

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALARDA KULLANIM AMAÇLI POLİMER
KOMPOZİTLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

Beyza SARICAOĞLU

DOKTORA TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hande ÇELEBİ

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2023

*Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen.20DRP068 no.lu proje ve
TÜBİTAK tarafından kabul edilen 122M851 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Beyza SARICAOĞLU'nun "Biyomedikal Uygulamalarda Kullanım Amaçlı Polimer Kompozitlerin Geliştirilmesi" başlıklı tezi 07/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Mühendisliği Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye

: Prof. Dr. Aydın DOĞAN

Üye

: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

Üye

: Prof. Dr. Demet TOPALOĞLU YAZICI

Üye

: Dr. Öğr. Üyesi Suzan BİRAN AY

Üye

: Dr. Öğr. Üyesi Sıdıka Mine TOKER

Prof. Dr. Semra KURAMA

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

07/07/2023

DANIşMAN ONAYI

Danişmanlığını yürüttüğüm Kimya Mühendisliği bölümü doktora ğrencisi Beyza SARICAOğLU, “Biyomedikal Uygulamalarda Kullanım Amaçlı Polimer Kompozitlerin Geliştirilmesi” başlıklı tez çalışmasını tamamlamıştır. Hazırlamış olduğu tez tarafımca incelenmiş ve öğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez Danişmanı

Prof. Dr. Hande ÇELEBİ

ÖZET

BİYOMEDİKAL UYGULAMALARDA KULLANIM AMAÇLI POLİMER KOMPOZİTLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Beyza SARICAOĞLU

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2023

Danışman: Prof. Dr. Hande ÇELEBİ

Bu çalışmada, FDA onaylı Poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) polimeri sentezlenmiştir. Laktit (L) ve glikolit (G) dimerlerinin kopolimeri olan PLGA doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Fourier dönüşümlü infrared (FTIR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ile karakterize edilerek kimyasal yapısı doğrulanmıştır. Termal özelliklerini belirlemek için termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri, çekme özelliklerini değerlendirmek için ise çekme testi yapılmıştır. Çözücü döküm/partikül uzaklaştırma yöntemi ile doku iskelesi üretimi yapılmıştır. Farklı oranlarda silanlı 45S5 biyoaktif cam (BG) ve nanoselüloz (NC) ilavesi yapılarak PLGA'nın zayıf mekanik özellikleri ve kemik doku için yetersiz apatit oluşumu iyileştirilmeye çalışılmıştır. Öncelikle ikili kompozitler ve sonrasında PLGA/sBG/NC üçlü kompozitler hazırlanmıştır. Elde edilen doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik yapıları incelenmiş, gözeneklilik oranları hesaplanmış ve gözenek çap dağılımları belirlenmiştir. Gerçekleştirilen basma testi sonucunda PLGA 9/20 sBG/15 NC numunesinin en yüksek dayanım ve Young modülü değerine, sırası ile $15,062 \pm 0,057$ MPa ve $0,495 \pm 0,007$ MPa sahip olduğu belirlenmiştir. BG katkısı arttıkça apatit oluşumun; NC katkısı arttıkça ise hidrolitik bozunmanın arttığı görülmüştür. Son olarak üçlü doku iskelelerinin hücre kültür çalışmaları da yapılmıştır. Tüm numunelerde sitotoksik etki görülmemiştir.

Anahtar kelimeler: Doku mühendisliği, Polimer sentezi, Doku iskelesi, Biyoaktif cam, Nanoselüloz

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLYMER COMPOSITES FOR USE IN BIOMEDICAL APPLICATIONS

Beyza SARICAOĞLU

Department of Chemical Engineering Program

Programme in Unit Operations and Thermodynamics

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, July 2023

Supervisor: Prof. Dr. Hande ÇELEBİ

In this study, FDA-approved Poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) polymer was synthesized. It is a copolymer of lactide (L) and glycolide (G) dimers and frequently preferred in tissue engineering applications. The chemical structures were confirmed by Fourier transform infrared (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) analyzes were performed to determine their thermal properties, and tensile tests were conducted to evaluate their tensile properties. Tissue scaffolds were produced by solvent casting/particle removal method. Silane-45S5 bioactive glass (BG) and nanocellulose (NC) were added at different ratios in order to improve poor mechanical properties of PLGA and insufficient apatite formation for bone tissue. Firstly PLGA/sBG and PLGA/NC binary composites and then PLGA/sBG/ NC ternary composites were produced. The morphological structures of obtained tissue scaffolds were examined by Scanning Electron Microscopy (SEM), porosity ratios were calculated and pore diameter distributions were determined. The compression tests stated that PLGA 9/20 sBG/15 NC sample has the highest strength and Young modulus value, which were $15,062 \pm 0,057$ MPa and $0,495 \pm 0,007$ MPa, respectively. It was observed that sBG addition increased the apatite formation besides NC addition increased the hydrolytic degradation. Finally, cell culture studies of ternary scaffolds were performed. The cytotoxic effect was not observed in all samples.

Keywords: Tissue engineering, Polymer synthesis, Tissue scaffolds, Bioactive glass, Nanocellulose

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince benden ilgisini, tecrübelerini esirgemeyen, her zaman beni motive eden ve akademik gelişimimde bana rehberlik eden çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Hande ÇELEBİ'ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca verdikleri fikir ve önerilerle çalışmalarına yön veren değerli tez izleme komitesi üyesi hocalarım Prof. Dr. Aydın DOĞAN ve Prof. Dr. Halil Murat AYDIN'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Hücre çalışmaları için gerekli kemik doku hücresi teminini sağlamamızda yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL'a teşekkür ederim.

Mekanik testlerim için laboratuvar imkanlarından faydalanmamıza izin veren Dr. Öğr. Üyesi Hamed GHORBANPOOR'a teşekkür ederim.

Bozunurluk testleri için inkübatör cihaz kullanımında yardımcı olan hocam Dr. Öğr. Üyesi Suzan BİRAN AY'a teşekkür ederim.

Termal analizler için laboratuvar imkanlarından yararlanmamıza izin veren Prof. Dr. Abdullah Tuğrul SEYHAN'a teşekkür ederim.

Polimer sentezi sırasında uygulanan ısı işlem için yardımcı olan atölye çalışanı Günay MERT'e teşekkür ederim.

Hem deneysel süreçte, hem manevi olarak her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Özge Kurt Pelen'e; doktora sürecim boyunca moral ve desteklerini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Elif Binici, Özlem Başak Özkan, Hakan Kaya' ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım her kararda yanımda olan, benden desteklerini, sevgilerini, ilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen; özellikle doktora öğrenimimde verdikleri moral ve motivasyon ile beni güçlü tutan çok sevgili anneme, babama ve kardeşime; ayrıca bu süreç esnasında doğan ve beni çok mutlu eden yeğenim Bade'ye sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Beyza SARICAOĞLU

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla” tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Beyza SARICAOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	I
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAY SAYFASI	II
DANIŞMAN ONAY SAYFASI.....	III
ÖZET	IV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR SAYFASI	VI
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
TABLolar DİZİNİ	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
GÖRSELLER DİZİNİ	XX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XXI
1. GİRİŞ.....	1
2. BİYOBOZUNUR POLİMERLER	4
2.1. Doğal Biyobozunur Polimerler	6
2.1.1. Biyokütleden elde edilen biyobozunur polimerler	6
2.1.1.1. Polisakkaritler	6
2.1.1.2. Polipeptitler (Proteinler)	11
2.1.2. Mikroorganizma kaynaklı biyobozunur polimerler	13
2.1.2.1. Mikrobiyal polyesterler	13
2.1.2.2. Bakteriyel selüloz	14
2.2. Sentetik Biyobozunur Polimerler.....	15
2.2.1. Alifatik polyesterler	15
2.2.1.1. Polilaktik asit (PLA)	16

2.2.1.2. <i>Poliglikolik asit (PGA)</i>	18
2.2.1.3. <i>Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)</i>	19
2.2.1.4. <i>Polikaprolakton (PCL)</i>	28
2.2.2. <i>Polivinil alkol ve polivinil asetat</i>	29
2.2.2.1. <i>Polivinil alkol (PVA)</i>	29
2.2.2.2. <i>Polivinil asetat (PVAc)</i>	30
3.BİYOSERAMİK MALZEMELER	31
3.1. <i>Biyoaktif Camlar</i>	31
3.1.1. <i>Biyoaktif cam keşfi ve tarihçesi</i>	31
3.1.2. <i>Biyoaktif camların bileşimi</i>	32
3.1.2.1. <i>Silikat bazlı biyoaktif camlar</i>	32
3.1.2.2. <i>Fosfat bazlı biyoaktif camlar</i>	33
3.1.2.3. <i>Borat/borasilikat bazlı biyoaktif camlar</i>	34
3.1.2.4. <i>Katkılı biyoaktif camlar</i>	34
3.1.3. <i>Biyoaktif cam üretimi</i>	34
3.1.3.1. <i>Eriyik söndürme yöntemi</i>	35
3.1.3.2. <i>Sol-jel yöntemi</i>	36
3.1.4. <i>Biyoaktif cam modifikasyonu</i>	36
3.1.4.1. <i>Biyoaktif cam modifikasyonu ile ilgili literatür çalışmaları</i>	37
3.1.5. <i>Biyoaktif camın biyoaktivitesi</i>	38
3.1.6. <i>Doku mühendisliği uygulamalarında biyoaktif cam</i>	40
3.1.7. <i>PLGA/BG doku iskelesi ile ilgili literatür çalışmaları</i>	41
4. NANOSELÜLOZ	44
4.1. <i>Nanoselüloz Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması</i>	44
4.2. <i>Nanoselüloz Hazırlama Teknikleri</i>	47
4.2.1. <i>Yüksek basınçlı homojenizasyon ve mikroakışkanlaştırma</i>	47
4.2.2. <i>Mikro öğütme ve frezeleme</i>	47
4.2.3. <i>Soğuk kırma</i>	47
4.2.4. <i>Elektrospining</i>	48

4.2.5. Asit hidrolizi	48
4.3. Doku Mühendisliği Uygulamalarında Nanoselüloz	49
4.4. Doku Mühendisliğinde Nanoselüloz ile İlgili Literatür Çalışmaları	49
5. DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE DOKU İSKELELERİ	51
5.1. Doku Mühendisliği Tarihçesi ve Gelişimi	51
5.2. Doku İskeleleri	52
5.2.1. Doku iskelesi üretim yöntemleri	54
5.2.1.1. Geleneksel üretim yöntemleri	54
5.2.1.2. Hızlı prototipleme yöntemleri	60
6. KEMİK DOKU	64
6.1. Kemik Oluşumu	65
6.2. Kemik Morfolojisi	66
6.3. Kemik Matrisi	67
6.3.1. Mineral faz	67
6.3.2. Organik faz (Kolajen matris)	68
6.3.3. Kolajen olmayan proteinler	68
6.4. Kemik Hücreleri	69
6.4.1. Osteoblastlar.....	69
6.4.2. Osteoklastlar.....	70
6.4.3. Osteositler.....	70
6.5. Kemik Rejenerasyonu	71
6.6. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyomateryal Skafoldlar	72
7. POLİMERLERİN VE DOKU İSKELELERİNİN KARAKTERİZASYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER	74
7.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi ışın (FTIR) Spektroskopisi	74
7.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)	74
7.3. Termal gravimetrik Analiz (TGA)	75
7.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	75
7.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	76

