı kullanılarak 3B basım denemeleri yapılmış biyoseramik çamurların görüntüleri: a) HT-F0,5, b) HT-F1, c) HT-F1,5, d) HT-F2,5

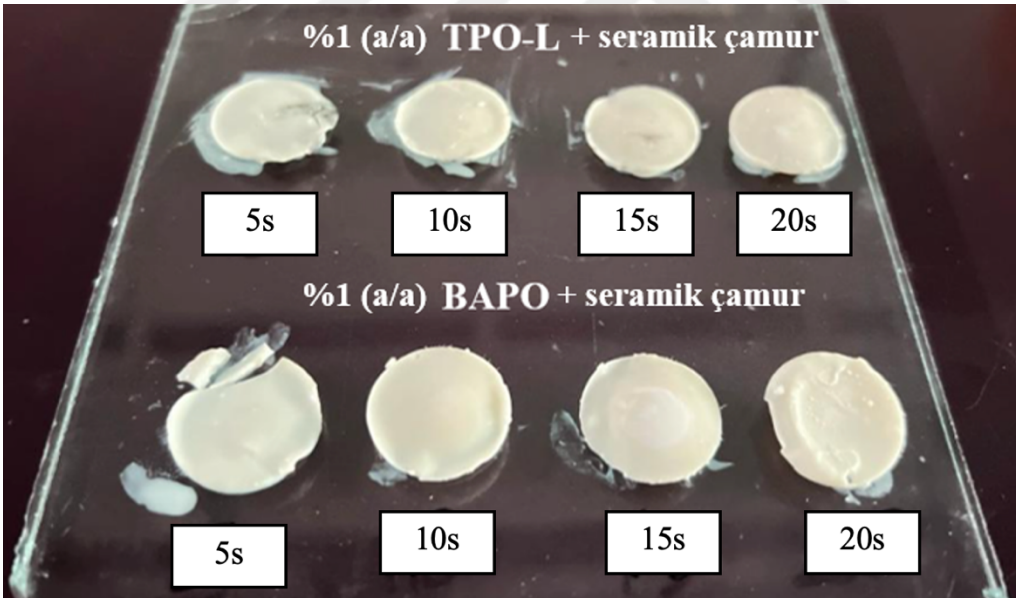
Şekil 5.6-a'da da görüldüğü gibi HT-F0,5 numunesi, yeterli fotobaşlatıcı içermediği için yapının kürlenmesi tamamlanamamıştır. Şekil 5.6-b ve Şekil 5.6-c'de görüntüleri sunulan HT-F1 ve HT-1,5 kodlu numuneler ile 3B model basımında homojen yapı elde edilmiştir. HT-F2,5 kodlu numunede ise fazla miktarda fotobaşlatıcı kullanımı nedeniyle yapıda büzülme meydana gelmiştir (Şekil 5.6-d). Ön denemelerin sonuçları göz önüne alınarak ağırlıkça %1 fotobaşlatıcı içeren reçine formülasyonunun (HT-F1) kullanımına karar verilmiştir. Ön denemeler

sayesinde hem baskı kalitesinin optimize edimesi hem de kimyasal kullanım miktarının azaltılması sağlanmıştır.

5.1.4.3.1 HT-F1 Kodlu Numunenin UV Işık ile Optimum Kürlenme Süresinin Belirlenmesi

UV ışık kullanılarak HT-F1 kodlu numunenin farklı sürelerde (5, 10, 15 ve 20 s) optimum kürlenme etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla; 10 g 4:1 oranında HDDA/TEGDMA monomer karışımları hazırlanmış, ağırlıkça %1 oranında BAPO ve TPO-L fotobaşlatıcıları ayrı ayrı ilave edilmiştir. Fotobaşlatıcı, monomer karışımı içinde çözündürüldükten sonra karışımlara 10 g THA eklenerek Biyoseramik/Polimer karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar; 5, 10, 15 ve 20 s boyunca UV ışık altında kürlenmiştir.

BAPO ve TPO-L fotobaşlatıcılarının Biyoseramik/Polimer karışımı içinde ayrı ayrı kullanıldığı denemelere ait sonuçlar Şekil 5.7'de sunulmuştur.



Şekil 5.7 Ağırlıkça %1 BAPO ve TPO-L fotobaşlatıcıları içeren Biyoseramik/Polimer karışımlarının 5, 10, 15 ve 20 s boyunca UV ışık altında kürlendikten sonraki 3B görüntüleri

Ön denemelere ait değerlendirme sonuçları aşağıda verilmektedir:

1. Ağırlıkça %1 BAPO ve TPO-L fotobaşlatıcıları kullanılan formülasyonlarda kürlenmeyen bölgeler gözlemlendiği için 5 s kürleme süresinin yetersiz olduğu belirlenmiştir.

2. Ağırlıkça %1 BAPO ve TPO-L fotobaşlatıcıları kullanılan formülasyonlarda 10 s kürleme süresinin optimum sonucu verdiği görülmüştür.
3. Ağırlıkça %1 BAPO ve TPO-L fotobaşlatıcıları kullanılan formülasyonlarda 15 s ve 20 s kürleme sürelerinin fazla kürlenme (overcuring) oluşturduğu gözlemlenmiştir.
4. Fotobaşlatıcı olarak BAPO kullanılan numunelerde, yapıda homojen bir kürlenme gerçekleştiği ancak TPO-L içeren numunelerde ise bütünüyle kürlenmiş bir yapı oluşmadığı gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar ve literatür verileri değerlendirildiğinde; BAPO'nun TPO'ya kıyasla UV ışığı absorplama kapasitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu tespitin literatür ile de uyumlu olduğu belirlenmiştir [135]. Bu nedenle çalışmalarda BAPO fotobaşlatıcısı ve 10 s kürleme süresi tercih edilmiştir.

5.4.1.3.2 Ağırlıkça 4:1 Oranında HDDA/TEGDMA Karışımına Eklenebilecek Optimum THA ve mTHA Biyoseramik Miktarının Belirlenmesi

Fotokürlenebilir reçine ve HA biyoseramik tozunun kullanıldığı 3B basım işlemlerinde, ağırlıkça %40-60 arasında HA biyoseramik tozu içeren çalışmalar literatürde yer almaktadır. Belirtilen toz yükleme aralığı, baskı sonrası mekanik özelliklerin optimize edilmesi ve bütünlüğünü koruyan yapı ile hücre canlılığının artırılması açısından tercih edilmektedir. Literatürde, düşük yükleme oranlarının sinterleme süreçlerinde yapıda deformasyon ve çatlak oluşumu gibi sorunlar yarattığı vurgulanmaktadır [136-138]. Biyoseramik toz yükleme oranının artması, mekanik dayanımı arttırsa da; karışımın akış kabiliyetini düşürebilmekte ve baskı sürecini zorlaştırabilmektedir. Bu nedenle, %40-55 aralığı, hem mekanik performansı optimize etmek hem de işlem esnasında uygun viskoziteyi sağlamak açısından büyük öneme sahiptir.

Ağırlıkça 4:1 oranında HDDA/TEGDMA ve %1 BAPO karışımına eklenen THA ve mTHA (modifiye THA) biyoseramik miktarları Tablo 5.5'te verilmiştir. mTHA, stearik asit ile modifiye edilmiş hidroksiapatiti temsil etmektedir.

Tablo 5.5 3B basım yönteminde kullanılan HA biyoseramik toz türü ve oranları

Deneme	**% BAPO (Ağ.)**	**HDDA/TEGDMA Oranı**	**% HA (Ağ.)**	**Toz Türü**
HT-F-H40	1	4:1	40	THA
HT-F-H42	1	4:1	42	THA
HT-F-H45	1	4:1	45	THA
HT-F-mH48	1	4:1	48	mTHA
HT-F-mH50	1	4:1	50	mTHA
HT-F-mH51	1	4:1	51	mTHA
HT-F-mH55	1	4:1	55	mTHA

HT-F: HDDA/TEGDMA/Fotobaşlatıcı karışımından oluşan monomer karışımı; **H:** Ticari Hidroksiapatit-THA; **mH:** Modifiye Ticari Hidroksiapatit-mTHA, **HA:** Hidroksiapatit

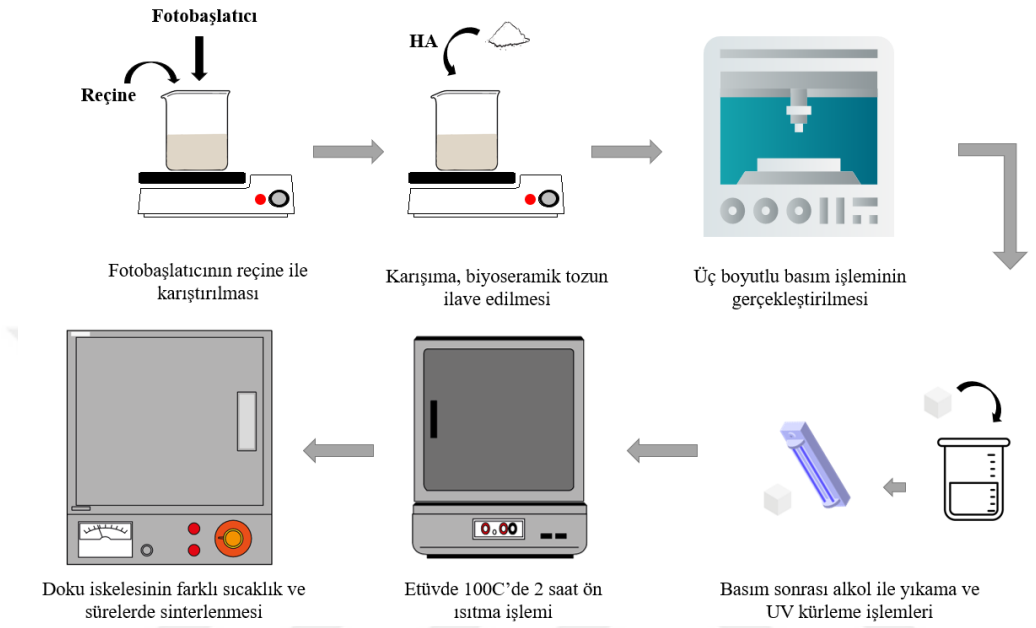
Modifiye THA'nın karışım içerisinde kullanılmasıyla, THA kullanımında maksimum %45 olan toz yükleme oranı %55'e yükselmiştir. Bu artış, hidrofobik karakterdeki reçine karışımının, hidrofilik biyoseramik tozlara kıyasla hidrofobik biyoseramik tozlarla daha iyi bir ara yüzey uyumu sağladığını ve bu nedenle de karışıma daha yüksek miktarda toz ilave edilebilme olanağı sağladığını ortaya koymuştur. Yükleme miktarı ağırlıkça % 50 olan ve akışkan özellik sergileyen HT-F-mH50 biyoseramik/polimer karışımının reolojik özellikleri incelenmiştir. 3B basım için hazırlanmış seramik çamurun reolojik özellikleri, dönmeli bir reometre (RheolabQC, Anton paar) kullanılarak ölçülmüştür. Viskozite değişimi 20°C'de gözlenmiş ve kayma hızı 0,1 s^{-1}'den 100 s^{-1}'e kademeli olarak çıkarılıp azaltılmıştır [139] (Şekil 5.8).



Şekil 5.8 Anton Paar reometre cihazı

5.1.4.4 3B Baskı İşlemi

Fotokürlenebilir seramik çamurun hazırlanması ve üç boyutlu basım işlem adımları Şekil 5.9'da verilmiştir.



Şekil 5.9 Fotokürlenebilir seramik çamurun hazırlanması ve üç boyutlu basım aşamaları

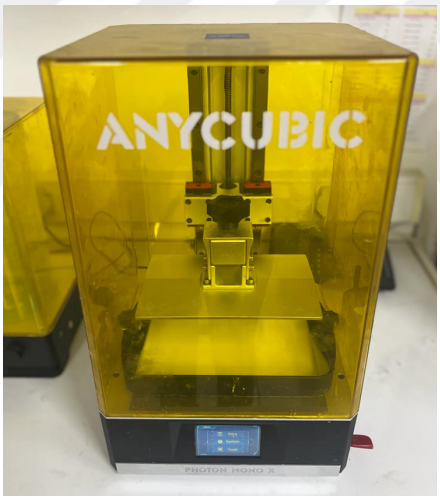
Fotokürlenebilir seramik çamurun hazırlanması ve üç boyutlu basım aşamaları aşağıda verilmektedir:

1. BAPO, 10 g HDDA-TEGDMA karışımına eklenmiş ve 30 dk boyunca ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılmıştır.
2. Karışıma, 10 g modifiye edilmiş THA (mTHA) 5 g olarak iki adımda eklenmiş ve biyoseramik çamur homojen kıvama gelene kadar karıştırma işlemi 250 rpm'de 2 saat boyunca gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.10).



Şekil 5.10 Biyoseramik çamurun hazırlanması

3. Hazırlanan karışım, 3B yazıcı tankına yerleştirilmiş ve basım işlemi başlatılmıştır (Şekil 5.11). 3B basım işlemi için kemik doku iskelelerinin boyutları 10x10x20 mm olarak hazırlanmış olup; katman kalınlığı 50 µm, katman kürleme süresi 10 s ve platform hızı 1.8 mm/s olarak ayarlanmıştır.



Şekil 5.11 Anycubic Mono X 3B SLA Yazıcı

4. 3B basım işlemi başladığında, yapı platformu reçine tankının tabanına doğru yaklaşmıştır. UV ışık reçine yüzeyine gönderilerek dilimleme verilerine göre bir katman sertleştirilmiştir. Katman tamamlandığında, baskı platformu yukarı doğru hareket etmiş ve sertleşen katman tabandan ayrılmıştır. Bu adımlar her yeni katman için tekrarlanarak, parça tamamlanana kadar basım süreci katman katman devam etmiştir.
5. Basım sonrasında doku iskeleleri yapı platformundan çıkarılıp, kürlenmeyen reçineden arındırmak için etanol ile yıkanmış ve 10 s süreyle UV ışık uygulanmıştır.

6. Bitmiş ürün, mekanik açıdan kararlı hale gelmesi ve reçinenin uzaklaştırılması için sinterlenmiştir. Sinter programı; 400°C'ye kadar 1°C/dk hızla ısıtma, 400°C'de bir saat bekletme, 600°C'ye kadar 1°C/dk hızda ısıtma, 600°C'de 1 saat bekletme, 1200°C'ye kadar 5°C/dk hızda ısıtma, 1200°C'de 2 saat bekletme olarak ayarlanmıştır.