7.6. Mekanik Testler	76
8. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	78
8.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler	78
8.2. Biyoaktif Cam Modifikasyonu	79
8.3. Poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) Kopolimerinin Sentezi	80
8.4. Çözücü Döküm/Partikül Uzaklaştırma Yöntemi ile Doku İskelesi Hazırlanması.....	82
8.5. Biyoaktif Cam, PLGA ve Üretilen Kompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	84
8.5.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrometresi analizi	84
8.5.2. ¹ H Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrometresi analizi	84
8.5.3. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) analizi	84
8.5.4. Çekme testi	84
8.5.5. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi	85
8.5.6. Termogravimetrik (TGA) analiz	85
8.5.7. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	86
8.5.8. Gözeneklilik hesaplaması	86
8.5.9. Basma testi	86
8.5.10. Apatit oluşumu	87
8.5.11. Hidrolitik bozunma	88
8.5.12. Şişme Testi..	89
8.5.13. Hücre çalışmaları	89
8.5.13.1. <i>Sitotoksikite ve hücre canlılığı analizi</i>	89
9. SONUÇLAR	92
9.1. PLGA, Doku İskeleleri ve Modifiye Biyoaktif Camın FT-IR Analizi	92
9.2. ¹ H NMR Spektrometresi Analizi	96
9.3. GPC Analizi	99
9.4. Çekme Testi	100
9.5. DSC Analizi	101

9.6. TGA Analizi	107
9.7. SEM Analizi	113
9.8. Gözeneklilik Hesaplaması	121
9.9. Basma Testi	123
9.10. Apatit Oluşumu	132
9.11. Hidrolitik Bozunma	138
9.12. Şişme Testi.....	143
9.13. Sitotoksosite ve Hücre Canlılığı Analizi Sonuçları	144
10. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	148
KAYNAKÇA	152
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. PLLA'nın genel özellikleri	17
Tablo 2.2. PGA'nın özellikleri	18
Tablo 2.3. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan bazı ticari PLGA ürünler	23
Tablo 2.4. PCL'nin özellikleri	29
Tablo 3.1. Tipik biyoaktif camların % bileşimleri	32
Tablo 3.2. 45S5 BG bileşimine kıyasla süngerimsi ve kortikal kemiğin mekanik özellikleri.....	40
Tablo 4.1. Nanoselülozun özellikleri	45
Tablo 5.1. Doku iskelesi üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	61
Tablo 6.1. Kompakt ve süngerimsi kemik doku mekanik özellikleri	65
Tablo 8.1. Çalışmada kullanılan malzemelerin özellikleri	78
Tablo 8.2. Hazırlanan doku iskelelerinin farklı kompozisyonları	82
Tablo 8.3. SBF solüsyonu	87
Tablo 8.4. Fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonu	88
Tablo 9.1. Dimer ve PLGA'lara ait karakteristik IR pikleri	93
Tablo 9.2. Saf ve silanlı biyoaktif cama ait karakteristik IR pikleri	94
Tablo 9.3. PLGA 8 için fonksiyonel grup ve karşılık gelen pik aralıkları	97
Tablo 9.4. PLGA 9 için fonksiyonel grup ve karşılık gelen pik aralıkları	98
Tablo 9.5. PLGA kopolimerlerinin gerçek bileşimi için belirlenen sonuçların teorik değerlerle karşılaştırılması	98
Tablo 9.6. PLGA 8 ve PLGA 9 'un molekül ağırlığı ve heterojenlik indeksi sonuçları	100
Tablo 9.7. Çekme testi sonuçları	101
Tablo 9.8. İkili ve üçlü doku iskeleleri için T_g değerleri	106
Tablo 9.9. Doku iskelelerinin T_{onset} ve T_{max} .değerleri	112
Tablo 9.10. İkili doku iskeleleri için % gözeneklilik değerleri	122
Tablo 9.11. Üçlü doku iskeleleri için % gözeneklilik değerleri	123
Tablo 9.12. Biyoaktif cam katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülü değerleri	126

Tablo 9.13. Nanoselüloz katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülü değerleri	127
Tablo 9.14. Üçlü doku iskelelerinin bozunma öncesi ve sonrası basma dayanım değerleri	130
Tablo 9.15. Üçlü doku iskelelerinin bozunma öncesi ve sonrası Young modülü değerleri.....	131



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Biyobozunur polimerlerin sınıflandırılması	5
Şekil 2.2. Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı	7
Şekil 2.3. Selülozun kimyasal yapısı	7
Şekil 2.4. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı	10
Şekil 2.5. Aljinat kimyasal yapısı	11
Şekil 2.6. Polihidroksialkanoat kimyasal yapısı	14
Şekil 2.7. Bakteriyel selülozun hidrojen molekül içi ve intramoleküler hidrojen bağları	15
Şekil 2.8. Laktik asitin izomerleri	16
Şekil 2.9. PLA kimyasal yapısı	17
Şekil 2.10. PGA'nın kimyasal yapısı	18
Şekil 2.11. PLGA'nın kondenzasyon polimerizasyonu	19
Şekil 2.12. PLGA'nın halka açılma polimerizasyonu	20
Şekil 2.13. Doku mühendisliği metot şeması (1) hücreler hastadan alınır (2) hücre kültürü (3) hücrelerin iskeleye inkübasyonu (4) iskele içerisinde hücre kültürü (5) yaralı bölgeye implantasyon.....	21
Şekil 2.14. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı	21
Şekil 2.15. (a) Hidroksiapatit (HA)/PLGA (b) tavşan önkol kemiğinden kemik parçası (c) tavşan ön kol kemiğindeki hasarlı bölge (d) doku iskelesinin hasarlı bölgeye implantasyonu.....	22
Şekil 2.16. (a) İmplantlı bölge (b) PLGA membran yerleştirilmesi (c)PLGA kaplı kemiğe soğrulabilir iki pin yerleştirilmesi (d) 6 ay sonra implant yüksekliğindeki hataların azalması(E,F)kökler arası bölgedeki derinliğin azalması.....	22
Şekil 2.17. Polikaprolakton kimyasal yapısı	28
Şekil 2.18. PVA kimyasal yapısı	30
Şekil 2.19. PVAc kimyasal yapısı	30
Şekil 3.1. 45S5 Biyoaktif camın kimyasal yapısı	31
Şekil 3.2. P-O-P köprüleri aracılığıyla bağlı tetrahedron yapıya dayalı fosfat bazlı bir cam ağı	33

Şekil 3.3. Biyoaktif cam sentez yöntemleri	35
Şekil 3.4. APTES ile BG yüzey modifikasyonu prosesi	36
Şekil 3.5. Vücut sıvılarıyla temas halinde olan biyoaktif bir camın yüzeyinde hidroksikarbonat apatit (HCA) oluşum mekanizması	39
Şekil 4.1. Nanokristalin selüloz TEM görüntüsü	44
Şekil 4.2. Nanofibrillenmiş selüloz elde etmek için tanımlanan klasik işlem	46
Şekil 4.3. Bakteriyel nanoselüloz TEM görüntüsü	46
Şekil 4.4. Soğuk kırma tekniği ile nanoselüloz üretimi	47
Şekil 4.5. Asit hidrolizi ile nanoselüloz eldesi	48
Şekil 5.1. Çözücü döküm/partikül uzaklaştırma yöntemi	55
Şekil 5.2. Dondurarak kurutma	56
Şekil 5.3. Gazla köpüklendirme	57
Şekil 5.4. Elektrosponing deney düzeneği	58
Şekil 5.5. Isıl İndükleme ile Faz Ayrımı (TIPS)	60
Şekil 6.1. Kompakt ve süngerimsi kemik doku yapıları	65
Şekil 6.2. Kemik anatomisi	67
Şekil 6.3. Kemik hücreleri	69
Şekil 6.4. Kemik oluşumu sonrası osteblastların dönüşümü	70
Şekil 6.5. Kırık kemik iyileşme süreci	72
Şekil 6.6. Tipik kemik dokusu mühendisliği yaklaşımı	73
Şekil 7.1. Termoplastik bir polimer için gerilim-gerinim eğrisi	77
Şekil 7.2. Numunelere uygulanan çekme ve basma kuvvetleri ile boyutlarındaki değişim	76
Şekil 8.1. Biyoaktif camın modifikasyonu için deney aşamaları	79
Şekil 8.2. Doku iskelesi üretimi şematik gösterimi	83
Şekil 8.3. ISO 527-5A standardına göre numune boyutları (mm cinsinden).....	85
Şekil 9.1. Dimerler ve polimerlerin FT-IR spektrumu	92
Şekil 9.2. Saf ve silanlı biyoaktif cama ait FT-IR spektrumu	94
Şekil 9.3. PLGA 9 ve PLGA 9/ sBG ve PLGA 9/NC doku iskelelerinin FTIR spektrumu	95
Şekil 9.4. PLGA 9 ve PLGA9/20 sBG/15 NC doku iskelesinin FTIR spektrumu	96
Şekil 9.5. PLGA 8'e ait NMR spektrumu	97

Şekil 9.6. PLGA 9'a ait NMR spektrumu	97
Şekil 9.7. PLGA kopolimerlerine ait Gerilme-Gerinim eğrisi	100
Şekil 9.8. PLGA 8 ve PLGA 9 a ait DSC birinci ısıtma eğrisi	102
Şekil 9.9. PLGA 8 ve PLGA 9 a ait DSC soğutma eğrisi.....	102
Şekil 9.10. PLGA 8 ve PLGA 9 a ait DSC ikinci ısıtma eğrisi.....	103
Şekil 9.11. PLGA 8 ve PLGA 8/sBG doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi	104
Şekil 9.12. PLGA 9 ve PLGA 9/sBG doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi	104
Şekil 9.13. PLGA 8 ve PLGA 8/NC doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi	105
Şekil 9.14. PLGA 9 ve PLGA 9/NC doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi	105
Şekil 9.15. PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi.....	106
Şekil 9.16. PLGA 8 ve PLGA 9'a ait TGA termogramı	108
Şekil 9.17. PLGA 8 ve PLGA 9'a ait DTA termogramı	108
Şekil 9.18. PLGA 9/sBG numunelerinin TGA termogramı.....	109
Şekil 9.19. PLGA 9/s BG doku iskelelerine ait DTA termogramı	109
Şekil 9.20. PLGA 9/NC numunelerinin TGA termogramları	110
Şekil 9.21. PLGA 9/NC doku iskelelerine ait DTA termogramı	111
Şekil 9.22. PLGA 9/s BG/NC numunelerinin TGA termogramları	111
Şekil 9.23. PLGA 9/s BG/NC numunelerinin DTA termogramları	112
Şekil 9.24. s-Biyoaktif cama ait SEM mikrografı (200X ve 1000X)	113
Şekil 9.25. PLGA 8 (a) ve PLGA 9 doku iskeleleri (b) ait SEM mikroagrafları (100X).....	114
Şekil 9.26. PLGA 8/sBG SEM mikroagrafları (100X) (a) %5 sBG katkılı (b) %10 sBG katkılı (c) %15 sBG katkılı (d) %20 sBG katkılı	114
Şekil 9.27. PLGA 9/sBG SEM mikroagrafları (100X) (a) %5 sBG katkılı (b) %10 sBG katkılı (c) %15 sBG katkılı (d) %20 sBG katkılı.....	115
Şekil 9.28. PLGA 8/NC SEM mikroagrafları (50X) (a) %5 NC katkılı (b) %10 NC katkılı (c) %15 NC katkılı	116
Şekil 9.29. PLGA 9/NC SEM mikroagrafları (50X) (a) %5 NC katkılı (b) %10 NC katkılı (c) %15 NC katkılı	116