5.1.5 Antibakteriyel Kaplama İşlemi

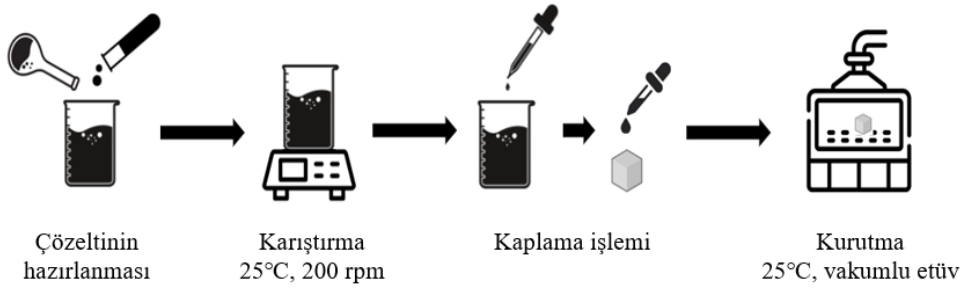
Kaplama işlemi için öncelikle çay ağacı yağı (ÇY) ve etanol kullanılarak 0,0012 ve 0,0024 g/mL konsantrasyonunda iki çözelti hazırlanmıştır (Tablo 5.6).

Tablo 5.6 Kaplama çözeltisindeki çay ağacı yağı (ÇY) konsantrasyonları

Numune Kodu	**Kaplama Konsantrasyonu (g/mL)**
HT-F-mH51-K1	0,0012
HT-F-mH51-K2	0,0024

K1: 0,0012 g/mL konsantrasyonunda çay ağacı yağı (ÇY) içeren kaplama çözeltisi
K2: 0,0024 g/mL konsantrasyonunda çay ağacı yağı (ÇY) içeren kaplama çözeltisi

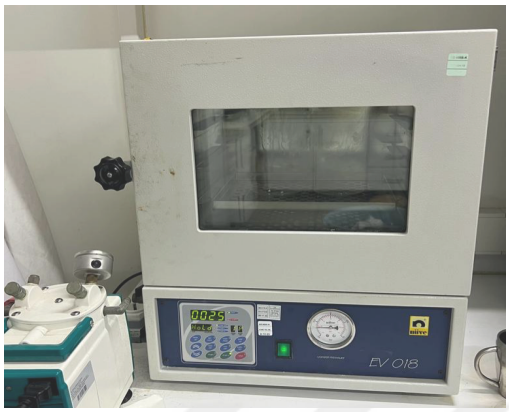
Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında 200 rpm'de 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Ardından 3B basılmış kemik doku iskelelerine 20 µL çay ağacı yağı çözeltisi damlatma yöntemi ile kaplanmıştır [140]. Damlatma işleminde hassas miktar kontrolü amacıyla mikropitet kullanılmıştır. Kaplama işleminin adımları Şekil 5.12'de verilmiştir.



Şekil 5.12 Çay ağacı yağı (ÇY) kaplama işlemininin adımları

ÇY, uçucu bir yağ olduğundan ısıya karşı hassastır. Yüksek sıcaklıklarda yapılan kurutma işlemi, uçucu yağın kimyasal bileşimini bozabileceği için sıcak hava yerine vakum altında kurutma tercih edilmiştir. Vakum altında uygulanan kurutma işlemi ile ortam basıncı düşürülerek ÇY'nin kaynama noktası azaltılmaktadır. Bu

nedenle doku iskeleleri 48 saat boyunca oda sıcaklığında vakumlu etüvde kurutulmuştur (Şekil 5.13).



Şekil 5.13 Çay ağacı yağı (ÇY) ile kaplanmış numunelerin vakumlu etüvde kurutma işlemi

5.1.6 Hücre Deneyleri ve Antibakteriyel Etki Testi

3B SLA baskı yöntemi ile üretilip, ÇY yağı ile antibakteriyel kaplama yapılmış numunelerin hücreler üzerindeki etkileri ve hücrelerin doku iskelelerine tutunabilme yeteneğini belirlemek için hücre testi; kaplamanın antibakteriyel etkisini ölçebilmek için de antibakteriyel test uygulanmıştır.

Hücre ve antibakteriyel etki testleri 4 grup üzerinde yapılmıştır. Hücre testleri için kullanılan gruplar aşağıda tanımlanmıştır:

1. Kontrol numunesi; hücre ve besiyerinden oluşmaktadır.
2. Referans (Ref) olarak adlandırılan numune HT-F-mH51 (3B baskı ile basılmış ve antibakteriyel kaplama yapılmamış numune).
3. 0,0012 g/mL ÇY içeren çözelti ile kaplanmış HT-F-mH51-K1 kodlu numune.
4. 0,0024 g/mL ÇY içeren çözelti ile kaplanmış HT-F-mH51-K2 kodlu numune.

Antibakteriyel testler için kullanılan gruplar aşağıda tanımlanmıştır:

1. Kontrol numuneleri: pozitif kontrol grubunda; besiyeri ve bakteri; negatif kontrol grubu ise sadece bakteri bulunmaktadır.
2. Referans (Ref) numune HT-F-mH51 (3B baskı ile basılmış ve antibakteriyel kaplama yapılmamış numune).
3. 0,0012 g/mL ÇY içeren çözelti ile kaplanmış HT-F-mH51-K1 kodlu numune.
4. 0,0024 g/mL ÇY içeren çözelti ile kaplanmış HT-F-mH51-K2 kodlu numune.

5.1.6.1 Biyouyumluluk analizi

Ref, HT-F-mH51-K1ve HT-F-mH51-K2 numunelerinin biyouyumluluk analizi ISO 10993-12 standardında yer alan indirekt (ekstrakt) yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir [141]. Numuneler UV ışını ile sterilize edildikten sonra hücre büyüme ortamında 130 rpm ve 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda 72 saat boyunca tutulmuştur. Bu süre sonunda ekstrakt ortamları alınarak biyouyumluluk analizi için +4°C'de saklanmıştır.

Biyouyumluluk analizinde L929 fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, %1 penisilin-streptemisin ve %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum-FBS) ilave edilen DMEM/F12 büyüme ortamında çoğaltılıp, inkübasyon şartları olarak %95 nem, %5 CO_2 ve 37°C'ye ayarlanmış inkübatör kullanılmıştır. Hücreler 75T flask yüzeyinde %70-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra Tripsin-EDTA kullanılarak pasajlanmıştır. Hücrelerin Thoma lamında sayımları yapıldıktan sonra besiyeri ile süspanse edilerek 96 kuyulu plakalara ekimleri gerçekleştirilmiş ve plakalar 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kontrol grubu taze besiyeri ile değiştirilirken deney grupları ekstrakt ortamları ile değiştirilmiştir. Her grup için üç tekrarlı çalışılıp, plakalar 24 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürelerin sonundaki hücre canlılığı MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [142]. MTT yönteminde MTT solüsyonunda bulunan sarı renkli tetrazolyum tuzu, canlı hücrelerin mitokondriyal enzimleri tarafından mor renkli formazana indirgenmekte ve plakalardaki kuyularda bulunan formazan yoğunluğu da hücre canlılığı hakkında bilgi vermektedir [143]. Bu yöntem için kuyulara 10 uL MTT solüsyonu eklenerek karanlık ortamda 4 saat inkübatörde tutulmuş, daha sonra kuyularda oluşan formazan kristallerini çözündürmek için her kuyuya 100 uL DMSO eklenmiş ve plakalar karanlık ortamda 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Kuyulardaki formazan yoğunluğu 570 nm'ye ayarlanmış mikroplakada ölçülmüş ve elde edilen absorbans veriler ile %hücre canlılığı hesaplanmıştır.

5.1.6.2 Hücre Adezyon Testi

Hücrelerin numunelerle etkileşimi ve adezyonunu analiz etmek için 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyama yöntemi kullanılmıştır [144]. Bu işlem için numuneler 48 kuyulu plakalara aktarılıp, büyüme ortamında 2-3 saat bekletilmiş ve daha sonra

her bir numune üzerine $20x10^3$ sayıda hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ardından plakalar 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra DAPI boyama için hücreler önce iki kez fosfat tamponlu tuzlu su (Phosphate Buffer Saline-PBS) ile yıkanıp metanol ile fikse edilmiştir. Fikse olan hücreler PBS ile iki kez yıkandıktan sonra DAPI boya solüsyonu (1 ug/mL) içinde 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu işlem sonrası boya ortamı aspire edilip, PBS ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Numune yüzeyine tutunan hücreleri görüntülemek için floresan mikroskop kullanılmıştır.

5.1.6.3 Antibakteriyel Analiz

Antibakteriyel analiz; bakteri kültürü ve antibakteriyel aktivitenin incelenmesi aşamalarını içermektedir.

Bakteri kültürü

Antibakteriyel çalışmalar için *S. aureus* hücre hattı (ATCC 25923) kullanılmıştır. Bakterinin kültürü L. Bertani Broth içerisinde yapılıp, bakteri sayımı spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm alınırken sıvı besiyerinden 20 µL alınarak örnek üzerine 980 mL sıvı besiyeri ilave edilmiş ve bu işlem sonrası UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. 1 OD (Optic Density) değeri $1x10^9$ bakteri sayısına karşılık gelmektedir. Eşitlik (5.1) kullanılarak bakteri sayımı gerçekleştirilmiş ve 1 mL hacimdeki koloni sayısı (kob/mL) hesplanmıştır.

$$\text{Bakteri Sayısı (kob/mL)} = 1x10^9 \text{ X Absorbans Değeri / 0,02}$$

Antibakteriyel Aktivitenin İncelenmesi

S. aureus hücre hattı (ATCC 25923), numunelerin antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirmesi için kullanılmıştır [145]. Antibakteriyel çalışmalar öncesi sterilizasyon işlemi için numuneler UV ışını ile 45 dakika muamele edilmiş ve ardından 48 kuyulu plakaya aktarılmıştır. Numune içeren L. Bertani besiyerine 10^7 CFU/mL yoğunlukta olacak şekilde bakteri ekimi gerçekleştirilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda numunelerin antibakteriyel aktivitesini belirlemek amacıyla 600 nm'de absorbans ölçümü yapılmış ve kontrol gruplarına bağlı olarak bakteri canlılık yüzdeleri belirlenmiştir.

6

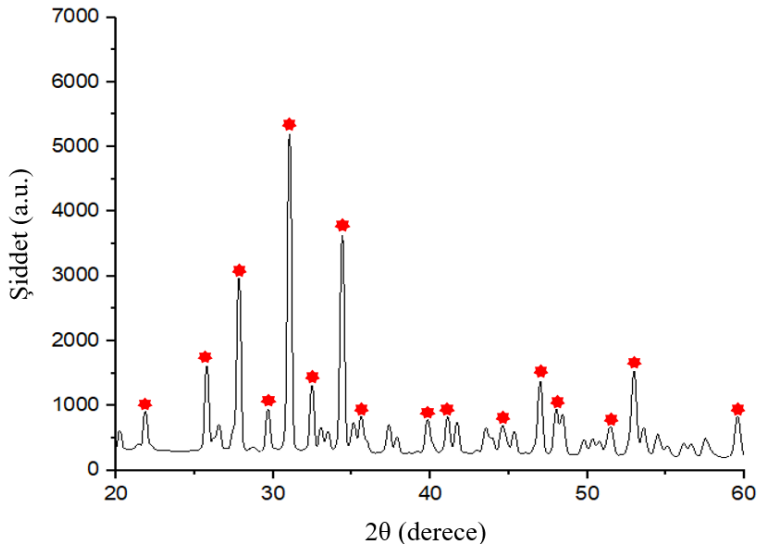
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

6.1 Ticari Hidroksiapatit (THA) Biyoseramik Tozunun Özelliklerinin İncelenmesi

Ticari hidroksiapatit (THA) biyoseramik tozunun kristal yapısı XRD yöntemi, yüzey özellikleri ise temas açısı ölçümü kullanılarak belirlenmiştir.

6.1.1 Ticari Hidroksiapatit (THA) Biyoseramik Tozunun Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

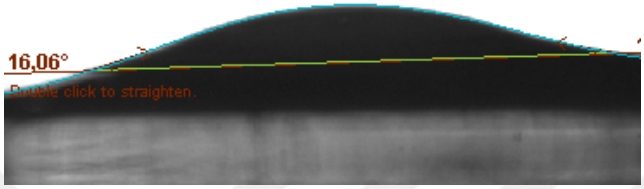
THA biyoseramik tozunun XRD spektrumu Şekil 6.1'de verilmiştir.



Şekil 6.1 THA biyoseramik tozunun XRD Spektrumu

Spektrumda, THA'nın karakteristik 2θ açıları olan; 22.3°,25.9°, 28.2°, 32°, 34.2°, 35.5°, 39.8°, 46.6°, 48.5° ve 54.4° değerleri görülmektedir. Spektrumdaki piklerin keskin olduğu ve numunenin yüksek derecede kristallik gösterdiği tespit edilmiştir. XRD spektrumundaki bu değerlerin literatürdeki verilerle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir [129]. XRD analizi sonucu, yapının saflık seviyesinin %95 olduğunu göstermiştir. Bu değer, numunenin içeriğinde minimal seviyede yabancı fazlar bulunduğunu ve yapının büyük oranda homojen olduğunu göstermektedir. THA'nın bu saflık seviyesi, malzemenin biyouyumluluğunu artırarak, özellikle kemik implantları ve doku mühendisliği gibi alanlarda tercih edilmektedir.

Şekil 6.2’de THA biyoseramik tozuna ait temas açısı görseli verilmiştir.