Şekil 9.30. Üçlü doku iskeleleri SEM mikrografları (50X) (a) PLGA 9/10 sBG/15 NC (b) PLGA 9/10 sBG/5 NC (c) PLGA 9/ 20 sBG/5 NC (d) PLGA 9/ 20 sBG/ 15 NC (50X ve 500X)	117
Şekil 9.31. PLGA 8/sBG doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı	119
Şekil 9.32. PLGA 9/sBG doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı	119
Şekil 9.33. PLGA 8/NC doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı	120
Şekil 9.34. PLGA 9/NC doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı	120
Şekil 9.35. PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı	121
Şekil 9.36. İkili doku iskelelerinin % gözeneklilik değerleri	122
Şekil 9.37. Üçlü doku iskelelerinin % gözeneklilik değerleri	122
Şekil 9.38. PLGA 8/sBG katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülleri.....	125
Şekil 9.39. PLGA 9/sBG katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülleri.....	125
Şekil 9.40. PLGA 8/NC katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülleri.....	126
Şekil 9.41. PLGA 9/NC katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülleri.....	127
Şekil 9.42. Üçlü doku iskelelerinin gerilme-gerinim eğrisi	129
Şekil 9.43. Üçlü doku iskelelerinin bozunma öncesi ve sonrası basma dayanımları...	130
Şekil 9.44. Üçlü doku iskelelerinin bozunma öncesi ve sonrası Young modülleri.....	131
Şekil 9.45. İkili doku iskelelerinin 3, 7 ve 14 günlük SEM mikrografları (20000)X (a) PLGA8/5 sBG (b) PLGA 8/10s BG (c) PLGA 8/15 sBG (d) PLGA 8/20 sBG	133
Şekil 9.46. İkili doku iskelelerinin 3, 7 ve 14 günlük SEM mikrografları (20000)X (a) PLGA 9/5 sBG (b) PLGA 9/10s BG (c) PLGA 9/15 sBG (d) PLGA 8/20 sBG.....	134
Şekil 9.47. PLGA/NC doku iskelelerinin 14 günlük SEM mikrografları (5000)X (a) PLGA 8/15 NC (b)PLGA 9/15 NC	135
Şekil 9.48. PLGA 8/sBG doku iskelelerinin Ca/P oranları	136
Şekil 9.49. PLGA 9/sBG doku iskelelerinin Ca/P oranları	136

Şekil 9.50. Üçlü doku iskelelerinin 3, 7 ve 14 günlük SEM mikrografları (20000)X	
(a) PLGA9/10 sBG/15 NC (b) PLGA 9/10s BG/5 NC (c) PLGA 9/20 sBG/5 NC (d) PLGA 9/20 sBG/ 15NC	137
Şekil 9.51. Üçlü doku iskelelerinin Ca/P oranları	138
Şekil 9.52. PLGA 8/sBG doku iskelelerinin bozunurluk grafiği	140
Şekil 9.53. PLGA 9/sBG doku iskelelerinin bozunurluk grafiği	140
Şekil 9.54. PLGA 8/NC doku iskelelerinin bozunurluk grafiği	141
Şekil 9.55. PLGA 9/NC doku iskelelerinin bozunurluk grafiği	141
Şekil 9.56. PLGA 9 ve PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin bozunurluk grafiği	142
Şekil 9.57. PLGA 9 ve Üçlü doku iskelelerin pH değişim grafiği	143
Şekil 9.58. PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin şişme derecesi grafiği	144
Şekil 9.59. Üçlü doku iskelelerinin h.FOB hücre hattı ile 24 saatlik süre sonundaki sitotoksosite sonucu hücre canlılıkları	145
Şekil 9.60. Üçlü doku iskelelerinin h.FOB hücre hattı ile 72 saatlik süre sonundaki sitotoksosite sonucu hücre canlılıkları	145
Şekil 9.61. Üçlü doku iskelelerinin L929 hücre hattı ile 72 saatlik süre sonundaki sitotoksosite sonucu hücre canlılıkları.....	146
Şekil 9.62. Numunelerin floresan mikroskop görüntüleri (a) PLGA 9/10 sBG/15 NC (b) PLGA 9/20 sBG/15 NC.....	147

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 8.1. Dimer saflaştırma deney düzeneği	80
Görsel 8.2. (a)Tuzaklı vakum pompası (b)Polimer sentezinde kullanılan cam reaktör..	81
Görsel 8.3. PLGA kopolimeri (a) polimerizasyon sonrası (b) saflaştırma işlemi sonrası	82
Görsel 8.4. (a) Çekme testi cihazı (b) dog bone şeklindeki numune	85
Görsel 8.5. Basma testi düzeneği	87
Görsel 8.6. (a) Solüsyon içindeki numuneler (b) inkübatör cihazı	88
Görsel 9.1. Doku iskelesinin basma testi uygulanmadan önceki ve sonraki görüntüsü	124
Görsel 9.2. Üçlü doku iskelelerinin 3 hafta boyunca çekilen görüntüleri (a) PLGA 9/10 sBG/15 NC (b) PLGA 9/20 s BG/15 NC (c) PLGA 9/10 sBG/5 NC (d) PLGA 9/20 s BG/5 NC	129

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PLGA	: Poli(laktik-ko-glikolik) asit
PLA	: Polilaktik asit
PGA	: Poliglikolik asit
LA	: Laktik asit
GA	: Glikolik asit
L	: Laktit
G	: Glikolit
HCA	: Hidroksikarbonapatit
HA	: Hidroksiapatit
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
sBG	: Silanlı Biyoaktif cam
NC	: Nanoselüloz
CNF	: Selüloz nanofibril
ECM	: Hücre dışı matris
kDa	: Kilodalton
PHA	: Polihidroksialkanoat
PHB	: Poli-3-hidroksibutirat
PCL	: Polikaprolakton
BC	: Bakteriyel selüloz
ROP	: Halka Açma Polimerizasyonu
PEG	: Polietilen glikol
PVOH	: Polivinil Alkol
PVA	: Polivinil Asetat
APTES	: 3-Aminopropiltrietoksisilan
H.I.	: Heterojenlik İndeksi
MSC	: Mezenkimal Kök Hücresi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi ışın (FTIR) Spektroskopisi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
TGA	: Termal gravimetrik Analiz
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu

GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
SBF	: Simüle Vücut Sıvısı
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
hFOB 1.19	: İnsan Fetal Osteoblast Hücresi
FBS	: Fetal Bovin Serum



1.GİRİŞ

Plastiklerin çevreye verdiği zararlardan dolayı biyobozunur malzemelerin kullanımı günümüzde tercih edilmekte ve özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla birçok çalışma yürütülmeye devam etmektedir. Biyobozunur polimerler özellikle biyomedikal uygulamalarda tercih edilmektedir. Gerek ilaç taşınım sistemlerinde gerekse diğer doku mühendisliği uygulamalarında vücut içine alınan polimerin herhangi bir cerrahi müdahale gerektirmeden kendiliğinden bozunması önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada kullanılan polimer olan poli (laktik-ko-glikolik-asit) (PLGA) biyoteknoloji ürünü, polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asit (PGA) polimerlerinden oluşan biyobozunur bir kopolimerdir. PLGA kopolimerinin elde edilmesinde glikolik ile L-laktik veya DL-laktik kullanılarak kopolimerizasyon yapmak mümkündür (Derman vd., 2013). PLGA biyomedikal uygulamalar için nanolif yapılı iskelelerin üretiminde de kullanılmaktadır. PLGA tamamen esnektir, farklı boyutlarda ve şekillerde üretmek için uygundur. PLGA; etil asetat, klorlu çözücüler, tetrahidrofuran ve aseton gibi çeşitli çözücüler içinde çözünebilir (Puppi vd., 2011).

PLGA'nın uygulama alanlarına bakıldığında, gösterdiği biyoyumluluk ve biyobozunurluk yönleriyle özellikle biyomedikal alanda kullanıldığı görülmektedir. % 70'ten az laktik asit içeren PLGA'nın yapısının genel olarak amorf olduğu söylenebilir. Dolayısıyla bu amorf yapı polimere düşük mekanik dayanım sağladığı için ilaç salınımında kullanmak için daha uygundur. Kristalin yapı mekanik olarak daha dayanıklı olduğu için cerrahi dikiş ipliği, kemik sabitleyici ve doku iskelesi olarak kullanımı uygundur.

Bir başka özellik sudaki çözünürlüğü olup, bu özellik PLGA'nın içerdiği monomer oranına bağlı değişkenlik gösterir. Laktik asit oranı yüksek olan PLGA hidrofobik özellik, glikolik asit oranı yüksek olan PLGA hidrofilik özellik gösterir. Buna bağlı olarak suda çözünen ve suda çözünmeyen ilaçların taşınımında kullanımı tercih edilmektedir. İlacın türü PLGA tabanlı ilaç taşınım sistemlerinin ve çözücülerin hazırlanma tekniğini belirlemektedir. PLGA'nın diğer bir özelliği olan biyoyumluluğa bakıldığında, yapılan laboratuvar çalışmaları polimerin lif, kemik ve ilik dokularıyla hiçbir zararlı yan etki olmadan uyum sağladığını göstermiştir.

Laboratuvar ortamında farelerin sırt bölgelerindeki kıvrımlı yapıya yerleştirilen polimerin damarlı dokuda büyüme sağlayıp iyileşme gösterdiği kanıtlanmıştır. Bir başka örnek olarak, yapılan in vitro çalışmalarda PLGA doku iskelesinin insanda diş eti bağ doku hücrelerinin çoğalmasını desteklediği ve hücrelerde farklılaşmaya sebep olduğu görülmüştür. Kontrollü bir bozunma süreci, vücuda implante edilecek biyomalzemeler için kilit bir faktördür. Bozunabilen malzemeler yeni dokuların oluşumu için yer açacak ve taşınan hücrelerin çevre dokularla bütünleşmesine izin verecektir. PLGA'nın bozunma süresi içeriğindeki monomer oranına (LA:GA) bağlı olarak değişmektedir. Yüksek glikolik asit içerikli polimer hidrofilik yapıda olacağından daha kısa sürede bozunmaktadır. Örneğin % 50 LA ve %50 GA içeren PLGA'nın ortalama bozunma süresi 1-2 aydır ve bu oranlarda hazırlanan polimer sıklıkla periodontal uygulamalarda tercih edilmektedir (Sun vd., 2017).

Polimer kompozitlere katkı maddesi olarak eklenen biyoseramik bir malzeme olan ve bu çalışmada kullanılan biyoaktif cam yapısına baktığımızda, yüzeyinin dokular ile bağ oluşumunu sağlayan, biyoaktif hidroksikarbonapatit (HCA) tabakasından oluştuğu görülmektedir. Bu özellik sayesinde, biyoaktif camlar vücutta sert dokuya ya da yumuşak dokuya bağlanabilmektedir. Doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılan biyoaktif cam formülü genel olarak 45S5 olarak bilinmektedir ve FDA tarafından onaylıdır. Bu yapı ağırlıkça %45 SiO₂, %24,5 Na₂O ve %24,5 CaO ve %6 P₂O₅ içermektedir. Biyoaktif camların en büyük avantajı, kolay doku bağlanmasına olanak tanıyan yüzey reaksiyon hızının yüksek olmasıdır (http-1). Hem kemiğe hem de yumuşak dokulara bağlanma özelliği vardır. Doğada biyoaktif olması nedeniyle ortopedik uygulamalarda büyük potansiyele sahip allogreftlere (aynı türde fakat genetik olarak farklı iki kişi arasında yapılan doku transferi) en uygun alternatif olarak görülmektedir. Biyoaktif cam, doğal kemik yapısına benzer bir apatit tabakasının vücut sıvısı içinde çözünmesini sağlar, böylelikle doğal kemik ile vücuda implante edilen doku iskelesi arasında ara yüzey bağına izin veren osteogeneziyi uyarır. Kemik benzeri apatit tabakasının oluşumunu teşvik ettiği için ortopedik uygulamalarda kullanımı uygundur (Mulchandani ve Katiyar, 2019).