Şekil 6.2 THA biyoseramik tozunun temas açısı ölçümüne ait görsel

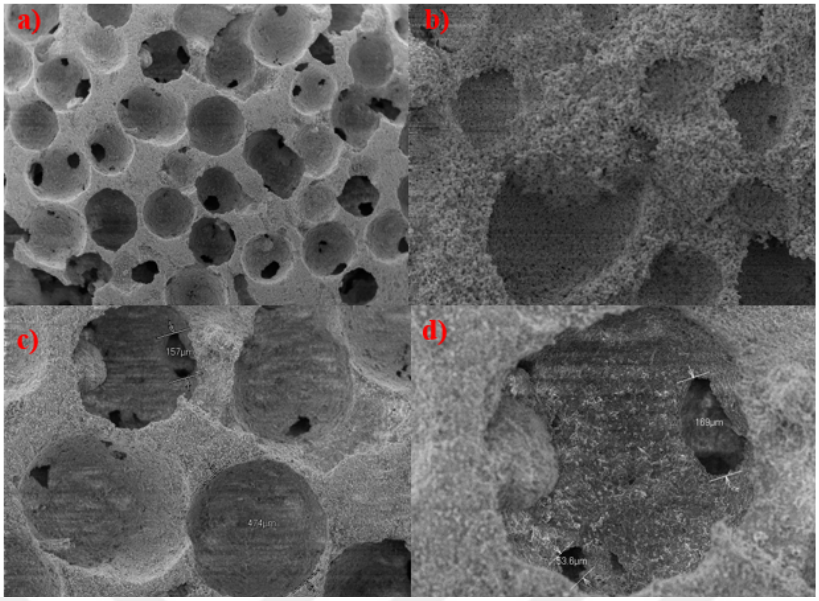
THA'nın yapısında bulunan hidroksil (OH) gruplarının su ile güçlü etkileşime girebilme yeteneği, malzemenin hidrofilik karakterde olmasına neden olmaktadır. Bu durum, yüzeyde su damlacıklarının yayılmasına ve temas açısının düşmesine yol açmaktadır. Temas açısı ölçümünden elde edilen 16° değeri, malzemenin yüzeyinin suyla iyi bir uyum sağladığını ve oldukça hidrofilik bir yapı sergilediğini ortaya koymaktadır. 90°’nin altında temas açısına sahip olan yüzeyler hidrofilik olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle 16° temas açısı gösteren THA biyoseramik yapısı hidrofilik özelliğe sahiptir (Şekil 6.2).

6.2 Polimerik Sünger (PS) Yöntemi ile Üretilmiş Kemik Doku İskelelerine Ait Deneysel Sonuçlar ve Tartışma

Polimerik sünger yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin kristal yapısı XRD analizi, morfolojik yapısı ise SEM analizi ile incelenmiştir.

6.2.1 Polimerik Sünger Yöntemi ile Üretilmiş Kemik Doku İskelelerinin Morfolojik Özellikleri

Polimerik sünger (PS) yöntemi ile üretilmiş kemik doku iskelelerinin morfolojik yapısı; 50X, 100X, 120X ve 250X büyütmelerde SEM analizi ile incelenmiştir. PS yöntemi ile üretilen kemik doku iskelelerine ait olan farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 6.3’te sunulmuştur.

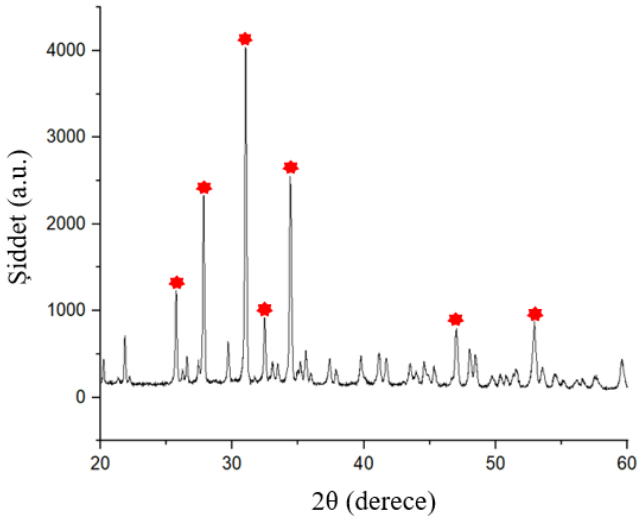


Şekil 6.3 PS yöntem ile üretilmiş kemik doku iskelesine ait farklı büyütmelerde SEM görüntüleri: a) 50X, b) 100X, c) 120X ve d) 250X

50X büyütme kullanılarak alınan SEM görüntüsünde (Şekil 6.3-a), gözeneklerin birbirine yakın boyutlarda olduğu görülmektedir. Ayrıca büyük boyutlu gözenekler içinde daha küçük gözeneklerin yer aldığı, kapalı ve açık gözeneklerin bulunduğu gözlenmektedir. Şekil 6.3-b'de 100X büyütmede alınmış olan SEM görüntüsünde, kapalı gözeneklerin oranının daha fazla olduğu görülmekte olup, bağlantı bölgeleri ise aglomere düzensiz yapılar içermektedir. 120X büyütmede yapılan ve Şekil 6.3-c'de sunulan SEM görüntüsünde, gözeneklerin birbirine daha yakın boyutlarda olduğu ve bağlantı bölgelerinin daha düzgün oluştuğu görülmektedir. 250X büyütmeye ait Şekil 6.3-d'de sunulan SEM görüntüsünde ise, düzenli yapı gösteren büyük boyutlu gözeneğin içinde daha küçük boyutlu gözenek bölgeleri yer almaktadır. 250X büyütmedeki SEM görüntüsünde 157 µm boyutundaki küçük gözenekler, hücre bağlanmasını ve besin difüzyonunu kolaylaştırabilirken; 120X büyütmedeki SEM görüntüsünde ise 474 µm boyutundaki büyük gözenekler, vaskülarizasyon ve yeni kemik dokusu oluşumunu desteklemektedir [146]. SEM görüntülerine göre yapıda; yaygın olarak kapalı gözenekler bulunurken, birbiri ile bağlantılı olan açık gözenekler de yer almaktadır. Gözenekler arasındaki düzensizlik ve kapalı gözenekler, hücre infiltrasyonu ve vaskülarizasyonu için sorun teşkil edebilmektedir.

6.2.2 Polimerik Sünger (PS) Yöntemi ile Üretilmiş Kemik Doku İskelelerinin Kimyasal Özellikleri

Polimerik sünger yönteminde kullanılan THA esaslı biyoseramik tozu, metil selüloz ve trietil fosfat bileşenlerini de içermektedir. Sinterleme işlemi sonrasında doku iskelesinin organik yapısının yanarak uzaklaşması, malzemenin saflığını artırmakta ve gözenekli bir yapı oluşturmaktadır. Bu süreç, malzemenin ana bileşeni olan THA biyoseramik tozunun yüksek derecede kristalize olmasına da katkıda bulunmaktadır. Kristal yapıyı inceleyebilmek için polimerik sünger yöntemi ile üretilmiş olan kemik doku iskelesinin XRD analizi yapılmış ve elde edilen spektrum Şekil 6.4'te verilmiştir. XRD spektrumuna göre; THA karakteristik 2θ pikleri 22.9°, 25.9°, 28.2°, 31.8°, 32.9°, 34.2°, 35.5°, 39.8°, 46.7° ve 49.5°, 53.2°, 54.4° değerlerinde görülmüştür. Bu sonuçlar, THA'nın kristalin yapısını doğrulamaktadır [147]. Polimerik sünger yöntemi ile üretilmiş THA esaslı kemik doku iskelesi ve THA biyoseramik tozunun XRD spektrumları karşılaştırıldığında yüksek kristallik düzeyine ulaşıldığı gözlenmiştir. Sinterleme işlemi sonrası, piklerde belirgin bir değişiklik tespit edilmemiştir.



Şekil 6.4 PS yöntemi ile üretilmiş kemik doku iskelesine ait XRD spekturumu

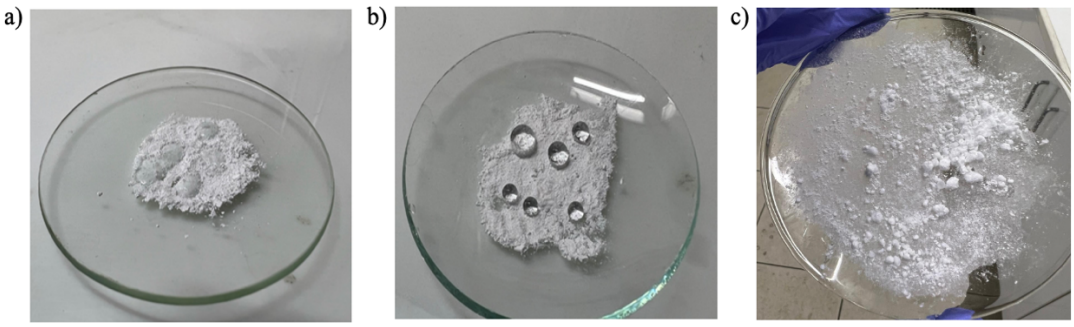
6.3 Modern Yöntem (3B SLA Baskı) ile Üretilmiş Kemik Doku İskelelerine Ait Deneysel Sonuçlar ve Tartışma

3B SLA baskı yöntemi için kullanılan seramik çamura daha fazla biyoseramik toz yüklenebilmesi amacıyla THA biyoseramik tozlarına stearik asit (Stearic Acid-SA)

ile kimyasal modifikasyon işlemi uygulanmıştır. Modifiye edilmiş THA (mTHA) biyoseramik tozları kullanılarak hazırlanan biyoseramik çamur ile 3B yazıcıda kemik doku iskelesi üretilmiş ve ardından sinterleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sinterlenmiş numunelerin kimyasal, mekanik ve morfolojik özellikleri; temas açısı ölçüm, XRD, reometre, basma testi ve SEM cihazları kullanılarak incelenmiştir.

6.3.1 Modifiye Ticari Hidroksiapatiti (mTHA) Biyoseramik Tozlarının Üretimi ve Özelliklerinin İncelenmesi

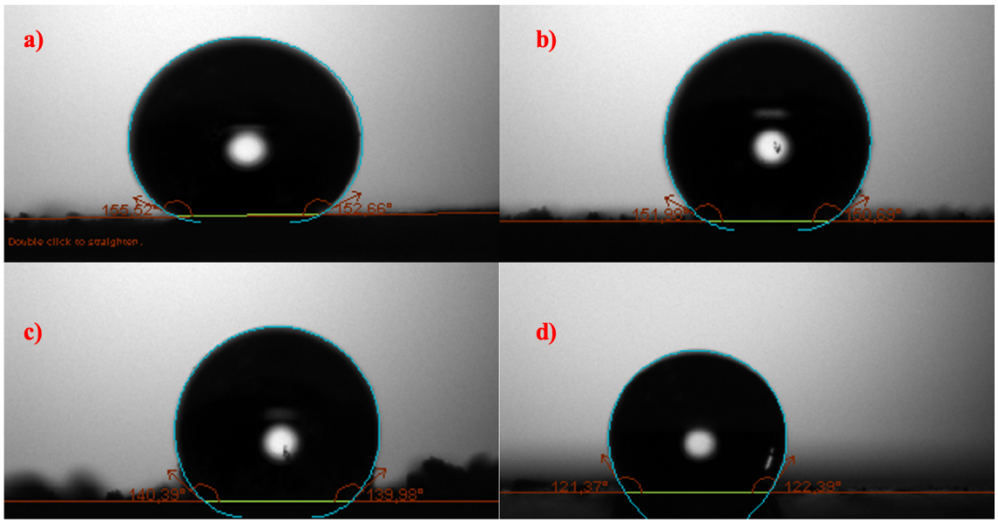
THA biyoseramik tozunun SA ile modifikasyon işlemi sırasında etanol, aseton ve izopropanol gibi farklı çözücüler kullanılmıştır. Uygun çözücüyü belirlemek amacıyla numunelere ıslanabilirlik ön denemeleri (Şekil 6.5) yapılmış ve ardından temas açısı analizleri (Şekil 6.6) gerçekleştirilmiştir. THA seramik tozları, yapısındaki hidroksil (OH) grupları ve yüksek yüzey enerjisi nedeniyle hidrofilik karaktere sahiptir. SA, 18 karbon atomundan oluşan uzun zincir yapısı sayesinde hidrofobik özellik gösterir. Reaksiyon sırasında, SA'da bulunan karboksil grubu ile THA üzerindeki OH grubu arasında esterleşme reaksiyonu gerçekleşir ve SA moleküllerinin uzun hidrofobik kuyrukları yüzeyden uzaklaşarak THA seramik partiküllerinin etrafında hidrofobik bir tabaka oluşturur. [148].



Şekil 6.5 Islanabilirlik ön denemelerine ait görüntüler: a) %1 SA (E30THA-1), b) %5 SA (A30THA-3), c) %7 SA (A30THA-4)

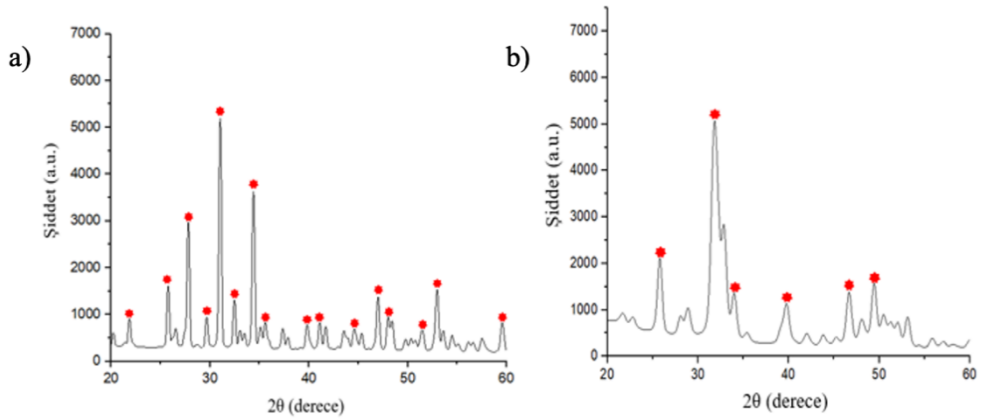
Deneme çalışmalarında, sadece THA ve ağırlıkça %1-9 arasında stearik asit içeren numuneler kullanılmıştır. Islanabilirlik denemelerinde, ağırlıkça %1, %7 ve %9 SA içeren numunelerde beklenen hidrofobik performans elde edilememiştir. Ancak ağırlıkça %3 ve 5 SA içeren numuneler hidrofobik özellik göstermiştir.