Bu çalışmada kullanılan olan diğer katkı maddesi nanoselüloz (NC) geniş bir yüzey alanına sahiptir ve bu sayede takviye edici özelliği bulunmaktadır. Nanoselüloz, nano ölçekte (1-100 nm) boyutu olan selüloz molekülleri olarak tanımlanmaktadır.

Selüloz polimerindeki mikro ve nano lifler selülozun temel yapısal birimini oluşturur ve bu birimler onlarca zincirden oluşarak selüloz fibril adı verilen kristal ve amorf yapıdaki düz zincirin oluşmasını sağlar. Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler, nanoselülozu selülozdan daha çekici bir araştırma konusu haline getirmiştir. Nanoselülozun bu kadar ilgi çekmesinin ana nedeni, gelişmiş fizikokimyasal ve mekanik özelliklere ve kristalliğe sahip tek tip bir malzemenin, selüloz lifinin boyutunun, küçültülmesiyle oluşturulabilmesidir.

Nanoselüloz, biyolojik olarak parçalanabilirlik, düşük yoğunluk ve toksik olmama, mekanik ve termal kararlılık, uzun ömürlü yapı gibi belirli özelliklere sahiptir. Sahip olduğu yüksek mekanik dayanım ve çevresel sürdürülebilirlik gibi özelliklerden dolayı biyomalzemelerin mekanik özelliklerini artırmak için tercih edilmektedir. Nanoselülozik malzemeler nanofibrillenmiş selüloz, nanokristaller ve nanopartiküller olmak üzere üç ana gruba ayrılmıştır. Her üç nanoselüloz türünün de kimyasal bileşimleri benzerdir fakat farklı derecelerde kristallik, parçacık boyutu ve morfolojik özelliklere sahiptirler. Geçtiğimiz birkaç yıl içinde NC doku mühendisliği, doku iskeleleri de dahil olmak üzere birçok tıbbi uygulamaya araştırma konusu olmuştur (Kaur vd., 2021). Genellikle poli-laktik asit (PLA), polibütilen süksinat (PBS), kitosan ve nişasta ile kompozitler oluşturularak doku iskelesi üretiminde kullanılmaktadır.

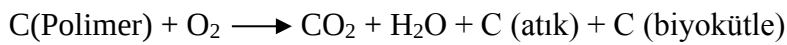
Bu tez çalışmasında, her iki katkı maddesi de hem mekanik özellikleri hem de biyouyumluluğu geliştirebilmek amacıyla polimere eklenmiştir. PLGA/sBG ve PLGA/NC şeklinde ikili veya farklı oranlarda üçlü (PLGA/sBG/NC) bileşen kullanılarak da kompozitler hazırlanmıştır. İnsan vücudunda bulunan hücre dışı matrisler (ECM), hücreler arasındaki boşlukları dolduran, hücreleri birbirine bağlayan ve destekleyen yapılardır. Doku iskeleleri de bu hücreler arası boşlukları taklit edecek şekilde tasarlanan yapılardır. Bu çalışmada üretilecek polimer kompozitler doku iskelesi olarak kullanılacağı için gözenekli bir yapıda olmaları istenmektedir (Roseti vd., 2017). Ayrıca vücutla uyumlu olması ve mekanik dayanımının da yeterli olması beklenmektedir. Literatürde biyoaktif camın doku iskelesi üretiminde kullanımına yönelik çalışmalar olmasına rağmen nanoselüloz ve PLGA kullanılarak doku iskelesi üretimi yapılan çalışma bulunmamaktadır. PLGA/NC ve PLGA/sBG/NC kompozitlerinin de çalışmada üretilmesi ve özelliklerinin incelenmesi çalışmaya özgünlük katmaktadır.

2. BİYOBOZUNUR POLİMERLER

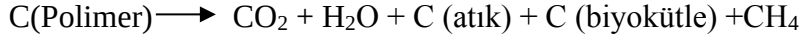
Son yıllarda tüm dünyada artan sentetik polimer kullanımının neden olduğu çevre kirliliği tehlikeli boyutlara ulaşmıştır. Petrol türevli plastik malzemeler doğada biyolojik olarak kolayca parçalanamaz ve mikrobiyal bozulmaya karşı uzun yıllar direnç gösterdikleri için çevrede birikerek kirliliğe sebep olurlar. Ayrıca dünyada sınırlı petrol kaynağı bulunması ve son zamanlarda petrol fiyatlarının artması biyobozunur polimerlere olan ilginin artmasını sağlamıştır. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ilk olarak 1980'li yıllarda bilim dünyası tarafından tanıtılmaya başlanmıştır (Ghanbarzadeh ve Almasi,2013). Biyobozunur kavramı araştırmacılar tarafından farklı şekillerde tanımlanmıştır. Armentano ve arkadaşları doğal ortamda, mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlar ile CO₂ ve H₂O gibi basit moleküllere dönüşebilen malzemeler olarak; Singh yeşil bitki, hayvan ve bakteriler tarafından, yaşam döngüsü esnasında doğal yollarla üretilen malzemeler olarak tanımlamışlardır (Çelebi ve Karagöz, 2019). Biyobozunma, canlı organizmaların yapılarında bulunan enzimler ve bu enzimlerin sebep olduğu kimyasal bozulmalar sonucunda gerçekleşir. Biyobozunurluk sadece polimerin kimyasal yapısına ve çevresel koşullara bağlıdır. (Vroman ve Tighzert, 2009).

Polimerlerde bozunma olayı hücre dışı ve hücre içi olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. Hücre dışı parçalanmada polimer, aerobik ya da anaerobik koşullar altında mikroorganizmaların ürettiği enzimlerce katalizlenen tepkimeler ile bozunmaya uğrar. Endoenzimler polimer zincirindeki tekrarlayan birimlerden başlayarak parçalar, bu sayede polimerin molekül ağırlığında azalma başlar. Ekzoenzimler ise, polimer molekülünü uç birimlerinden başlayarak parçalar, bu da bozunmanın daha yavaş ilerlemesine neden olur. Hücre içi parçalanmada ise, hücre içine girebilecek kadar küçülmüş oligomerler mineralize edilir. Mineralizasyon ile CO₂, CH₄, N₂ gibi gazlar, H₂O, tuzlar, mineraller ile organik atıklar açığa çıkar. Aerobik ve anaerobik bozunmanın kimyasal reaksiyonları aşağıdaki denklemlerde gösterildiği gibidir (https-2).

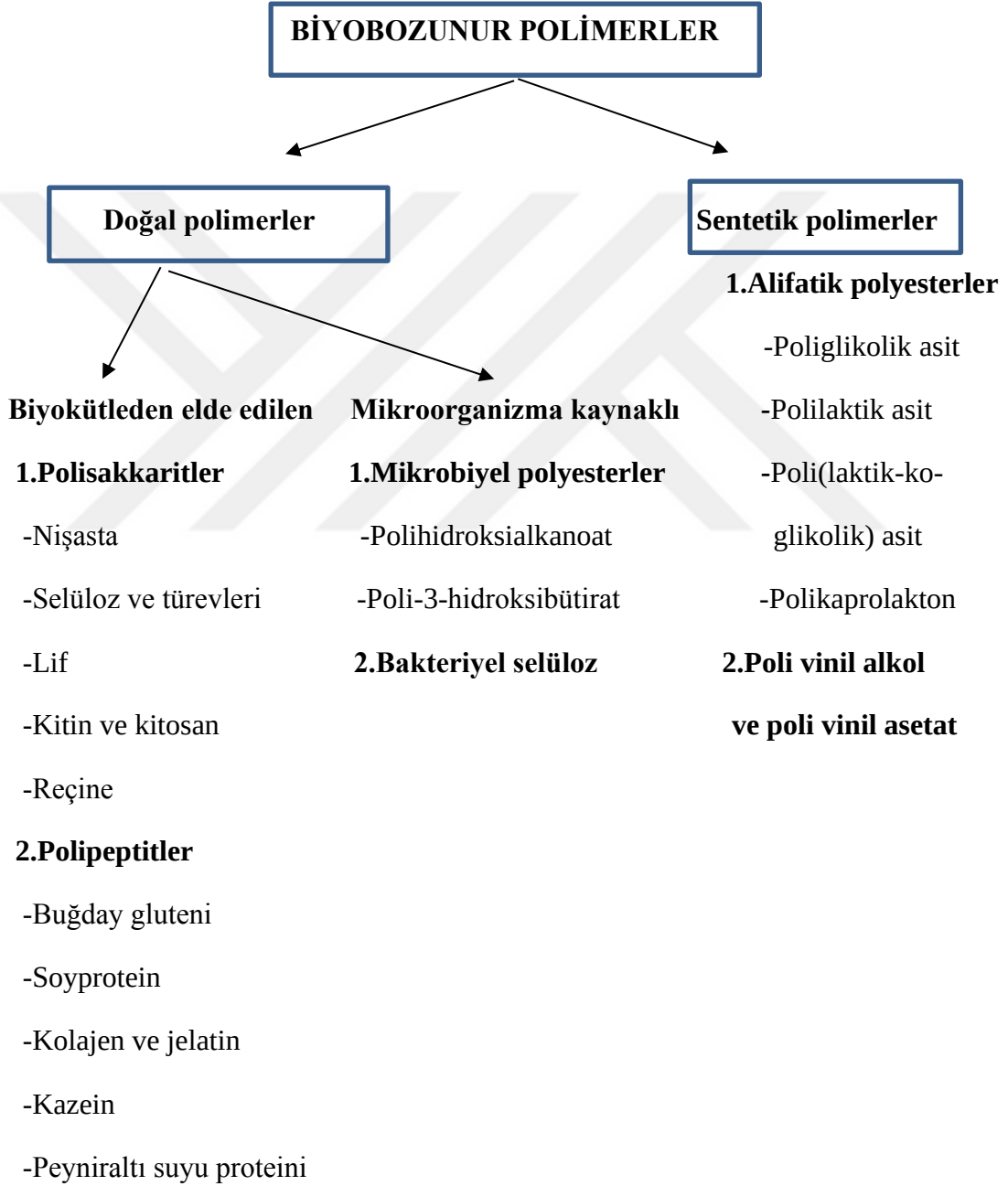
Aerobik biyobozunma:



Anaerobik biyobozunma:



Biyobozunur polimerler, kimyasal yapıları, elde edildikleri kaynak ve sentez yöntemleri gibi çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Şekil 2.1’de bu sınıflandırılma görülmektedir.



Şekil 2.1. Biyobozunur polimerlerin sınıflandırılması (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013)

2.1. Doğal Biyobozunur Polimerler

Doğal biyobozunur polimerler genellikle doğadaki tüm canlı organizmalar tarafından üretilir. Doğal ortamda üretildikleri için süreç yavaş olsa bile biyolojik olarak parçalanabilir oldukları için yenilenebilir enerji kaynaklarından birini temsil ederler (Nayak, 1999).

Bu polimerlerin sentezleri enzim katalizörlüğünde, aktive monomerlerin zincir büyüme polimerizasyon reaksiyonlarını içerir ve bunlar hücreler içinde karmaşık metabolik işlemlerle oluşturulur (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013). Doğal biyopolimerler biyokütleden elde edilen ve mikroorganizma kaynaklı olmak üzere 2'ye ayrılır.

2.1.1. Biyokütleden elde edilen biyobozunur polimerler

2.1.1.1. Polisakkaritler

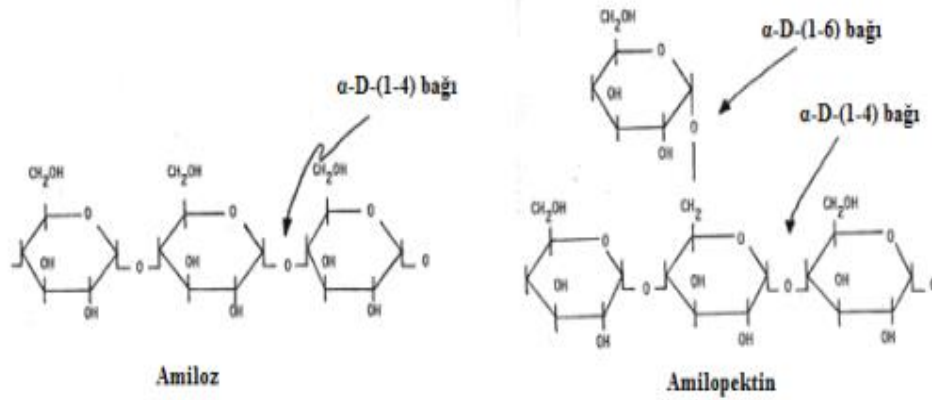
Malzeme uygulamaları için, ilgi duyulan başlıca polisakkaritler selüloz ve nişastadır, ancak üretilen daha karmaşık karbonhidrat esaslı polimerler de son yıllarda çalışmalara konu olmuştur.

Nişasta

Bol miktarda bulunan ve biyolojik olarak parçalanabilen en ucuz hidrokolloid biyopolimerdir. Nişasta, temel olarak patates, mısır, buğday ve pirinç gibi tarımsal bitki kaynaklı olup granüller şeklinde üretilir (Vroman ve Tighzert, 2009). Nişasta granülü esas olarak iki temel polisakkarit olan amiloz ve amilopektin ile daha düşük miktarda lipidler ve proteinler gibi bazı küçük bileşenlerden oluşur (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013).

Amiloz, α -(1,4) bağları ile bağlanmış D-glukopiranozil birimlerinden oluşan lineer ve kristalin bir moleküldür. Amiloz nişastanın suyu absorpsiyonunda, şişme ve jelatinize olmasında etkilidir (Çelebi ve Karagöz, 2019). Genel olarak, amiloz moleküllerinin molekül ağırlıkları 10^5 ila 10^6 g/mol arasında değişmektedir (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013).

Amilopektin, yapısında α -(1,4) ve α -(1,6) bağları ile bağlanmış D-glukopiranozil birimlerinden oluşan, dallanmış ve amorf yapısı ile nişastayı oluşturan en büyük bileşendir (Vroman ve Tighzert, 2009). Molekül ağırlığı 10^6 ila 10^8 g/mol arasında değişkenlik göstermektedir (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013). Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapıları Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



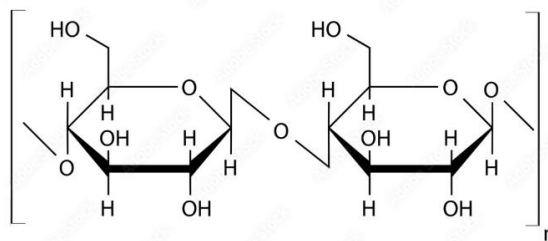
Şekil 2.2. Amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı

Nişasta genellikle termoplastik olarak kullanılır. Belirli miktarlarda su veya plastikleştirici varlığında, ısı yoluyla plastikleştirilir ve daha sonra ekstrüde edilir. Ekstrüzyon işlemi sonrası elde edilen nişastanın özellikleri yapısındaki su ve neme bağlıdır. Termoplastik veya plastikleştirilmiş nişasta, belirli uygulamalarda kullanılan sentetik polimerlere bir alternatif sunar ve nişasta bazlı kompozit üretiminde kullanılabilir.

Nişastanın biyobozunurluğu enzimler tarafından asetal bağların hidrolizi yoluyla sağlanır. α -1,4 bağı amilazlar tarafından, α -1,6 bağı glukozidazlar tarafından parçalanır. Bozunma ürünleri toksik değildir (Vroman ve Tighzert, 2009).

Selüloz ve türevleri

Selüloz, bitkiler tarafından üretilen, tekrarlayan bir birim olan selobiyozun çok uzun makromoleküler zincirlerine sahip doğrusal bir polisakkarittir. Selüloz, dallanmamış β -1,4 bağlantılı D-glukopiranozilin tekrarlanan birimlerinden oluşan bir polimer zinciridir. Selüloz kristalin yapıdadır dolayısıyla kolay bozunmaz ve organik çözücülerde çözünmez (Vroman ve Tighzert, 2009). Şekil 2.3'te selülozun kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.3. Selülozun kimyasal yapısı

Selüloz bitkilerin hücre duvarının esas bileşenini oluşturur ve sahip olduğu içerik bitkinin yetiştirme ortamına, türüne, konumuna, büyüme koşullarına ve olgunluğuna bağlı olarak değişir. Lignoselülozik malzemelerde selüloz; hemisellülozlar, ligninler ve diğer karbonhidrat polimerlerinden oluşan bir jel matrisine gömülü olarak bulunur (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013). Selülozun biyolojik bozunması, mantarlar tarafından salgılanan peroksidaz ile enzimatik oksidasyon ile ilerler ve ayrıca bakteriler tarafından da parçalanabilir. Ancak biyolojik olarak parçalanma süreci karmaşıktır, çünkü selüloz lignin ile birlikte bulunur, bozunma ürünleri toksik değildir (Vroman ve Tighzert, 2009).

Selüloz kullanılan başlıca uygulamalar kağıt, ağaç ürünleri, tekstil, film ve elyaf endüstrileridir. Biyoyakıt üretim kaynağı olarak da büyük ilgi görmüş ve kullanılmaya başlanmıştır (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013). Selüloz türevlerine bakıldığında, selüloz asetat, selüloz sülfat, selüloz nitrat, karboksimetil selüloz, etil ve metil selüloz, nanoselüloz olarak gruplara ayrıldığını görebiliriz.

Selüloz asetat: Selüloz asetat tarım yan ürünlerinden elde edilebilen, elverişli mekanik özelliklere sahip, suda çözünmeyen bir selüloz türevidir. Biyobozunurluk, biyoyumumluluk ve toksik olmama gibi sahip olduğu diğer özellikleri onu biyomedikal kullanımlar (adsorpsiyon, ayırma, biyolojilama, doku rejenerasyonu, ilaç taşınımı) için bir alternatif haline getirmiştir (Liu vd., 2021).

Selüloz sülfat: Heterojen, homojen veya yarı homojen sülfatlama prosedürleriyle elde edilebilen bir selüloz esteridir. Antibakteriyeldir ve suda yüksek konsantrasyonlarda çözünmektedir (Liu vd., 2021).

Selüloz nitrat (Nitroselüloz): Odun veya pamuk yapısında bulunan linter (tohum üzerindeki kısa tüyler) hamurundan elde edilen selülozun nitrik asit ve benzeri kimyasallarla nitratlanması işlemiyle üretilir. Nitroselüloz uygulamaları büyük ölçüde nitrojen yüzdesine bağlıdır. Azot yüzdeleri %12,6 ile %13,3 arasında olan nitroselüloz, patlayıcı olarak sınıflandırılır, %12,6'nın altında nitrojen içeriğinde ise iyi biyoyumumluluk özelliği ile biyomedikal uygulamalar için uygun kabul edilir (Liu vd., 2021).

Karboksimetil selüloz: Karboksimetil selüloz, ilaç ve gıda sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve aynı zamanda film oluşturma özelliklerine sahiptir. Karboksimetil selüloz esaslı üretilen filmler çok etkili bir oksijen, karbon dioksit ve lipid bariyeri işlevi görür (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013).

Etil ve metil selüloz: Etil selüloz, alkali selülozun etil klorür ile tepkimesi sonucu elde edilen selülozik bir eterdir. Suda çözünmez ancak etanol, metanol, toluen, kloroform, etil asetat gibi çeşitli organik çözücülerde çözünür. Metil selüloz ise alkali selülozun metil klorür ile tepkimesi sonucu elde edilen bir metil esterdir (Liu vd., 2021).

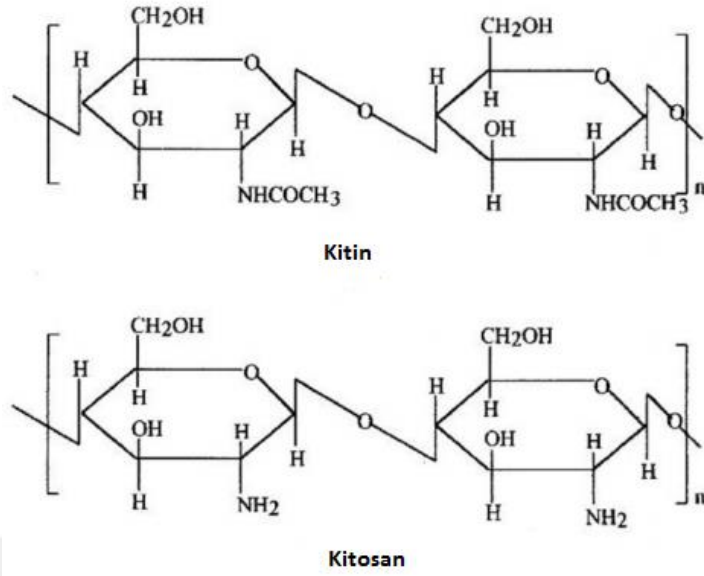
Nanoselüloz: Bitkilerin hücre duvarından elde edilen doğal bir nanomalzemedir. Nano boyutundan dolayı, yüksek yüzey alanı, yüksek sertlik (~ 220 GPa elastik modülüne kadar) ve yüksek mukavemet (~ 10 GPa), düşük yoğunluk ($\sim 1,6$ g/cm³) gibi özelliklere sahip olduğu için biyobozunur bir malzeme olarak kabul edilir (Liu vd., 2021).

Lifler

Doğal lifler, bitki, hayvan ve mineral gibi kaynaklardan elde edilirler ve bu şekilde sınıflandırılırlar. Bitkisel liflerin esas bileşeni selülozdur ve örnekler arasında pamuk, keten, rami, sisal ve kenevir bulunur. Selüloz liflerinin en yaygın kullanıldığı alanlar kağıt ve kumaş imalatıdır (Chandramohan ve Marimuthu, 2011).

Kitin ve kitosan

Doğada bol miktarda bulunan bir mukopolisakkarit ve kabukluların, böceklerin vb. destekleyici malzemesi olan kitinin, β -1,4 bağlantısı yoluyla 2-asetamido-2-deoksi- β -d-glikozdan oluştuğu bilinmektedir. Kitin, kitinaz enzimi tarafından parçalanabilir. Düşük kimyasal reaktivitesi ve organik çözücülerde büyük ölçüde çözünmeyen yapısıyla selüloz ile benzer özellikte olan bir malzemedir. Kitin yapı itibarıyla beyaz, sert, elastik olmayan, azotlu bir polisakkarittir. Kitosan, kitinin N-deasetillenmiş bir türevidir. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



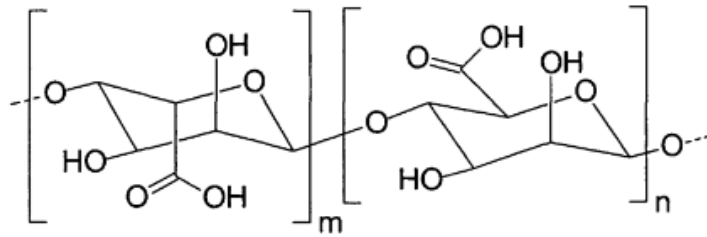
Şekil 2.4. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013)

Günümüzde farklı alanlarda kullanılan polimerlerin çoğu sentetik olduğundan, bu polimerlerin biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri, selüloz, kitin, kitosan gibi doğal polimerlere göre zayıftır. Kitin ve kitosan gibi doğal polimerlerin biyoyumluluk, biyobozunurluk, toksik olmama, adsorpsiyon vb. gibi mükemmel özelliklere sahip olması nedeniyle bir çok kullanım alanı bulunmaktadır. (Kumar, 2000). Örneğin, kitosan çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için uygun membranlar ve matrisler halinde oluşturularak, biyomedikal uygulamalarda enjekte edilebilir, ısıya duyarlı taşıyıcı materyal geliştirmek için; kitin türevleri ise ilaç taşıyıcıları olarak kullanılabilir (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013).