Stearik asit ve farklı çözücüler (aseton, etanol, izopropil alkol) kullanılarak modifiye edilmiş ticari hidroksiapatit (mTHA) tozlarının temas açısı analizi Şekil 6.6'da verilmiştir. En iyi sonuçlar, aseton (A) ve izopropanol (I) kullanılarak üretilen numunelerden elde edilmiştir. A30THA-3, I30THA-3, A30THA-2 ve A3 E30THA-3 numunelerinin temas açıları sırasıyla 155°, 151°, 140° ve 122° olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, stearik asit ile modifiye edilmiş THA tozunun hidrofobik özellik kazandığını göstermektedir. Bu numuneler arasından en yüksek temas açısı değeri (155°) gösteren A30THA-3 seçilmiştir.



Şekil 6.6 Temas açısı analizine ait görüntüler: a) A30THA-3 (155°), b) I30THA-3 (151°), c) A30THA-2 (140°) ve d) E30THA-3 (121°)

THA ve mTHA numunelerine ait XRD grafikleri Şekil 6.7'de sunulmuştur. A30THA-3 numunesine ait spektrum, THA spektrumu ile karşılaştırıldığında bazı piklerin kaybolmuş ve bazı piklerin ise keskinliklerinin azalmış olduğu gözlenmektedir. Bu değişimin, amorf yapıya sahip stearik asit ile yapılan modifikasyon işlemi nedeniyle oluştuğu yorumu yapılmıştır. THA, yüksek kristal yapıya sahip bir malzeme olsa da; stearik asit ile yapılan kimyasal modifikasyon işleminden sonra kristalin yapıda değişiklikler oluşmuştur.

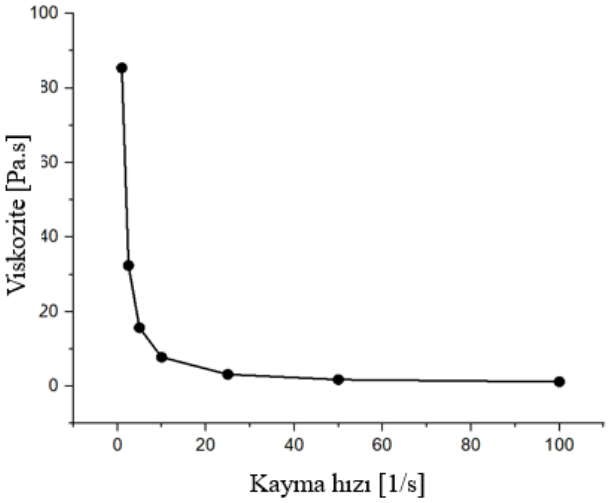


Şekil 6.7 a) THA ve b) A30THA-3 numunelerinin XRD spektrumları

25.9°, 28.2°, 32°, 34.2°, 35.5°, 39.8°, 46.6°, 48.5° ve 54.4° 2θ değerine karşılık gelen pikler, THA'nın karakteristik pikleridir. 25.9°, 32° ve 34.2° 2θ tepe noktaları THA'nın tipik olarak keskin ve güçlü pikleridir [149][147].

6.3.2 Biyoseramik Çamurun Kimyasal Özellikleri

Ağırlıkça %40-55 oranlarında biyoseramik toz içeren numuneler, reoloji analizi öncesinde kıvam ve akışkanlık açısından görsel olarak değerlendirilmiştir. Ağırlıkça %55 THA biyoseramik tozu içeren seramik çamurun (HT-F-mH55) daha viskoz, %40-45 arasında THA tozu içeren numunelerin (HT-F-H40, HT-F-H42, HT-F-H45) ise daha akışkan olduğu gözlemlenmiştir. Viskoz biyoseramik çamur, 3B basım sırasında istenilen baskı kalitesini sağlayamamaktadır. Akışkan olan biyoseramik çamur numunelerinde ise, daha az miktarda mTHA bulunduğu için yapının mekanik dayanımını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, reoloji analizinde ağırlıkça **%51** hidroksiapatit içeren **HT-F-mH51** biyoseramik/polimer karışımı kullanılmıştır. Viskozite ölçümlerinde, kayma hızının artmasıyla birlikte biyoseramik çamurun viskozitesinde başlangıçta belirgin bir düşüş gözlenmiş (<10 s^{-1}), ardından bu düşüş yavaşlayarak devam etmiştir (Şekil 6.8) [150].



Şekil 6.8 Ağ. %51 hidroksiapatit içeren HT-F-mH51 biyoseramik/polimer karışımının viskozite-kayma hızı değişimi

Viskozite ölçüm sonuçları; yüksek kayma hızlarında viskozitede önemli ölçüde azalma eğilimi oluştuğunu göstermiştir. Bu durum, malzemenin hızlı harekete maruz kaldığında veya yüksek stres altında daha akıcı hale geldiğini göstermektedir. Kayma hızının artmasıyla viskozite değeri azalma gösterdiği için hazırlanan biyoseramik çamur "**psödoplastik akış**" sergilemiştir. Böylece, seramik çamur hem çökmeye karşı direnç göstererek stabil kalabilmekte hem de kuvvet altında akarak düzgün yüzeylerin oluşumunu sağlayabilmektedir.

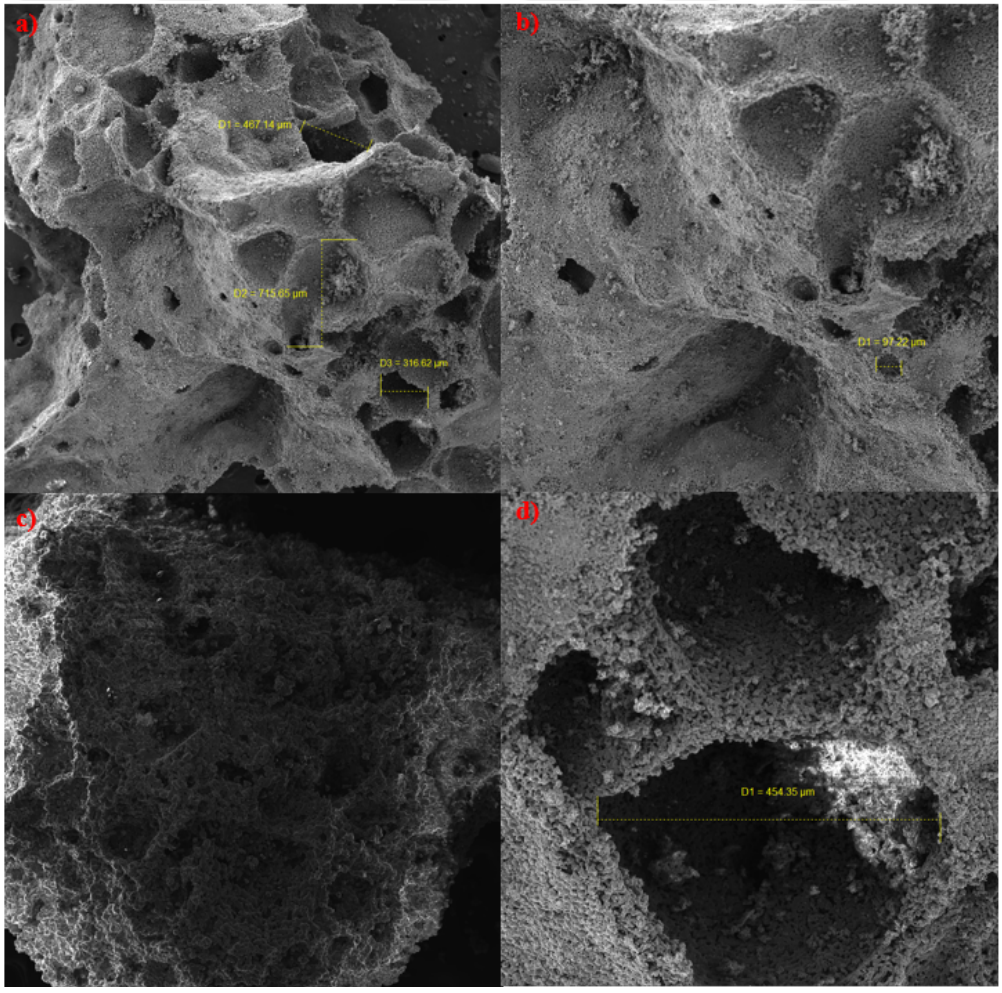
6.3.3 Üç Boyutlu Basılmış Kemik Doku İskelelerinin Özellikleri

3B basılmış kemik doku iskelelerinin kimyasal, morfolojik, mekanik ve biyolojik özellikleri XRD, SEM-EDX, basma testi, in-vitro ve antibakteriyel testler yardımıyla incelenmiştir.

6.3.3.1 Üç Boyutlu Basılmış Kemik Doku İskelelerinin Morfolojik Özellikleri

3B basılmış kemik doku iskelelerinin morfolojik özelliklerini incelemek için SEM analizi yapılmıştır. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında üretilen doku iskelelerinin yapısında 20-1500 µm arasında değişen gözenekler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda; ~300 µm'den büyük gözeneklerin, vaskülarizasyon ve kemik büyümesi için gerekli olduğu; ~300 µm'den küçük gözeneklerin ise osteokondral ossifikasyonu teşvik edebileceği belirtilmiştir [1-2].

3B SLA baskı yöntemi ile üretilmiş HT-F-mH51 numunesine ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri (Şekil 6.9); yapıda hem makro hem mikroboyutta gözeneklerin bulunduğunu göstermiştir. SEM analizi 62X, 108X, 124X ve 315X büyütmeler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapıdaki gözenek büyüklüklerinin 97 µm-715 µm arasında değiştiği görülmüştür. 62X büyütme ile görüntüsü alınmış olan yapıya ait gözeneklerin homojen bir şekilde dağıldığı ve incelenen bölgede çatlak bulunmadığı gözlemlenmiştir. 62X büyütme ile çekilmiş SEM görüntüsü (Şekil 6.9-a), 316-715 mikron aralığında bulunan farklı boyutlardaki gözeneklerin varlığını göstermektedir. Şekil 6.9-b, Şekil 6.9-c ve Şekil 6.9-d görüntüleri sırasıyla; 108X, 124X ve 315X büyütmelerde alınmış olan görüntülerdir.



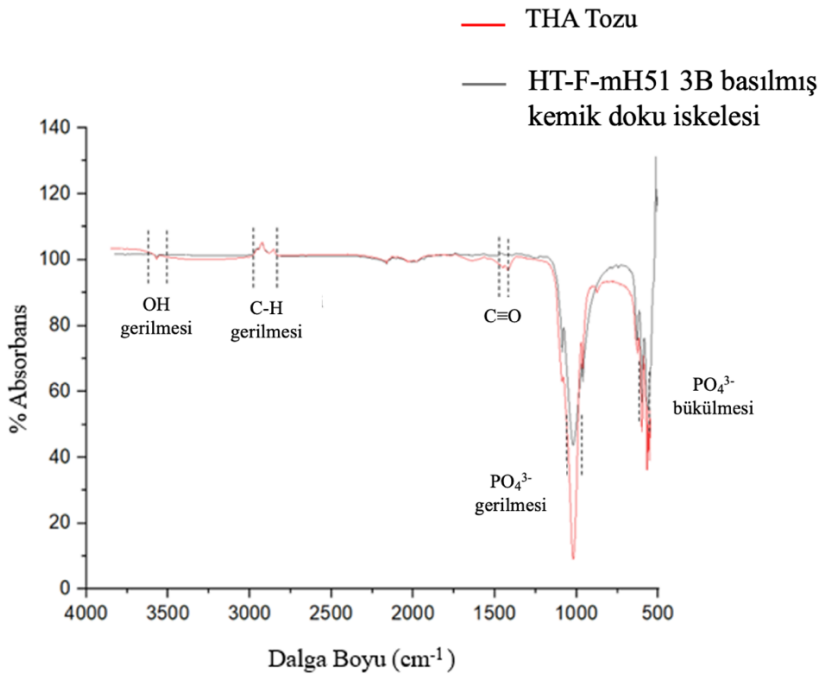
Şekil 6.9 3B SLA baskı yöntemi ile üretilmiş HT-F-mH51 numunesine ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: a) 62X, b) 108X, c) 124X ve d) 315X

SEM görüntülerine göre; HT-F-mH51 numunesinin yapısında gözeneklerin çoğunun birbiri ile bağlantılı olduğu gözlemlenmiştir. Bağlantılı gözenek yapısı, hücrelerin beslenmesi ve atıkların uzaklaştırılması için önemlidir. Doku iskelesinde açık gözeneklerin varlığı; hücrelerin tutunma, beslenme ve atık uzaklaştırma gibi çeşitli faaliyetlerini etkileyebilmektedir. Ayrıca malzemeye daha iyi mekanik özellikler kazandırabilmekte ve biyolojik sıvıların geçişini kolaylaştırarak daha iyi biyouyumluluk sağlayabilmektedir. Doku iskelesinde bulunan çoklu gözenek boyutları, gaz veya sıvı akışkanlar için farklı geçirgenlik seviyeleri sağlayabileceğini göstermektedir.

6.3.3.2 Üç Boyutlu Basılmış Kemik Doku İskelelerinin Kimyasal Özellikleri

3B basılmış kemik doku iskelelerinin kimyasal yapılarını detaylı olarak incelemek için FTIR ve XRD analizleri, morfolojik ve elementel bileşimlerini belirlemek için ise SEM/EDX analizleri yapılmıştır.

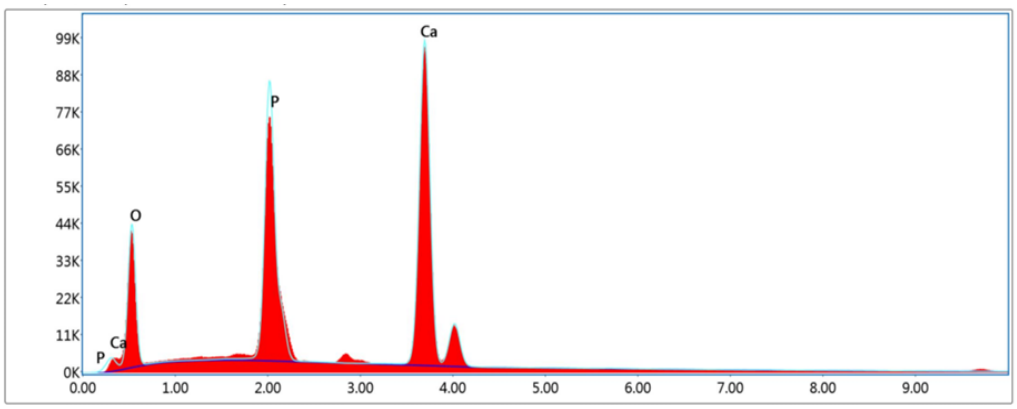
Şekil 6.10'da sunulan FTIR analizinde; THA biyoseramik tozu ve HT-F-mH51 3B basılmış kemik doku iskelesine ait FTIR spektrumları karşılaştırılmıştır.