Reçineler

Bu polisakkarit grubu, genellikle glikoz dışında şekerler içeren ve normal polihidroksi yapısına ek olarak oksitlenmiş gruplara sahip bitki ekstraktları şeklinde elde edilir. Doğal reçineler, toksik olmamaları ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle genellikle sentetik malzemelere tercih edilir. Reçine grubuna örnek olarak, deniz yosunu, aljinat, karajenan gibi yapılar verilebilir (Bhardwai vd., 2000).

Aljinat: En yaygın bilinen reçine grubudur. (1-4) glikozidik olarak bağı β-D-mannuronik asit ve α-L-guluronik asit monomerlerinin dallı olmayan bir kopolimeridir. Aljinatlar, alglerden ekstrakte edilmek üzere bir baz solüsyonu ile ve devamında ise aljinik asit oluşturmak üzere asit ile tepkimeye sokulurlar. Yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerdir (~ 500 kDa). Aljinat jeller, kontrollü ilaç taşıyım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013). Şekil 2.5'te aljinat yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Aljinat kimyasal yapısı (Piras ve Smith, 2020)

2.1.1.2. Polipeptitler (Proteinler)

Proteinler termoplastik polimerlerdir ve polar/polar olmayan aminoasitlerden oluşurlar. Aminoasitler, farklı etkileşimlerle moleküller arası bağlar oluşturabilir ve bu özellik moleküle geniş bir kimyasal işlevsellik kazandırır. Protein bazlı biyoplastikleri elde etmek için protein ve plastikleştirici maddenin karıştırılıp eritilmesiyle oluşan geleneksel bir termoplastik yöntem kullanılmaktadır. Proteinlerin biyolojik olarak parçalanmasını proteaz enzimi sağlamaktadır ve bu amin hidroliz reaksiyonu ile olmaktadır. Protein aşılama da biyolojik bozunma oranını kontrol etmek için kullanılabilen bir araçtır (Vroman ve Tighzert, 2009).

Buğday gluteni

Kuru buğday ununun içeriğinde % 9-13 protein ve %75-80 nişasta bulunurken; buğday gluteninin esas yapısını buğday depolama proteini (%70-80, kuru madde bazında) ve az miktarda nişasta türevli polisakkaritler (%10-14), lipidler (% 6-8) ve mineraller (% 0,8-1,4) oluşturmaktadır. Buğday gluteni gıda sanayinde kullanım için uygundur, biyobozunur ve biyouyumludur.

Diğer potansiyel uygulamalarına örnek olarak kağıt üzerinde yüzey kaplamaları, tarımsal kullanımlar için biyolojik olarak parçalanabilen plastik filmler, gübreli suda çözünür torbalar, deterjanlar, kozmetikler, sigara filtreleri verilebilir (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013).

Soya proteini

Soya proteini, çok farklı moleküler özelliklere sahip karmaşık bir protein türüdür. Başlıca soya proteinleri, yaklaşık 200 ila 600 kDa arasında değişen moleküler ağırlığına sahiptir (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013). Soya fasulyesindeki proteinlerin büyük çoğunluğu, globulinler ve depo proteinleri olarak bulunur. Kalan proteinler hücre içi enzimler (lipoksijenaz, üreaz, amilaz), hemaglutininler, protein inhibitörleri ve membran lipoproteinlerinden oluşur (Kinsella, 1979). Son zamanlarda sağlıklı yaşama sunduğu katkı dolayısıyla soya proteinine olan ilgi artmıştır. Yapılan bilimsel çalışmalar neticesinde soya proteininin kalp problemlerini önlediği görülmüştür. Soya proteini içeren membran filmler dayanıklı değil, düşük mekanik özelliklere sahiptirler. Bu yüzden daha çok ssnek ve yenilenebilir filmler üretmek için kullanılmaktadırlar (Vroman ve Tighzert, 2009).

Kolajen ve jelatin

Kolajen, omurgalı ve omurgasız canlıların vücutlarında bulunan bağ dokusundaki bir protein bileşenidir. Bitkilerdeki selüloza benzer şekilde kolajen molekülleri, bağ dokuya mekanik dayanım sağlar. Kollajen, yaklaşık 300 nm uzunluğunda ve moleküler ağırlığı 300,000 olan bir polimerdir (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013). Kolajenin biyobozunurluk özelliği onu biyomedikal uygulamalarda tercih edilen önemli bir biyomateryal yapmıştır. Bununla bağlantılı olarak kolajen, ilaç taşıma sistemleri ve doku mühendisliğinde kullanılmıştır (Zhang, Li, Shi, 2006).

Jelatin; kemik, kıkırdak ve deride bulunan kolajenin kısmi hidrolizi ile elde edilen bir protein bileşimidir. Buna bağlı olarak hayvanın yaşı ve kolajenin türü, jelatinlerin özelliklerini etkileyen faktörlerdir (Gómez-Guillén vd., 2011). Yapısında 19 aminoasit bulunmaktadır ve suda çözünebilmektedir. Jelatin iyi bir film oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu filmlerin sahip oldukları mekanik özellikler; jelatinin kimyasal yapısındaki aminoasit bileşimine ve moleküler ağırlık dağılımına bağlıdır (Vroman ve Tighzert, 2009). Gıda sanayinde katkı maddesi olarak ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır (Zhang, Li, Shi, 2006).

Kazeinler

Kazein, sütün temel protein maddesidir ve toplam sütün proteinlerinin %80'ini oluşturur. Kazein genellikle koloidal kalsiyum fosfat ile kompleks oluşturan dört kazein türünün tümünü içeren misel formunda bulunur. Kazein miselleri, süte uygulanan ısıtma ve homojenizasyon gibi işlemlere karşı kararlı yapıdadır. Miseller arasındaki bütünlük, elektrostatik bağ, hidrojen bağ ve hidrofobik etkileşimler ile korunur. Kazeinler yapıştırıcı, kağıt kaplama, boya, deri, tekstil elyafları ve plastikler gibi endüstriyel uygulamalarda kullanım için uygundur. Ancak son yıllarda kazein kullanımı endüstriyel uygulamalardan gıda uygulamalarına kaymıştır. Dünya çapında üretilen kazeinin büyük bir kısmı gıda maddesi olarak kullanılmaktadır (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013).

Peynir altı suyu proteini

Peynir altı suyu proteini, inek sütünden elde edilen yüksek kaliteli bir protein tozudur. Sütte % 80 oranında bulunan temel proteinden (kazein) sonra kalan kısmı (%20) oluşturur. Peynir altı suyu proteinleri, kazeinlerin süttten uzaklaştırılması işlemi sonrası belirli pH ve sıcaklık koşullarında (pH 4.6 ve 20°C'de) çözünür kalan proteinlerdir. Peynir altı suyu proteini antiviral ve antibakteriyel etkiye sahiptir; ayrıca karaciğer hasarını azaltır, kan basıncını düzenler bağışıklık ve sindirim sistemi fonksiyonlarını iyileştirir (Gangurde vd., 2011).

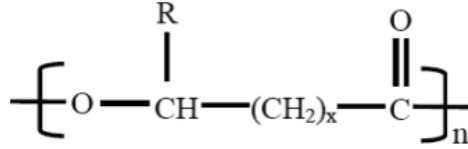
2.1.2. Mikroorganizma kaynaklı biyobozunur polimerler

2.1.2.1. Mikrobiyal polyesterler

Mikrobiyal polyesterler, canlıların vücudunda mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak kolayca parçalanır. Tıp alanında implant materyali ve ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilirler.

Polihidroksialkanoat

Polihidroksialkanoatlar (PHA), biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu termoplastiklerden biridir. Bunlar, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen daha büyük moleküllerdir (Raza, Riaz, Banat, 2018). Şekil 2.6'da kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.6. Polihidroksialkanoat kimyasal yapısı (Raza, Riaz, Banat, 2018)

Son teknolojiler ve ideal özellikleri göz önüne alındığında, PHA'lar (özellikle kısa zincir uzunluğundaki PHA polimerleri), cerrahi dikiş ipliği, doku iskeleleri, greftler ve kalp kapakçıkları veya ilaç taşıyım sistemleri gibi spesifik tıbbi uygulamalar için kullanılabilir (Grigore vd., 2019).

Poli-3-hidroksibütirat (PHB)

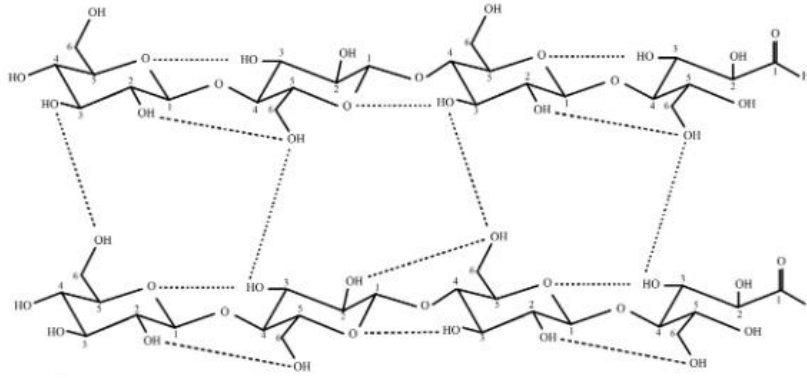
Bir tür biyo-bazlı plastik olan Poli-3-hidroksibütirat, glikoz veya nişasta metabolize eden bakteriler tarafından üretilir. Polihidroksibütirat, β -ketotiyolaz tarafından katalize edildiğinde asetoasetil-CoA üreten iki asetil-CoA molekülünün kondenzasyonundan mikrobiyal olarak sentezlenir. PHB, 177 °C'ye kadar yüksek erime sıcaklığına, 2 °C'lık camsı geçiş sıcaklığına, 43 MPa'lık çekme mukavemetine ve yaklaşık %60 kristalliteye sahip kısa zincirli PHA'lardır.

PHB'ler, yüksek oksijen geçirimsizliği ve biyoyumumluluğu ile doğada hidrofobik olarak bulunurlar. Aynı zamanda ultraviyole radyasyona karşı dayanıklılıkları da vardır. Bu özellikleri nedeniyle, PHB talep gören bir biyopolimer türüdür ve aynı zamanda etkili bir gıda paketlenme malzemesidir (Sirohi vd., 2021).

2.1.2.2. Bakteriyel selüloz

Bir selüloz türü olan bakteriyel selüloz (BC) acetobacter xylinum bakterileri tarafından sentezlenmektedir. BC'nin kimyasal yapısı, diğer selülozlarla aynı şekilde selobiyoz ile bağlanan zincir molekülleri olsa da, normalde bitki türevli selülozda bulunan lignin, hemiselüloz ve pektin vb. gibi moleküller içermez (Huang vd., 2014).

BC, moleküler formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ olan β -1,4 glukoz zincirinden oluşan fibril yapısındadır. Glukoz zincirlerinin bir arada tutulmasını, hidrojen içi ve hidrojenler arası bağlar sağlar. Bu bağların şematik gösterimi Şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Bakteriyel selülozun hidrojen molekül içi ve intramoleküler hidrojen bağları (Esa, Tasirin,Rahman, 2014)

Sadece glikoz monomerinden oluşan BC yapısı nedeniyle, yüksek su tutma kapasitesi, yüksek derecede polimerizasyon, mekanik mukavemet ve kristallik gibi özellikler sergiler. Araştırmalardan elde edilen veriler, BC ve türevlerinin biyomedikal, elektronik ve gıda endüstrisi gibi çeşitli alanlarda kullanım için iyi bir potansiyele sahip olduğunu ve umut vadeden bir gelecek sağladığını açıkça göstermektedir (Esa, Tasirin, Rahman, 2014).