Şekil 6.10 THA tozu ve HT-F-mH51 numunesi ile 3B basılmış kemik doku iskelesine ait FTIR spektrumu

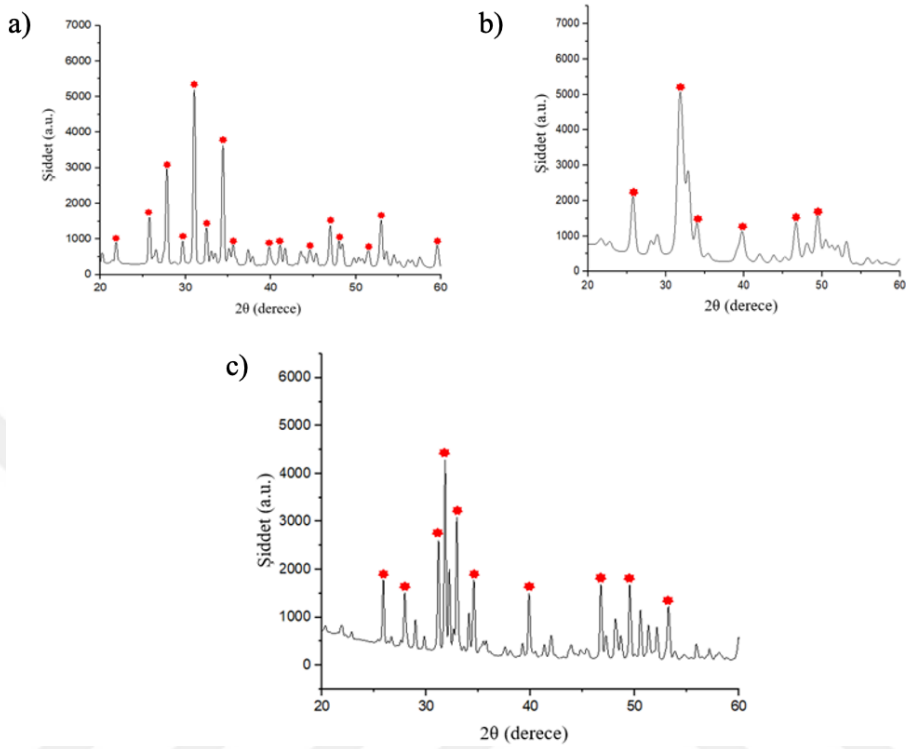
Her iki FTIR spektrumunda da 3568 cm^{-1} değerinde OH gerilmesi, 2862 cm^{-1} ve 2941 cm^{-1} değerlerinde C-H gerilmesi, 1086 cm^{-1}, 1019 cm^{-1} ve 600 cm^{-1}'değerlerinde fosfat gruplarını temsil eden pikler bulunmaktadır. Yapıların spektrumları kimyasal olarak benzediklerini göstermektedir. Bunun nedeni, 3B baskı yönteminden sonra uygulanan sinterleme işlemidir. Sinterleme işlemi, hem kemik doku iskele yapısında bulunan organik bileşenlerin (reçine ve fotobaşlatıcı) yüksek sıcaklık etkisiyle buharlaşarak yapıdan çıkmasını hem de seramik partiküllerin birbirleriyle etkileşiminin artması sonucunda malzemenin mekanik dayanımı iyileştirmektedir. Böylece malzeme içerisinde daha sağlam ve kararlı bir yapı oluştmaktadır.

Sinterleme işlemi sonrasında organik bileşenlerin uzaklaştırılmasıyla yapıda sadece hidroksiapatit kalması amaçlanmaktadır. Bu amaçla SEM-EDX analizi yapılmıştır. Şekil 6.11'deki analiz sonucuna göre; yapıda ağırlıkça %52 O, %16 P ve %30.1 Ca elementlerinin bulunduğu görülmüştür. Elde edilen verilerden Ca/P mol oranı 1.47 olarak hesplanmıştır. Spektrumda en yüksek ve en belirgin pik kalsiyum elementine aittir. Bu durum, malzemenin kalsiyum açısından zengin olduğunu göstermektedir. THA'nın kimyasal formülünde [$Ca_5(PO_4)_3(OH)$] yer alan oksijen ve fosfor ise EDX spekturumunda belirgin piklere sahiptir. Hidrojen elementine ait pikler, EDX dedektörlerinin algılayabileceği aralıktan çok daha düşük olduğu için, spektrumda görülemeyebilmekte, bu nedenle hidroksil grubu (OH) içindeki hidrojen, EDX analizi ile doğrudan tespit edilemeyebilmektedir. Ancak oksijen miktarından yararlanılarak hesaplanması mümkün olabilmektedir.



Şekil 6.11 3B SLA ile basılmış kemik doku iskelesinin (HT-F-mH51) EDX analizi

Şekil 6.12'de THA, mTHA (A30THA-3) ve 3B basılmış kemik doku iskelesi (HT-F-mH51) numunelerine ait XRD analiz spektrumları yer almaktadır.



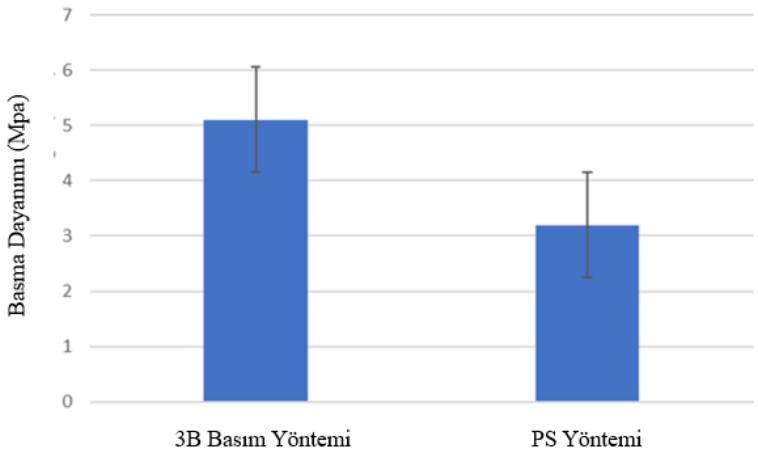
Şekil 6.12 a) THA, b) A30THA-3, c) HT-F-mH50 isimli numunelerin XRD spektrumları

Şekil 6.12-a'da verilen spektrumda 26°, 32°, 34°, 40°, 46° ve 50° 2θ değerlerinde gözlenen pikler, THA için karakteristik olan piklerdir. Bu piklerin keskinliği ve yüksek yoğunluğu, malzemenin yüksek kristallik derecesini ve dolayısıyla yüksek saflığını gösterir. Şekil 6.12-b'de verilen SA ile modifiye edilmiş THA'nın spektrumunda ise, daha amorf bir yapı ve piklerin keskinliğinin daha düşük olduğu görülmüştür. Modifikasyon işlemi sonucunda, ana THA pikleri korunmuş ancak spektrumda yeni düşük yoğunluklu pikler oluşmuştur. Bu durum, stearik asidin uzun zincirli bir hidrofobik organik asit karakteri nedniyle hidroksiapatitin yüzeyine adsorbe olması ile ilişkilidir. Oluşan adsorpsiyon sonucunda THA'nın yüzey özelliklerini değiştirerek kristal yapısında bozulmaya yol açmaktadır. Son aşama olarak 3B basılmış kemik doku iskelesine sinterleme işlemi uygulanmış ve XRD grafiği Şekil 6.12-c'de evrilmiştir. Sinterleme süreci; THA'nın yeniden kristalleşmesine ve organik bileşenlerin ısıyla uzaklaştırılmasına yol açarak, malzemenin mikroyapısında değişikliklere neden olmuştur. Sinterleme işlemi,

kristal yapının daha homojen hale gelmesine ve dolayısıyla daha düzenli bir mikroyapıya ulaşılmasına da katkıda bulunmaktadır. 3B basılmış kemik doku iskelesinin spektrumunda 25.9°, 28.2°, 29.1°, 31.8°, 32.2°, 34.2°, 39.8° ve 48.1° 2θ değerlerinde yer alan pikler, THA'nın karakteristik pikleridir [149, 147].

6.3.3.3 Polimerik Sünger ve 3B Basım Yöntemi ile Üretilmiş Kemik Doku İskelelerinin Mekanik Özellikleri

PS ve 3B basım yöntemiyle üretilen numunelerin basma dayanımları Şekil 6.13'de sunulmuştur. Her bir numunenin basma dayanımı değerleri 10 adet ölçüm sonucuna göre belirlenmiştir. 3B basım yöntemi ile üretilen numunelerde en yüksek basma dayanımı 6.4 MPa, en düşük basma dayanımı 4.1 MPa ve ortalama basma dayanımı 5.1 MPa olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 6.13 3B basım (HT-F-mH51) ve polimerik sünger (PS) yöntemleri ile üretilmiş numunelere ait basma dayanımı değerleri

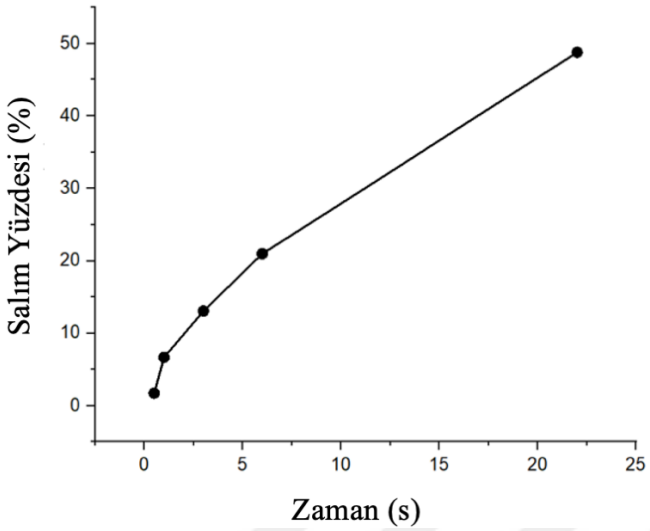
Polimerik sünger yöntemiyle üretilen numunelerde ise en yüksek basma dayanım değeri 4.2 MPa, en düşük basma dayanımı 2.3 MPa ve ortalama basma dayanımı 3 MPa olarak belirlenmiştir. 3B basım yöntemi ile üretilen numuneler; katman yapısı, yoğunluk ve kürlenme süresi gibi parametrelerin kontrol edilebilirliği sayesinde daha yüksek basma dayanımına sahiptir. Polimerik sünger yöntemi ile üretilen numuneler ise süngerimsi kemiğin mekanik özelliklerine uygun olmasına rağmen, üretim sırasında geometrik kontrollerin kısıtlı olması nedeniyle daha düşük mekanik dayanım göstermiştir.

6.4 Çay Ağacı Yağı (ÇY) ile Kaplanmış Kemik Doku İskelelerine Ait Deneysel Sonuçlar ve Tartışma

İki yöntem ile üretilen kemik doku iskelelerinin kimyasal, morfolojik ve mekanik özellikleri karşılaştırıldığında; 3B SLA baskı yöntemi ile üretilen numunelerin daha iyi sonuçlar verdiği değerlendirilmiştir. Bu nedenle kaplama işlemi, hücre ve antibakteriyel testler, 3B SLA baskı tekniği ile üretilmiş kemik doku iskeleleri üzerinde uygulanmıştır. Kemik doku iskeleleri, çay ağacı yağı (ÇY) ile kaplandıktan sonra kimyasal, in vitro ve antibakteriyel analizler yapılmıştır. Çay ağacı yağının PBS ortamında zamana bağlı salım çözeltilerinde GC-MS/FID (Gas Chromatography-Mass Spectrometry/ Flame Ionization Dedector) cihazı ile çay ağacı yağından salınan terpinen-4-ol miktarı belirlenmiş olup, ayrıca biyouyumluluk ve hücre adezyon testleri gerçekleştirilmiştir.

6.4.1 ÇY ve ÇY Kaplı Kemik Doku İskelelerinin Kümülatif Salım İşlemi

ÇY ile kaplanan kemik doku iskelelerinin kümülatif ÇY salımı PBS ortamında (pH=7.4) gerçekleştirilmiştir. 100 mg kemik doku iskelesi, PBS tamponuna daldırılarak 37°C'de 50 rpm hızda karıştırma ile inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (30 dk, 90 dk, 3 saat, 6 saat, 22 saat) salım ortamı alınarak yerine taze salım çözeltisi eklenmiştir. Salınan çay ağacı yağı (terpinen-4-ol) miktarı, salım ortamından alınan örneklerin GC-MS/FID cihazı ile analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Analizler sonrası elde edilen pik alanları ve FID ile belirlenen konsantrasyon hesapları kullanılarak salınan çay ağacı yağı miktarları ve salım yüzdeleri tayin edilmiştir. Zamana bağlı salım miktarları toplanarak zamana karşı kümülatif salım yüzdesi değişim grafiği çizilmiştir (Şekil 6.14).



Şekil 6.14 ÇY salım grafiği

Kaplanmış numuneler için salım ortamı oluşturulmuş ve 0.5, 1.5, 3, 6 ve 22 saat periyodik aralıkları sonunda ÇY içerisinde antibakteriyel özellik gösteren Terpinen-4-ol bileşeninin %48 oranında salım yaptığı GC-MS/FID analiz yöntemi ile belirlenmiştir.

6.4.2 Hücre Deneyleri ve Antibakteriyel Etki Testi

3B SLA baskı ile üretilmiş kemik doku iskelelerine biyouyumluluk ve hücre adezyon testleri uygulanmıştır.

6.4.2.1 Biyouyumluluk Analizi

Biyouyumluluk testinde, kemik doku iskelesi L929 fare fibroblast hücre ortamında 24, 48 ve 72 saat boyunca tutulmuş ve hücre canlılık oranları belirlenmiştir. Hücre canlılık oranı, Eşitlik (6.1)'de verilmiş olan formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı}(\%) = \left(\frac{\text{Numune absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}}\right) \times 100$$

24 ve 72 saat sonunda ulaşılan hücre canlılığı sonuçları Tablo 6.1'de verilmiştir. Referans numune (HT-F-mH51), 3B baskı yöntemi ile basılmış ve kaplama içermeyen kemik doku iskelesidir. HT-F-mH51-K1 ve HT-F-mH51-K2 kodlu numuneler ise farklı kaplama konsantrasyonlarına sahip numunelerdir.

Tablo 6.1 24. ve 72. saat sonundaki hücre canlılık test sonuçları

	24 saat	**±SD**	**72 saat**	**±SD**
Kontrol	100	1,90	100	3,10
Referans*	98,63	2,40	96,08	2,20
HT-F-mH51-K1	90,04	4,70	82,92	3,40
HT-F-mH51-K2	94,03	4,0	84,17	6,90

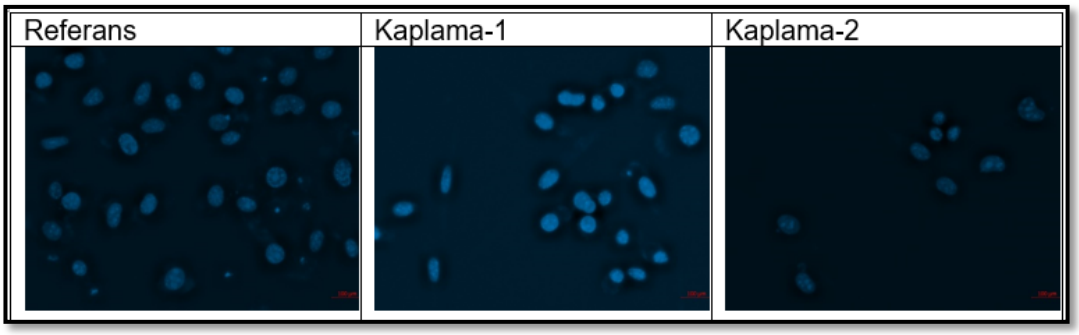
*Kaplanmamış numune

24 saat sonundaki hücre canlılıkları incelendiğinde; üç deney grubunun da kontrol grubu ile hücre canlılıklarının yakın olduğu ve biyouyumluluk gösterdiği tespit edilmiştir. 72 saat sonundaki hücre canlılıkları incelendiğinde; üç deney grubunun hücre canlılıklarının biyouyumluluk gösterdiği ancak referans grubunun diğer gruplara göre hücre proliferasyonunda daha etkili olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda HT-F-mH51-K2 deney grubunun, HT-F-mH51-K2 deney grubuna göre az düzeyde de olsa hücre canlılığı üzerinde etkinliğinin daha iyi olduğu söylenebilir. Referans doku iskelesi, sinterlenmiş yapıdan oluştuğu için organik bileşenlerden gelebilecek toksik özellik bulundurmamaktadır. ÇY ile kaplanmış numunelerde ise hücre canlılığı testi olumlu sonuçlansa da, 24 ve 72 saat sonrasında canlılık oranındaki azalmanın yağın hidrofobik yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hücre membranları genellikle hidrofilik karakterdedir, bu nedenle hücrelerin proliferasyonu ve yüzeye adezyonu için yüzeyin su tutucu (hidrofilik) özellik göstermesi avantaj sağlamaktadır. Hidrofobik yüzeyler ise suyu uzaklaştırdığı için, hücrelerin yüzeyde tutunması zorlaşabilmekte ve hücresel fonksiyonlar olumsuz etkilenebilmektedir.

6.4.2.2 Hücre Adezyon Testi

Doku iskelelerinin (referans, HT-F-mH51-K1 ve HT-F-mH51-K2 kodlu numuneler) hücre adezyonunu üzerindeki etkinliklerinin incelenmesi için DAPI boyama yöntemi kullanılmıştır. Bunun için UV ile sterilizasyonu yapılmış ve doku iskelelerinin yüzeyine L929 fibroblast hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir ve doku iskeleleri 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından hücrelerin floresan mikroskopta görüntülenmesi için fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Referans, HT-F-mH51-K1 ve HT-F-mH51-K2 kodlu numunelerin yüzeyinde

bulunan hücrelerin 10X büyütmedeki floresan mikroskop görüntüleri Şekil 6.15'te verilmiştir.



Şekil 6.15 Kaplama işlemi uygulanmamış (Referans) ve uygulanmış numunelerin yüzeyinde bulunan hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri (10X)

Hücre adezyon testi sonucunda görüntülenen hücre yoğunluğuna göre numunelerin sıralaması; Referans > HT-F-mH51-K1 > HT-F-mH51-K2 şeklinde olmuştur. Her iki numune de eşit hacimde kaplama solüsyonu ile kaplanmıştır. HT-F-mH51-K1 numunesi için hazırlanan kaplama çözeltisi daha yüksek konsantrasyonda çay ağacı yağı (ÇY) içermesine rağmen, hücre tutunması HT-F-mH51-K2 numunesinde daha yüksek düzeyde olmuştur.

6.4.2.3 Antibakteriyel Analiz

Antibakteriyel test sırasında kemik doku iskele numuneleri *S. aureus* hücre hattı ile muamele edilmiştir. Test sonuçları Tablo 6.2'de verilmiştir.

Tablo 6.2 Kaplama işlemi uygulanmamış (referans) ve uygulanmış kemik doku iskelelerinin antibakteriyel test sonuçları

	±SD	**Bakteri canlılığı (%)**
Pozitif kontrol	3,19	100
Ref	2,33	94,35
HT-F-mH51-K1	0,41	70,89
HT-F-mH51-K2	3,04	73,27
Negatif kontrol	0,08	0,00

Deney grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında; (i) referans numune, antibakteriyel kaplama içermediğinden antibakteriyel özellik göstermemiştir, (ii) HT-F-mH51-K1 numunesi, bakteriyel ortamda %30 oranında inhibisyon sergilerken; HT-F-mH51-K2 numunesi de %27 oranında inhibisyon göstermiştir.

Kaplanmış numuneler referans grubu ile karşılaştırıldığında, ÇY'nin antibakteriyel özellik sergilediği tespit edilmiştir.

7
SONUÇ

Tez çalışması kapsamında; kemik doku mühendisliği uygulamalarında sentetik greft olarak kullanılmak üzere, ticari hidroksiapatit (THA) tozu kullanılarak polimerik sünger yöntemi ve 3B basım yöntemi ile kemik doku iskeleleri hazırlanmıştır. İlk olarak, ticari hidroksiapatitin kimyasal, fiziksel ve morfolojik özellikleri incelenmiştir. Ardından, ticari hidroksiapatit tozu kullanılarak polimerik sünger yöntemiyle doku iskeleleri üretilmiş ve bu iskeleler kimyasal, mekanik ve morfolojik testlere tabi tutulmuştur. SEM analizleri, polimerik sünger yöntemiyle üretilen doku iskelelerinde gözenek büyüklüklerinin 150 µm ile 1000 µm arasında değiştiğini, kapalı gözeneklerin oranının açık gözeneklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir.

3B basım yönteminde kullanılan seramik çamurun hidroksiapatit yükleme oranını artırmak amacıyla ticari hidroksiapatit stearik asit ile modifiye edilmiştir. Modifikasyon sonrası FTIR analizinde stearik aside özgü pikler gözlemlenmiş ve temas açısı ölçümünde modifiye edilmiş hidroksiapatitin hidrofobik davranış sergilediği belirlenmiştir. Modifikasyon işlemi, hidroksiapatit yükleme oranını ağırlıkça %40'tan %55'e çıkararak, mekanik dayanımı 4.1 MPa'dan 6.4 MPa'ya yükseltmiştir. 3B basım yöntemi ile üretilen doku iskelelerinde gözenek büyüklüklerinin 300 µm ile 1200 µm arasında değiştiği, gözeneklerin homojen dağıldığı ve büyük çatlakların bulunmadığı tespit edilmiştir.

Her iki yöntemle üretilen doku iskelelerine sinterleme işlemi uygulanmış ve XRD ile FTIR analizleri sonucunda benzer spektrumlar elde edilmiştir. Sinterleme işlemi, organik maddelerin uzaklaştırılması ve kristalin yapının daha düzenli hale gelmesini sağlamıştır. Mekanik testler, 3B basım yöntemi ile üretilen numunelerin polimerik sünger yöntemi ile üretilen numunelere göre daha yüksek basma dayanımı sergilediğini ortaya koymuştur.

3B basım yöntemi ile üretilen kemik doku iskeleleri, antibakteriyel özellik kazandırmak amacıyla çay ağacı yağı (ÇY) ile kaplanmıştır. GC-MS/FID analizi ile yağın salım profili incelenmiş ve in vitro testlerde, ÇY ile kaplanan kemik doku

iskelelerinin hücre canlılık oranlarının, HT-F-mH51-K1 numunesinde %98'den %84'e, HT-F-mH51-K2'de ise %96'dan %82'ye düştüğü, ancak hücre canlılığının devam ettiği gözlemlenmiştir. Antibakteriyel testlerde, kaplanmamış numunenin %6 olan ortalama antibakteriyel aktivitesi, ÇY kaplaması ile %30'a yükselmiştir.

Sonuç olarak, modern ve geleneksel yöntemlerle üretilen kemik doku iskeleleri arasında yapılan karşılaştırmalar, 3B basım yöntemi ile üretilen kemik doku iskelesinin daha üstün kimyasal, mekanik ve fiziksel özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. 3B basım yöntemiyle üretilen ve çay ağacı yağı ile kaplanan doku iskelelerinin, biyouyumluluk, mekanik dayanım ve antibakteriyel özellikler açısından klinik kullanıma uygun, enfeksiyon gibi komplikasyonları engelleyebilecek potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Çay ağacı yağı ile yapılan kaplamaların, antibakteriyel özellikler ve hücre canlılığı üzerindeki etkilerini detaylı olarak incelemek, bu tip kaplamaların çeşitli biyomedikal uygulamalar için uygunluğunu belirleyebilir. Bu kaplamaların farklı çözelti konsantrasyonları ve uygulama yöntemleri ile hazırlanması, kaplamanın ömrü ve antibakteriyel etkinliği üzerinde önemli değişimler oluşturabilecektir. 3B basım yöntemi ile üretilen iskelelerin klinik uygulamalar öncesi daha ileri çalışmalarının yapılması, bu teknolojinin güncel klinik taleplere uygunluğunu belirlemede önemli olacaktır.

KAYNAKÇA

[1] W. S. Khan, F. Rayan, B. S. Dhinsa, and D. Marsh, "An Osteoconductive, Osteoinductive, and Osteogenic Tissue-Engineered Product for Trauma and Orthopaedic Surgery: How Far Are We?," *Stem Cells Int*, vol. 2012, 2012.

[2] B. J. Smith, E. Rendina, and E. A. Lucas, "Dried Plum and Bone Health," *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases: Bioactive Food in Chronic Disease States*, pp. 83–95, Jan. 2013.

[3] M. Alonzo *et al.*, "Bone tissue engineering techniques, advances and scaffolds for treatment of bone defects," *Curr Opin Biomed Eng*, vol. 17, Mar. 2021.

[4] X. Lin, S. Patil, Y. G. Gao, and A. Qian, "The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration," *Front Pharmacol*, vol. 11, p. 521497, May 2020.

[5] G. Fernandez de Grado *et al.*, "Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management," *J Tissue Eng*, vol. 9, Jun. 2018.

[6] E. Gómez-Barrena, P. Rosset, D. Lozano, J. Stanovici, C. Ermthaller, and F. Gerbhard, "Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions," *Bone*, vol. 70, pp. 93–101, Jan. 2015.

[7] E. Santolini, R. West, and P. V. Giannoudis, "Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence," *Injury*, vol. 46, pp. S8–S19, Dec. 2015.

[8] B. Wildemann *et al.*, "Non-union bone fractures," *Nature Reviews Disease Primers 2021 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–21, Aug. 2021.

[9] A. Wubneh, E. K. Tsekoura, C. Ayranci, and H. Uludağ, "Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering," Oct. 15, 2018, *Acta Materialia Inc*.

[10] H. Qu, H. Fu, Z. Han, and Y. Sun, "Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review," *RSC Adv*, vol. 9, no. 45, pp. 26252–26262, Aug. 2019.

[11] E. García-Gareta, M. J. Coathup, and G. W. Blunn, "Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration," *Bone*, vol. 81, pp. 112–121, Dec. 2015.

[12] G. L. Koons, M. Diba, and A. G. Mikos, "Materials design for bone-tissue engineering," *Nature Reviews Materials 2020 5:8*, vol. 5, no. 8, pp. 584–603, Jun. 2020.

[13] Y. Yan *et al.*, "Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration," *Biomaterials*, vol. 190–191, pp. 97–110, Jan. 2019.

[14] S. Bose, S. Tarafder, and A. Bandyopadhyay, "Effect of Chemistry on Osteogenesis and Angiogenesis Towards Bone Tissue Engineering Using 3D Printed Scaffolds," *Ann Biomed Eng*, vol. 45, no. 1, pp. 261–272, Jan. 2017.

[15] Y.-J. Cheng, T.-H. Wu, Y.-S. Tseng, and W.-F. Chen, “Development of hybrid 3D printing approach for fabrication of high-strength hydroxyapatite bioscaffold using FDM and DLP techniques,” *Biofabrication*, vol. 16, no. 2, p. 025003, Jan. 2024.

[16] C. Zhao, W. Liu, M. Zhu, C. Wu, and Y. Zhu, “Bioceramic-based scaffolds with antibacterial function for bone tissue engineering: A review,” *Bioact Mater*, vol. 18, pp. 383–398, Dec. 2022.

[17] A. P. N. Alves *et al.*, “3D-printed β-TCP/S53P4 bioactive glass scaffolds coated with tea tree oil: Coating optimization, in vitro bioactivity and antibacterial properties,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 111, no. 4, pp. 881–894, Apr. 2023.

[18] A. R. Amini, C. T. Laurencin, and S. P. Nukavarapu, “Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges,” 2012.

[19] J. L. Brown, S. G. Kumbar, and C. T. Laurencin, “Bone Tissue Engineering,” *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*, pp. 1194–1214, Jan. 2013.

[20] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, “Extracellular matrix structure,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 97, pp. 4–27, Feb. 2016.

[21] R. Florencio-Silva, G. R. D. S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, “Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells,” 2015, *Hindawi Publishing Corporation*.