2.2. Sentetik Biyobozunur Polimerler

Bu biyopolimer grubu; biyobozunur polyesterlere aittir ve üretim şekilleri monomerlerin polikondenzasyonu veya halka açma polimerizasyonudur. İnsan vücudunda kullanımı için FDA onayı almıştır.

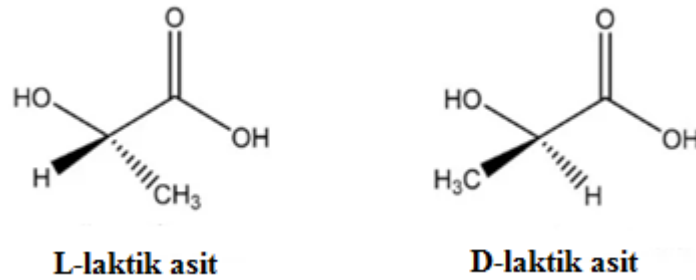
2.2.1. Alifatik polyesterler

Alifatik polyesterler grubu biyobozunur polimerler kategorisine girer ve doku iskeleleri, cerrahi dikiş iplikleri, kemik implantları ve ilaç taşıyım sistemleri gibi tıbbi ürün ve uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Alifatik polyesterlerin bozunması genellikle ana zincirdeki ester bağlarının hidrolizi yoluyla gerçekleşir ve bozunmanın hızı ve derecesi polimerin karakterine (örneğin hidrofiliklik ve kristallik) bağlıdır (Seyednejad vd., 2011).

Alifatik polyesterler üç farklı yöntemle sentezlenir. İlk yöntem, bir hidroksi asidin polikondenzasyonudur. Ancak bu yöntem ile sentezlenen polimerler düşük molekül ağırlığı ve düşük polimerizasyon derecesine sahip olup, blok kopolimerlerin sentezlenememesi gibi bazı dezavantajlara sahiptir. İkinci yöntem, laktit ve glikolid gibi siklik diesterlerin halka açma polimerizasyonu (ROP)'dur ve bu yöntemle yüksek moleküler ağırlığa sahip polyesterler elde edilebilmektedir. Üçüncü yöntem enzimatik polimerizasyondur. Toksik reaktiflerin kullanımından kaçınarak ve katalizörü geri dönüştürerek gerçekleşir ancak bu yöntemin en büyük dezavantajı, elde edilen polimerlerin nispeten düşük molekül ağırlıklı olmasıdır.

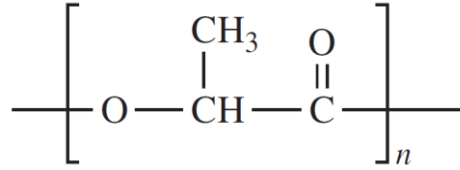
2.2.1.1. Polilaktik asit (PLA)

Polilaktik asit, laktik asit kullanılarak üretilen bir alifatik polyesterdir. Düşük molekül ağırlıklı PLA, 1932'de Carothers tarafından sentezlenmiştir. 1954 yılına gelindiğinde DuPont'un çalışması daha sonra patenti de alınan daha yüksek molekül ağırlıklı bir ürünle sonuçlanmıştır (Gupta, Revagade, Hilborn, 2007). Laktik asit (LA), polilaktik asitin monomeridir. Organizmalarda glikolitik enerji döngüsünde hayati bir rol oynar ve canlı organizmaların büyümesini, gelişmesini sürdürmek için önemli bir maddedir. İki optik izomeri vardır: L-laktik asit ve D-laktik asit. Bu izomerler Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Laktik asitin izomerleri

LA, d-tipi ve l-tipi izomerlere sahip kiral bir molekül olduğu için, üç polilaktik asit formu oluşur: poli L-laktik asit (PLLA), poli-D-laktik asit (PDLA) ve poli(DL -laktik asit) (PDLLA). Yapısındaki -CH₃ yan gruplarının varlığından dolayı hidrofobik bir polimerdir ve bu metil yan gruplarının koruyucu etkisi nedeniyle hidrolize PGA'dan daha dirençlidir (Vroman ve Tighzert, 2009). PLA' nın kimyasal yapısı Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. PLA kimyasal yapısı (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013)

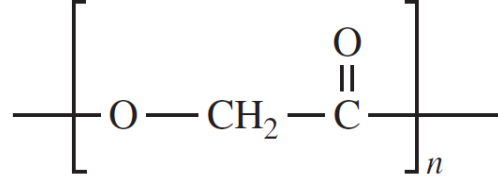
PLA, biyoyumluluk, biyobozunurluk gibi özellikleri nedeniyle çeşitli biyomedikal uygulamalar için kullanılan en umut verici sentetik polimerlerden biridir. Bu uygulama alanlarına bakıldığında PLA, dermatoloji ve kozmetikte doku mühendisliği, doku iskeleleri, ilaç dağıtım sistemi malzemeleri, kaplama membranları, farklı biyolojik tıbbi implantlar ve cerrahi dikiş ipliği üretmek için kullanılmıştır. Ayrıca bu uygulamalarının çeşitlendirilmesi, PLA'nın kimyasal yapısındaki basit modifikasyonlarla ve diğer polimerik/polimerik olmayan bileşenlerle karıştırılıp, kopolimerize edilerek kullanılmasıyla da mümkündür (Singhyi, Zinjarde, Gokhale, 2019). PLLA'nın bazı kimyasal ve mekanik özellikleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. PLLA'nın genel özellikleri (Gupta, Revagade, Hilborn, 2007)

Erime sıcaklığı	145-186 °C
Bozunma sıcaklığı	227-255 °C
Camsı geçiş sıcaklığı	53-64 °C
Yoğunluk	1,24-1,29 g/cm ³
Çekme dayanımı	55-80 MPa (Kapoor vd., 2015)
Young modülü	350-3500 MPa

2.2.1.2. Poliglikolik asit (PGA)

Poliglikolik asit (PGA); en basit lineer yapılı alifatik polyester olup aynı zamanda biyobozunur ve termoplastiktir. PGA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.10'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. PGA'nın kimyasal yapısı (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013)

PGA, 1954'ten beri sert elyaf oluşturan polimer olarak bilinmektedir. 1960'larda ilk biyobozunur sentetik cerrahi suture olarak Dexon ticari adıyla, 1984-96 yılları arasında kemik pimi olarak Biofix ticari adıyla kullanılmaya başlandı (Göktürk ve Erdal, 2017). PGA sentezi için dört yöntem vardır: glikolik asidin polikondensasyonu, halka açma polimerizasyonu, glikolid, halojenoasetatların katı hal polikondensasyonu ve karbon monoksit ve formaldehitin Brønsted asit katalizli polimerizasyonu. Polikondensasyon yöntemi kullanılarak düşük molekül ağırlıklı polimerler elde edilirken glikolik asidin siklik dimer formu olan glikolidin halka açma polimerizasyonu yoluyla daha yüksek molekül ağırlıklı polimerler elde edilebilir.

Biyobozunur bir suture materyali olarak bilinen PGA'nın bu özelliği, diğer biyomedikal alanlarda değerlendirilmesinde etkili olmuştur. Pimler, çubuklar, plakalar ve vidalar dahil olmak üzere PGA ile implante edilebilir tıbbi cihazlar üretilmektedir. Ayrıca doku mühendisliği veya kontrollü ilaç dağıtımı uygulamalarında da kullanılmaktadır (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013). PGA'nın bazı kimyasal ve mekanik özellikleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. PGA'nın özellikleri (Vroman ve Tighzert, 2009)

Erime sıcaklığı	220-225 °C
Camsı geçiş sıcaklığı	35-40 °C
Çekme dayanımı	57 MPa
Young modülü	6-7 GPa

2.2.1.3. Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

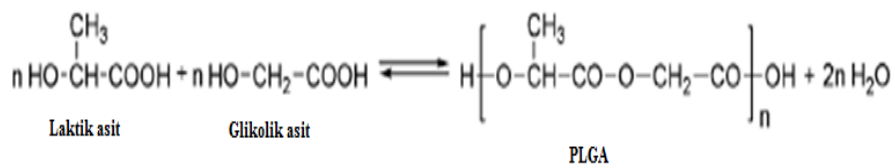
PLGA yapısı ve genel özellikleri

PLGA, monomerleri laktik asit (LA) ve glikolik asitin (GA) kullanım amacına bağlı olarak farklı oranlarının bileşimi ile hazırlanabilen bir kopolimerdir. Laktik asit içeriği %25'ten fazla olan PLGA polimerleri doğada amorf halde bulunurlar. Farklı kimyasal bileşimlerde sentezlenen PLGA'lar ilaç dağıtımı için daha düşük moleküler ağırlıklı tercih edilirken, implantlar için genellikle yüksek moleküler ağırlıklı tercih edilmektedir (Ayyoob ve Kim, 2018).

PLGA'nın sulu ortamlardaki bozunması ester bağlantılarının hidrolizi ile olmaktadır ve bu bozunma dört basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamak hidrasyondur. Bu kısımda su amorf bölge tarafından absorbe edilir ve van der Waals bağları ile hidrojen bağlarını bozarak camsı geçiş sıcaklığında (T_g) bir düşüşe neden olur. İkinci basamakta yapıdaki ilk bozunmalar meydana gelir ve moleküler ağırlıktaki azalma ile kovalent bağlar ayrılır. Üçüncü basamakta bozunma süreklilik kazanır ve karboksilik uç gruplar, bozunma sürecini otokatalize eder. Son basamakta ortamda kalan parçalar çözünür moleküllere dönüşür (Gentile vd., 2014).

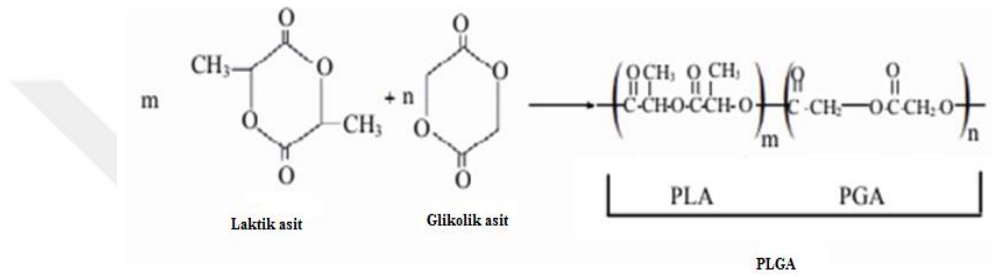
PLGA sentez yöntemleri

PLGA sentezi için başlıca iki yöntem vardır. Bu yöntemlerden ilki, laktik asit (LA) ve glikolik asitin (GA) kondenzasyon polimerizasyonudur. Bu polimerizasyon incelenirken bütün fonksiyonlu grupların aynı ölçüde etkin oldukları yani bir monomer molekülünün başka bir monomerle veya bir polimer zinciri ile aynı şekilde reaksiyon verdiği kabul edilir. Başlama aşamasında monomer molekülleri birbirleri ile reaksiyona girerek düşük molekül ağırlıklı polimer zincirleri (oligomer) oluştururlar. Yüksek molekül ağırlıklı polimerler uzun sürede oluşur (Yücesan, 1994). Şekil 2.11'de PLGA'nın kondenzasyon polimerizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.11. PLGA'nın kondenzasyon polimerizasyonu