[22] J. Scheinpflug *et al.*, “Journey into bone models: A review,” May 01, 2018.

[23] B. Clarke, “Normal Bone Anatomy and Physiology,” *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 3, no. Suppl 3, p. S131, 2008.

[24] E. H. Yang, *Osteogenesis and Bone Regeneration*. IntechOpen, 2019.

[25] S. H. Ralston, “Bone structure and metabolism,” *Medicine*, vol. 49, no. 9, pp. 567–571, Sep. 2021.

[26] A. Nahian and D. D. Davis, “Histology, Osteoprogenitor Cells,” *StatPearls*, Dec. 2022, Accessed: Oct. 21, 2023.

[27] B. Bisht, A. Hope, A. Mukherjee, and M. K. Paul, “Advances in the Fabrication of Scaffold and 3D Printing of Biomimetic Bone Graft,” *Ann Biomed Eng*, vol. 49, no. 4, pp. 1128–1150, Apr. 2021.

[28] M. P. Ginebra, M. Espanol, Y. Maazouz, V. Bergez, and D. Pastorino, “Bioceramics and bone healing,” *EFORT Open Rev*, vol. 3, no. 5, p. 173, May 2018.

[29] M. N. Collins, G. Ren, K. Young, S. Pina, R. L. Reis, and J. M. Oliveira, “Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering,” *Adv Funct Mater*, vol. 31, no. 21, p. 2010609, May 2021.

[30] Ž. Perić Kačarević *et al.*, "An introduction to bone tissue engineering," Feb. 01, 2020, *SAGE Publications Ltd*.

[31] J. Zhou *et al.*, "Biomaterials and nanomedicine for bone regeneration: Progress and future prospects," *Exploration*, vol. 1, no. 2, p. 20210011, Oct. 2021.

[32] A. Oryan, S. Monazzah, and A. Bigham-Sadegh, "Bone Injury and Fracture Healing Biology," *Biomedical and Environmental Sciences*, vol. 28, no. 1, pp. 57–71, Jan. 2015.

[33] S. L. De Armentia, J. C. Del Real, E. Paz, and N. Dunne, "Advances in Biodegradable 3D Printed Scaffolds with Carbon-Based Nanomaterials for Bone Regeneration," *Materials 2020, Vol. 13, Page 5083*, vol. 13, no. 22, p. 5083, Nov. 2020.

[34] A. Oryan, S. Alidadi, and A. Moshiri, "Current concerns regarding healing of bone defects," *Hard Tissue*, vol. 2, no. 2, Feb. 2013.

[35] T. Kim, C. W. See, X. Li, and D. Zhu, "Orthopedic implants and devices for bone fractures and defects: Past, present and perspective," *Engineered Regeneration*, vol. 1, pp. 6–18, Jan. 2020.

[36] W. Wang and K. W. K. Yeung, "Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review," *Bioact Mater*, vol. 2, no. 4, pp. 224–247, Dec. 2017.

[37] M. S. Ghiasi, J. Chen, A. Vaziri, E. K. Rodriguez, and A. Nazarian, "Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods," *Bone Rep*, vol. 6, pp. 87–100, Jun. 2017.

[38] A. Eltom, G. Zhong, and A. Muhammad, "Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review," *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2019, 2019.

[39] A. S. H. F. J. S. J. E. L. Buddy D. Ratner, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd Edition. Academic Press, 2012.

[40] R. Das, "Application of nanobioceramics in bone tissue engineering," in *Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials*, Elsevier Inc., 2016, pp. 353–379.

[41] Y.-Z. Huang, H.-Q. Xie, and X. Li, "Scaffolds in Bone Tissue Engineering: Research Progress and Current Applications," in *Encyclopedia of Bone Biology*, Elsevier, 2020, pp. 204–215.

[42] M. Mirkhalaf, Y. Men, R. Wang, Y. No, and H. Zreiqat, "Personalized 3D printed bone scaffolds: A review," *Acta Biomater*, vol. 156, pp. 110–124, Jan. 2023.

[43] L. et al Zhang, "Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair," *Acta Biomater*, pp. 16–33, 2019.

[44] S. Pina *et al.*, "Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications," *Materials 2019, Vol. 12, Page 1824*, vol. 12, no. 11, p. 1824, Jun. 2019.

[45] X. Mo *et al.*, “Application of high resolution DLP stereolithography for fabrication of tricalcium phosphate scaffolds for bone regeneration,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 30–32, Jun. 2013.

[46] C. R. M. Black, V. Goriainov, D. Gibbs, J. Kanczler, R. S. Tare, and R. O. C. Oreffo, “Bone Tissue Engineering,” *Curr Mol Biol Rep*, vol. 1, no. 3, p. 132, Sep. 2015.

[47] V. Tollemar, Z. J. Collier, M. K. Mohammed, M. J. Lee, G. A. Ameer, and R. R. Reid, “Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine,” *Genes Dis*, vol. 3, no. 1, p. 56, Mar. 2016.

[48] T. Ghassemi, A. Shahroodi, M. H. Ebrahimzadeh, A. Mousavian, J. Movaffagh, and A. Moradi, “Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering,” *Archives of Bone and Joint Surgery*, vol. 6, no. 2, p. 90, Mar. 2018.

[49] F. N. Alaribe, S. L. Manoto, and S. C. K. M. Motaung, “Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering,” *Biologia 2016 71:4*, vol. 71, no. 4, pp. 353–366, Dec. 2016.

[50] G. Tang *et al.*, “Recent Trends in the Development of Bone Regenerative Biomaterials,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, May 2021.

[51] U. Jammalamadaka and K. Tappa, “Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering,” *Journal of Functional Biomaterials 2018, Vol. 9, Page 22*, vol. 9, no. 1, p. 22, Mar. 2018.

[52] G. Gautam, S. Kumar, and K. Kumar, “Processing of biomaterials for bone tissue engineering: State of the art,” *Mater Today Proc*, vol. 50, pp. 2206–2217, Jan. 2022.

[53] S. Preethi Soundarya, A. Haritha Menon, S. Viji Chandran, and N. Selvamurugan, “Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques,” *Int J Biol Macromol*, vol. 119, pp. 1228–1239, Nov. 2018.

[54] L. Le Guéhennec *et al.*, “In vitro and in vivo biocompatibility of calcium-phosphate scaffolds three-dimensional printed by stereolithography for bone regeneration,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 108, no. 3, pp. 412–425, Mar. 2020.

[55] S. Pokhrel, “Hydroxyapatite: Preparation, Properties and Its Biomedical Applications,” *Advances in Chemical Engineering and Science*, vol. 08, no. 04, pp. 225–240, Sep. 2018.

[56] C. Soriano-Souza *et al.*, “Doxycycline containing hydroxyapatite ceramic microspheres as a bone-targeting drug delivery system,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 108, no. 4, pp. 1351–1362, May 2020.

[57] S.-H. Um *et al.*, “Robust Hydroxyapatite Coating by Laser-Induced Hydrothermal Synthesis,” *Adv Funct Mater*, vol. 30, no. 48, p. 2005233, Nov. 2020.

[58] J. Anita Lett *et al.*, "Recent advances in natural polymer-based hydroxyapatite scaffolds: Properties and applications," *Eur Polym J*, vol. 148, p. 110360, Apr. 2021.

[59] Y. Wen *et al.*, "3D printed porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering: A review," Sep. 01, 2017, *Royal Society of Chemistry*.

[60] X. Wang *et al.*, "Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review," *Biomaterials*, vol. 83, pp. 127–141, Mar. 2016.

[61] G. Battafarano *et al.*, "Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering," *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 1128*, vol. 22, no. 3, p. 1128, Jan. 2021.

[62] G. C. Berlet *et al.*, "The Impact of Patient Age on Foot and Ankle Arthrodesis Supplemented with Autograft or an Autograft Alternative (rhPDGF-BB/β-TCP)," *JBJS Open Access*, vol. 5, no. 4, p. E2000056, Oct. 2020.

[63] S. E. C. M. van de Vijfeijken *et al.*, "Autologous Bone Is Inferior to Alloplastic Cranioplasties: Safety of Autograft and Allograft Materials for Cranioplasties, a Systematic Review," *World Neurosurg*, vol. 117, pp. 443-452.e8, Sep. 2018.

[64] A. Bow, D. E. Anderson, and M. Dhar, "Commercially available bone graft substitutes: the impact of origin and processing on graft functionality," *Drug Metab Rev*, vol. 51, no. 4, pp. 533–544, Oct. 2019.

[65] H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, F. Rossi, and G. Perale, "Bone grafts: which is the ideal biomaterial?," *J Clin Periodontol*, vol. 46, no. S21, pp. 92–102, Jun. 2019.

[66] A. S. Almutairi, "A descriptive analysis of patient's preferences in bone graft therapy in dentistry," *Int J Health Sci (Qassim)*, vol. 13, no. 3, p. 24, 2019, Accessed: Nov. 11, 2023.

[67] E. Roddy, M. R. DeBaun, A. Daoud-Gray, Y. P. Yang, and M. J. Gardner, "Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives," *Eur J Orthop Surg Traumatol*, vol. 28, no. 3, pp. 351–362, Apr. 2018.

[68] A. Bigham, F. Foroughi, E. Rezvani Ghomi, M. Rafienia, R. E. Neisiany, and S. Ramakrishna, "The journey of multifunctional bone scaffolds fabricated from traditional toward modern techniques," *Bio-Design and Manufacturing 2020 3:4*, vol. 3, no. 4, pp. 281–306, Aug. 2020.

[69] A. Prasad, M. R. Sankar, and V. Katiyar, "State of Art on Solvent Casting Particulate Leaching Method for Orthopedic ScaffoldsFabrication," *Mater Today Proc*, vol. 4, no. 2, pp. 898–907, Jan. 2017.

[70] P. Chocholata, V. Kulda, and V. Babuska, "Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration," *Materials*, vol. 12, no. 4, Feb. 2019.

[71] U. G. T. M. Sampath, Y. C. Ching, C. H. Chuah, J. J. Sabariah, and P. C. Lin, “Fabrication of porous materials from natural/synthetic biopolymers and their composites,” *Materials*, vol. 9, no. 12, 2016.

[72] A. Koyyada and P. Orsu, “Recent Advancements and Associated Challenges of Scaffold Fabrication Techniques in Tissue Engineering Applications,” *Regen Eng Transl Med*, vol. 7, no. 2, pp. 147–159, Jun. 2021.

[73] T. Garg, O. Singh, S. Arora, and R. S. R. Murthy, “Scaffold: A novel carrier for cell and drug delivery,” *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, vol. 29, no. 1, pp. 1–63, 2012.

[74] T. Lu, Y. Li, and T. Chen, “Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering,” *Int J Nanomedicine*, vol. 8, pp. 337–350, Jan. 2013.

[75] A. Haider *et al.*, “Advances in the scaffolds fabrication techniques using biocompatible polymers and their biomedical application: A technical and statistical review,” *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 24, no. 2, pp. 186–215, Feb. 2020.

[76] L. K. Cardon, K. J. Ragaert, R. De Santis, and A. Gloria, “Design and fabrication methods for biocomposites,” *Biomedical Composites*, pp. 17–36, Jan. 2017.

[77] H. Janik and M. Marzec, “A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds,” *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 48, pp. 586–591, Mar. 2015.

[78] S. H. Sadraie, K. Roshanbinfar, G. Kaka, and J. Hoseini, “Mechanical and structural study of hydroxyapatite (Ha) scaffolds produced by gel casting and sponge replication methods,” *J Biomater Tissue Eng*, vol. 4, no. 7, pp. 562–566, 2014.

[79] A. H. Aghajanian, B. A. Khazaei, M. Khodaei, and M. Rafienia, “Fabrication of Porous Mg-Zn Scaffold through Modified Replica Method for Bone Tissue Engineering,” *J Bionic Eng*, vol. 15, no. 5, pp. 907–913, Sep. 2018.

[80] C. Wang, H. Chen, X. Zhu, Z. Xiao, K. Zhang, and X. Zhang, “An improved polymeric sponge replication method for biomedical porous titanium scaffolds,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 70, pp. 1192–1199, Jan. 2017.

[81] P. Deb, A. B. Deoghare, A. Borah, E. Barua, and S. Das Lala, “Scaffold Development Using Biomaterials: A Review,” *Mater Today Proc*, vol. 5, no. 5, pp. 12909–12919, Jan. 2018.

[82] H. S. Sofi, R. Ashraf, M. A. Beigh, and F. A. Sheikh, “Scaffolds Fabricated from Natural Polymers/Composites by Electrospinning for Bone Tissue Regeneration,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 1078, pp. 49–78, 2018.

[83] M. Rahmati *et al.*, “Electrospinning for tissue engineering applications,” *Prog Mater Sci*, vol. 117, p. 100721, Apr. 2021.

[84] Y. Zhang *et al.*, “Polymer Fiber Scaffolds for Bone and Cartilage Tissue Engineering,” *Adv Funct Mater*, vol. 29, no. 36, p. 1903279, Sep. 2019.

[85] M. N. M. Azlin *et al.*, “3D Printing and Shaping Polymers, Composites, and Nanocomposites: A Review,” *Polymers 2022, Vol. 14, Page 180*, vol. 14, no. 1, p. 180, Jan. 2022.

[86] D. Srinivasan *et al.*, “3D Printing Manufacturing Techniques, Materials, and Applications: An Overview,” *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2021, no. 1, p. 5756563, Jan. 2021.

[87] Y. Bozkurt and E. Karayel, “3D printing technology; methods, biomedical applications, future opportunities and trends,” *Journal of Materials Research and Technology*, vol. 14, pp. 1430–1450, Sep. 2021.

[88] G. Chen, Y. Xu, P. C. L. Kwok, and L. Kang, “Pharmaceutical Applications of 3D Printing,” *Addit Manuf*, vol. 34, p. 101209, Aug. 2020.

[89] B. O. G.*, G. V. S., S. B. K., D. R. C., G. S. A., and G. P. S., “3D Printing & Pharmaceutical Manufacturing: Opportunities and Challenges,” *Int J Bioassays*, vol. 5, no. 01, p. 4723, Jan. 2016.

[90] A. Haleem, M. Javaid, R. H. Khan, and R. Suman, “3D printing applications in bone tissue engineering,” *J Clin Orthop Trauma*, vol. 11, no. Suppl 1, p. S118, Feb. 2020.

[91] H. Qu, “Additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds,” *Mater Today Commun*, vol. 24, p. 101024, Sep. 2020.

[92] O. Gülcan, K. Günaydın, and A. Tamer, “The State of the Art of Material Jetting—A Critical Review,” *Polymers 2021, Vol. 13, Page 2829*, vol. 13, no. 16, p. 2829, Aug. 2021.

[93] S. Wasti and S. Adhikari, “Use of Biomaterials for 3D Printing by Fused Deposition Modeling Technique: A Review,” *Front Chem*, vol. 8, May 2020.

[94] A. Jandyal, I. Chaturvedi, I. Wazir, A. Raina, and M. I. Ul Haq, “3D printing – A review of processes, materials and applications in industry 4.0,” *Sustainable Operations and Computers*, vol. 3, pp. 33–42, Jan. 2022.

[95] V. K. Balla *et al.*, “Biointegration of three-dimensional–printed biomaterials and biomedical devices,” *Biointegration of Medical Implant Materials*, pp. 433–482, Jan. 2020.

[96] R. Singh *et al.*, “Powder bed fusion process in additive manufacturing: An overview,” *Mater Today Proc*, vol. 26, pp. 3058–3070, Jan. 2020.

[97] W. Du, X. Ren, Z. Pei, and C. Ma, “Ceramic Binder Jetting Additive Manufacturing: A Literature Review on Density,” 2020.

[98] L. C. Hwa, S. Rajoo, A. M. Noor, N. Ahmad, and M. B. Uday, “Recent advances in 3D printing of porous ceramics: A review,” *Curr Opin Solid State Mater Sci*, vol. 21, no. 6, pp. 323–347, Dec. 2017.

[99] A. V. Do, B. Khorsand, S. M. Geary, and A. K. Salem, “3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications,” *Adv Healthc Mater*, vol. 4, no. 12, p. 1742, Aug. 2015.

[100] R. B. Kristiawan, F. Imaduddin, D. Ariawan, Ubaidillah, and Z. Arifin, “A review on the fused deposition modeling (FDM) 3D printing: Filament processing, materials, and printing parameters,” *Open Engineering*, vol. 11, no. 1, pp. 639–649, Jan. 2021.

[101] M. Mehrpouya, D. Tuma, T. Vaneker, M. Afrasiabi, M. Bambach, and I. Gibson, “Multimaterial powder bed fusion techniques,” *Rapid Prototyp J*, vol. 28, no. 11, pp. 1–19, Dec. 2022.

[102] Y. A. Gueche, N. M. Sanchez-Ballester, S. Cailleaux, B. Bataille, and I. Soulairol, “Selective Laser Sintering (SLS), a New Chapter in the Production of Solid Oral Forms (SOFs) by 3D Printing,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 8, Aug. 2021.

[103] A. Bove, F. Calignano, M. Galati, and L. Iuliano, “Photopolymerization of Ceramic Resins by Stereolithography Process: A Review,” *Applied Sciences 2022, Vol. 12, Page 3591*, vol. 12, no. 7, p. 3591, Apr. 2022.

[104] H. Quan, T. Zhang, H. Xu, S. Luo, J. Nie, and X. Zhu, “Photo-curing 3D printing technique and its challenges,” *Bioact Mater*, vol. 5, no. 1, pp. 110–115, Mar. 2020.

[105] S. Zakeri, M. Vippola, and E. Levänen, “A comprehensive review of the photopolymerization of ceramic resins used in stereolithography,” *Addit Manuf*, vol. 35, p. 101177, Oct. 2020.

[106] M. Mukhtarkhanov, A. Perveen, and D. Talamona, “Application of Stereolithography Based 3D Printing Technology in Investment Casting,” *Micromachines (Basel)*, vol. 11, no. 10, Oct. 2020.

[107] J. V. Crivello and E. Reichmanis, “Photopolymer materials and processes for advanced technologies,” *Chemistry of Materials*, vol. 26, no. 1, pp. 533–548, Jan. 2014.

[108] A. Vitale, R. Bongiovanni, and B. Ameduri, “Fluorinated oligomers and polymers in photopolymerization,” *Chem Rev*, vol. 115, no. 16, pp. 8836–8866, Aug. 2015.

[109] I. R. Avanzi *et al.*, “3D-printed hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering: A systematic review in experimental animal studies,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 111, no. 1, pp. 203–219, Jan. 2023.

[110] R. R. Aquino, M. S. Tolentino, and M. S. Foronda, “Melissa officinalis essential oil loaded polycaprolactone membranes: evaluation of antimicrobial activities and cytocompatibility for tissue engineering applications You may also like Fabrication and Characterization of Polycaprolactone / Nanozeolite Membrane Films via Phase Inversion Technique,” 2023.

[111] I. Unalan, T. Fuggerer, B. Slavik, A. Buettner, and A. R. Boccaccini, “Antibacterial and antioxidant activity of cinnamon essential oil-laden 45S5

bioactive glass/soy protein composite scaffolds for the treatment of bone infections and oxidative stress," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 128, p. 112320, Sep. 2021.

[112] D. Gallart-Mateu, C. D. Largo-Arango, T. Larkman, S. Garrigues, and M. de la Guardia, "Fast authentication of tea tree oil through spectroscopy," *Talanta*, vol. 189, pp. 404–410, Nov. 2018.

[113] L. Polo *et al.*, "Antimicrobial activity of commercial calcium phosphate based materials functionalized with vanillin," *Acta Biomater*, vol. 81, pp. 293–303, Nov. 2018.

[114] P. N. Christy *et al.*, "Biopolymeric nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications – A review," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 55, p. 101452, Feb. 2020.

[115] X. Y. Zhang, G. Fang, and J. Zhou, "Additively Manufactured Scaffolds for Bone Tissue Engineering and the Prediction of their Mechanical Behavior: A Review," *Materials 2017, Vol. 10, Page 50*, vol. 10, no. 1, p. 50, Jan. 2017..

[116] T. M. Koushik, C. M. Miller, and E. Antunes, "Bone Tissue Engineering Scaffolds: Function of Multi-Material Hierarchically Structured Scaffolds," *Adv Healthc Mater*, vol. 12, no. 9, p. 2202766, Apr. 2023.

[117] G. Turnbull *et al.*, "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering," *Bioact Mater*, vol. 3, no. 3, pp. 278–314, Sep. 2018.

[118] M. Filippi, G. Born, M. Chaaban, and A. Scherberich, "Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 8, p. 532791, May 2020.

[119] L. C. Gerhardt and A. R. Boccaccini, "Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering," *Materials*, vol. 3, no. 7, pp. 3867–3910, 2010.

[120] A. Przekora, "The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 97, pp. 1036–1051, Apr. 2019.

[121] I. Koumentakou, A. Michopoulou, M. J. Noordam, Z. Terzopoulou, and D. N. Bikiaris, "3D-printed scaffolds for tissue engineering applications using thermosensitive hydrogels based on biopolymer blends," *J Mater Sci*, vol. 59, no. 20, pp. 9021–9041, May 2024.

[122] A. Dubey, H. Vahabi, and V. Kumaravel, "Antimicrobial and Biodegradable 3D Printed Scaffolds for Orthopedic Infections," *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 9, no. 7, pp. 4020–4044, Jul. 2023.

[123] A. R. Unnithan, R. S. Arathyram, and C. S. Kim, "Scaffolds with Antibacterial Properties," *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, pp. 103–123, Jan. 2015.

[124] X. Ran, X. Yu, J. He, and Z. Xiao, “Molecular mechanism of nano-hydroxyapatite surface changes from hydrophilic to hydrophobic,” *Asian Journal of Chemistry*, vol. 26, no. 17, pp. 5355–5359, 2014.

[125] Y. Li and W. Weng, “Surface modification of hydroxyapatite by stearic acid: Characterization and in vitro behaviors,” *J Mater Sci Mater Med*, vol. 19, no. 1, pp. 19–25, Jan. 2008.

[126] R. Palucci Rosa and G. Rosace, “Nanomaterials for 3D Printing of Polymers via Stereolithography: Concept, Technologies, and Applications,” *Macromol Mater Eng*, vol. 306, no. 10, p. 2100345, Oct. 2021.

[127] B. Oezkan, F. Sameni, S. Karmel, D. S. Engstrøm, and E. Sabet, “A systematic study of vat-polymerization binders with potential use in the ceramic suspension 3D printing,” *Addit Manuf*, vol. 47, p. 102225, Nov. 2021.

[128] J. Tu, K. Makarian, N. J. Alvarez, and G. R. Palmese, “Formulation of a Model Resin System for Benchmarking Processing-Property Relationships in High-Performance Photo 3D Printing Applications,” *Materials 2020, Vol. 13, Page 4109*, vol. 13, no. 18, p. 4109, Sep. 2020.

[129] S. Goenka, “In Vitro Evaluation of Dental Resin Monomers, Triethylene Glycol Dimethacrylate (TEGDMA), and 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA) in Primary Human Melanocytes: A Pilot Study,” *Oral 2023, Vol. 3, Pages 353-371*, vol. 3, no. 3, pp. 353–371, Aug. 2023.

[130] J. Tu, K. Makarian, N. J. Alvarez, and G. R. Palmese, “Formulation of a Model Resin System for Benchmarking Processing-Property Relationships in High-Performance Photo 3D Printing Applications,” *Materials 2020, Vol. 13, Page 4109*, vol. 13, no. 18, p. 4109, Sep. 2020.

[131] Y. Bao, “Recent Trends in Advanced Photoinitiators for Vat Photopolymerization 3D Printing,” *Macromol Rapid Commun*, vol. 43, no. 14, p. 2200202, Jul. 2022.

[132] A. Badev *et al.*, “Photopolymerization kinetics of a polyether acrylate in the presence of ceramic fillers used in stereolithography,” *J Photochem Photobiol A Chem*, vol. 222, no. 1, pp. 117–122, Jul. 2011.

[133] Y. Bao, N. Paunović, J.-C. Leroux, Y. Bao, N. Paunović, and J.-C. Leroux, “Challenges and Opportunities in 3D Printing of Biodegradable Medical Devices by Emerging Photopolymerization Techniques,” *Adv Funct Mater*, vol. 32, no. 15, p. 2109864, Apr. 2022.

[134] J. Li, C. Boyer, and X. Zhang, “3D Printing based on Photopolymerization and Photocatalysts: Review and Prospect,” *Macromol Mater Eng*, vol. 307, no. 8, p. 2200010, Aug. 2022.

[135] Y. Du *et al.*, “Study of falling-down-type DLP 3D printing technology for high-resolution hydroxyapatite scaffolds,” *Int J Appl Ceram Technol*, vol. 19, no. 1, pp. 268–280, Jan. 2022.

[136] C. Feng *et al.*, “Additive manufacturing of hydroxyapatite bioceramic scaffolds: Dispersion, digital light processing, sintering, mechanical

properties, and biocompatibility," *Journal of Advanced Ceramics*, vol. 9, no. 3, pp. 360–373, Jun. 2020.

[137] J. Zhang *et al.*, "Zirconia toughened hydroxyapatite biocomposite formed by a DLP 3D printing process for potential bone tissue engineering," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 105, p. 110054, Dec. 2019.

[138] Z. Liu *et al.*, "Additive manufacturing of hydroxyapatite bone scaffolds via digital light processing and in vitro compatibility," *Ceram Int*, vol. 45, no. 8, pp. 11079–11086, Jun. 2019.

[139] Y. Yu, B. Zou, X. Wang, and C. Huang, "Rheological behavior and curing deformation of paste containing 85 wt% Al2O3 ceramic during SLA-3D printing," *Ceram Int*, vol. 48, no. 17, pp. 24560–24570, Sep. 2022.

[140] "ÇAY AĞACI YAĞI KATKILI POLİMERİK NANOFİBER YARA ÖRTÜSÜ ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU."

[141] T. Heise, A. Y. Sawyer, T. Hirai, S. Schaible, H. Sy, and S. Wickramasekara, "Report on investigation of ISO 10993–12 extraction conditions," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 131, p. 105164, Jun. 2022.

[142] I. Coksu *et al.*, "Enhancing the treatment of Staphylococcus aureus infections: A nanosystem with including dual antimicrobial peptide," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 97, p. 105830, Aug. 2024.

[143] V. Cannella *et al.*, "Cytotoxicity Evaluation of Endodontic Pins on L929 Cell Line," *Biomed Res Int*, vol. 2019, 2019.

[144] N. Boncukcu *et al.*, "Design of a bactericidal hydrogel scaffold containing genipin crosslinked HF-18 peptide," *Biotechnol Prog*, vol. 39, no. 2, Mar. 2023.

[145] S. J. Ding, Y. H. Chu, and P. T. Chen, "Mechanical Biocompatibility, Osteogenic Activity, and Antibacterial Efficacy of Calcium Silicate-Zirconia Biocomposites," *ACS Omega*, vol. 6, no. 10, pp. 7106–7118, Mar. 2021.

[146] J. Krieghoff *et al.*, "Increased pore size of scaffolds improves coating efficiency with sulfated hyaluronan and mineralization capacity of osteoblasts," *Biomater Res*, vol. 23, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2019.

[147] S. Lara-Ochoa, W. Ortega-Lara, and C. E. Guerrero-Beltrán, "Hydroxyapatite nanoparticles in drug delivery: Physicochemistry and applications," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 10, Oct. 2021.

[148] S. C. Shi and Y. Q. Peng, "Hydrophobicity and Macroscale Tribology Behavior of Stearic Acid/Hydroxypropyl Methylcellulose Dual-Layer Composite," *Materials*, vol. 14, no. 24, Dec. 2021.

[149] H. Xie *et al.*, "Preparation and characterization of 3D hydroxyapatite/collagen scaffolds and its application in bone regeneration with bone morphogenetic protein-2," *RSC Adv*, vol. 13, no. 33, pp. 23010–23020, Jul. 2023.

[150] J. Wang *et al.*, “Fabrication and biological evaluation of 3D-printed calcium phosphate ceramic scaffolds with distinct macroporous geometries through digital light processing technology,” *Regen Biomater*, vol. 9, 2022.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. 6.th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasianbiochem 2023), 11-13 OCTOBER 2023. Ayşe Seda ERGÜN (*https://orcid.org/0009-0002-5144-3779*), Abdullah TORAMAN (*https://orcid.org/0000-0002-7315-1235*), Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR (*https://orcid.org/0000-0001-7281-2305*)