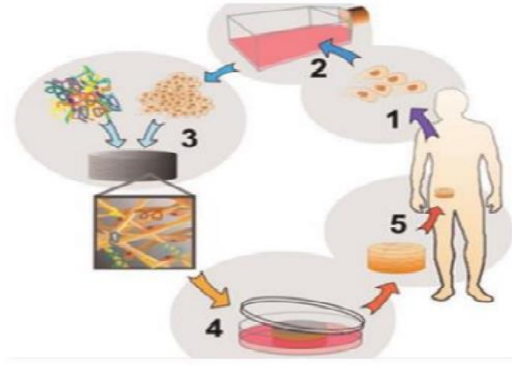
Diğer bir sentez yolu ise; bu iki asitin dimerlerinin halka açılma polimerizasyonudur. Genel gösterimden de anlaşıldığı gibi halka-açılma polimerizasyonunda monomer molekülleri birer birer zincirlere katılırlar. Polimerizasyon ortamında yalnız aktif zincirler ve monomer molekülleri arasında tepkime gözlenir. İkinci sentez yöntemi çok daha elverişlidir. Bunun sebebi zincir uzunluğunun kontrolü ve yan tepkimelerin en aza indirilmesi yoluyla kısa sürede yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin sentezlenebilmesidir. Şekil 2.12’de PLGA’nın halka açılma polimerizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.12. PLGA'nın halka açılma polimerizasyonu

PLGA'nın uygulama alanları

PLGA biyoyumluluk ve biyobozunurluk yönleriyle özellikle biyomedikal alanda kullanılmaktadır. PLGA'nın özelliklerine bakıldığında, yapısının genel olarak amorf olduğu söylenebilir (Ayyoob ve Kim, 2018). Dolayısıyla bu amorf yapı polimere düşük mekanik dayanım sağladığı için ilaç salınımında kullanmak için uygundur. Kristalin yapı mekanik olarak daha dayanıklı olduğu için cerrahi dikiş ipliği, kemik sabitleyici ve doku iskelesi olarak kullanımı daha uygundur. Şekil 2.13 ve 2.14'te PLGA'nın kemik ve doku mühendisliği uygulamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Doku mühendisliği metod şeması (1) hücreler hastadan alınır (2) hücre kültürü (3) hücrelerin iskeleye inkübasyonu (4) iskele içerisinde hücre kültürü (5) yaralı bölgeye implantasyon

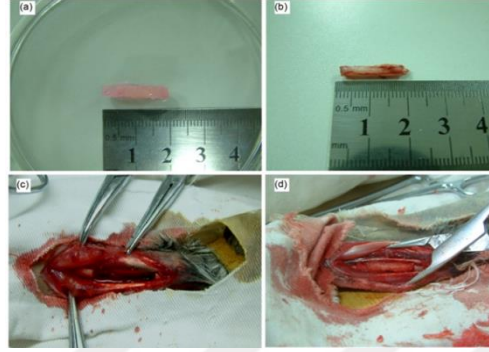


Şekil 2.14. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı

Bir başka özellik de sudaki çözünürlüğü olup, bu özellik PLGA'nın içerdiği monomer oranına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Laktik asit oranı yüksek olan PLGA hidrofobik özellik, glikolik asit oranı yüksek olan PLGA hidrofilik özellik gösterir. Buna bağlı olarak suda çözünen ve suda çözünmeyen ilaçların taşınımında tercih edilmektedir. Yani ilacın türü PLGA tabanlı ilaç taşınım sistemlerinin ve çözücülerin hazırlanma tekniğini belirlemektedir.

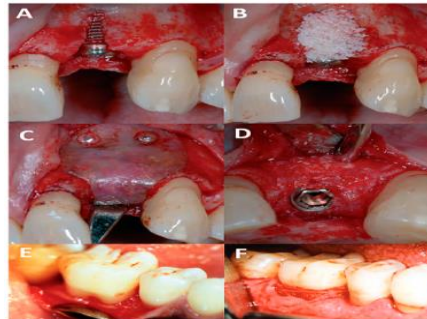
PLGA'nın diğer bir özelliği olan biyoyumumluluğa bakıldığında, yapılan laboratuvar çalışmaları polimerin lif, kemik ve ilik dokularıyla hiçbir zararlı yan etki olmadan uyum sağladığını göstermiştir. Laboratuvar ortamında farelerin sırt bölgelerindeki kıvrımlı yapıya yerleştirilen polimerin damarlı dokuda büyüme sağlayıp iyileşme gösterdiği kanıtlanmıştır.

Bir başka örnek olarak, yapılan in vitro çalışmalarda PLGA doku iskelesinin insanda diş eti bağ doku hücrelerinin çoğalmasını desteklediği ve hücrelerde farklılaşmaya sebep olduğu görülmüştür. Şekil 2.15'te PLGA'nın tavşan ön kol kemiğine implantasyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.15. (a) Hidroksiapatit(HA)/PLGA (b) tavşan önkol kemiğinden kemik parçası (c) tavşan ön kol kemiğindeki hasarlı bölge (d) doku iskelesinin hasarlı bölgeye implantasyonu

PLGA'nın sahip olduğu diğer bir özellik ise biyobozunur olmasıdır. Kontrollü bir bozunma süreci, vücuda implante edilecek biyomalzemeler için kilit bir faktördür. Bozunabilen malzemeler yeni dokuların oluşumu için yer açacak ve taşınan hücrelerin çevre dokularla bütünleşmesine izin verecektir. PLGA'nın bozunma süresi içeriğindeki monomer oranına (LA:GA) bağlı olarak değişmektedir. Yüksek glikolik asit içerikli polimer hidrofilik yapıda olacağından daha kısa sürede bozunmaktadır. Örneğin %50 LA ve %50 GA içeren PLGA'nın ortalama bozunma süresi 1-2 aydır ve bu oranlarda hazırlanan polimer sıklıkla periodontal uygulamalarda tercih edilmektedir. Ayrıca, molekül ağırlığı da bozunma süresini etkilemektedir (Sun vd., 2017). Şekil 2.16'da PLGA'nın periodontal uygulamasına bir örnek verilmiştir.



Şekil 2.16. (A) İmplantlı bölge (B) PLGA membran yerleştirilmesi (C) PLGA kaplı kemiğe soğrulabilir iki pin yerleştirilmesi (D) 6 ay sonra implant yüksekliğindeki hataların azalması (E,F) kökler arası bölgedeki derinliğin azalması

Tablo 2.3'te bazı firmalarca üretilen ve biyomedikal uygulamalarda kullanılan PLGA içerikli ürünler gösterilmiştir.

Tablo 2.3. *Biyomedikal uygulamalarda kullanılan bazı ticari PLGA ürünler (Sun vd., 2017)*

Ticari adı	Üretici firma	Monomer oranı (PLA:PGA)	Formu	Bozunma süresi	Biyouyumluluk	Mekanik özellikler
Vicryl-Netz	Ethicon	10:90	Dikiş ipliği	4-12 hafta	Çevre dokularla reaksiyon oluşturmaz.	Yarı kristalin
Vicryl	Ethicon	8:92	Dikiş ipliği	12 hafta	İyi bir biyouyumluluk, sınırlı inflamatuvar yanıt	Yarı kristalin, düşük elastisite
Biologically	Quiet	85:15	Doku iskelesi	24 hafta	Anormal bir doku reaksiyonu yok	Yüksek mekanik dayanım
Lupron Depot	TAP	50:50	Mikroparçacık	4 hafta	Düşük miktarda toksisite ve iritasyon	Toz ilaç
LactoSorb Screws and plates	Walter Lorenz Surgical	-	Doku iskelesi	48 hafta	Yan etkisi olmayan kemik yapısı içeriği	Yüksek çekme gerilimi ve sertlik
Zoladex	Astra-Zeneca	-	Mikroparti kül	4 hafta	Biyouyumluluk ve non toksik	Toz ilaç
Dermagraft	ATS	10:90	Dikiş ipliği	4 hafta	Biyouyumluluk, sınırlı bağışıklık reddi	Elastiklik,% 95 gözeneklilik

PLGA sentezi ile ilgili literatür çalışmaları

Poli-laktik-ko-glikolik asit biyouyumlu ve biyobozunur olması gibi sahip olduğu özellikler sebebiyle özellikle biyomedikal uygulamalar da sıklıkla tercih edilen bir kopolimerdir. PLGA'yı oluşturan laktik asit ve glikolik asit monomerleri uygulama alanına göre farklı oranlarda karıştırılarak vücuttaki bozunumu istenilen sürede ayarlanabilmektedir. Sentezi ile ilgili literatür çalışmalarına bakıldığında;

Pereira ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, Oxaliptatin isimli kanser ilacı ile PLGA ve PLGA-PEG etkileşimleri incelenmiştir. Burada polietilen glikolün (PEG) hazır alınması tercih edilmişken, PLGA ve PLGA-PEG blok kopolimeri laboratuvar ortamında polikondenzasyon yöntemi ile azot atmosferinde sentezlenmiştir. 50 ml laktik asit ve 62 ml glikolik asit eşmolar (1:1) oranda karıştırılmış, katalizör olarak 0,25 ml sülfürik asit eklenmiştir Sıcaklık 140 °C ye ayarlanmış ve manyetik karıştırıcı da 10 saat tepkimeye bırakılmıştır. Sentez işleminin ardından Oxaliptatin adlı kanser ilacı 120 ° C de 50 ml lik reaktör içinde manyetik karıştırıcı kullanılarak ve azot atmosferinde bu üç polimere eklenmiştir. Son olarak elde edilen polimer/ilâç karışımlarının karakterizasyonları yapılmış ve sonuçta PLGA-PEG blok kopolimerlerinin biyouyumluluk özelliklerinin geliştirilmesiyle birlikte kontrollü ilâç salınım sistemlerinde tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır (Pereira vd., 2017).

Li ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, PLGA sentezi farklı parametreler ve biyolojik bir katalizör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada PLGA sentezi iki basamaklı polikondenzasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sentezde ilk basamak olarak oligolaktik-glikolik asit elde edilmiştir. Bunun için 45 g sulu laktik asit çözeltisi ve 38 g glikolik asit argon atmosferinde bir reaktörde karıştırılmıştır. Bu şekilde sıcaklık ve karıştırma süresi değiştirilerek 3 deneme yapılmıştır. En yüksek molekül ağırlıklı oligolaktik-glikolik asit 140 °C ve 2 saatlik çalışma süresinde elde edilmiştir. İkinci basamakta polimer sentezine geçilmiştir. 70 g oligolaktik-glikolik asit ve katalizör olarak 265 mg kreatinin (biyokatalizör) karıştırılıp reaktöre eklenmiştir. Bu şekilde yine sıcaklık ve çalışma süresi değiştirilerek 9 deneme yapılmıştır. Maksimum molekül ağırlıklı PLGA 150 °C ve 54 saatlik karıştırma süresinde elde edilmiştir (Li vd., 2015).

Alimohammadi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, Amoxicilin (antibiyotik) içerikli manyetik nanopartiküllü PLGA sentez ve karakterizasyonu yapılmıştır. Manyetik nanopartiküller FeCl_2 ve FeCl_3 kimyasal çöktürme metoduyla hazırlanmıştır. Bu çalışmada da polimer olarak PLGA ve PLGA-PEG kopolimerleri tercih edilmiştir. Burada PLGA ve PLGA-PEG kopolimerleri halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. 0,684 mol laktik asit 0,838 mol glikolik asit 3 boyunlu balonda azot atmosferinde $140\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 10 saat boyunca karıştırılmıştır. Katalizör olarak SnOct_2 (Kalay (II) 2-etilhekzanoat) eklenmiştir. Soğutma işleminin ardından karışım kloroformda çözündürülüp çözücü ayrıştırılmıştır. Sentez işleminden sonra Amoxicilin yüklü manyetik PLGA ve PLGA-PEG nanopartikülleri emülsiyon-evaporasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Sonuçta PLGA-PEG kopolimerinden salınan amoxicilin miktarının saf PLGA'dan salınan miktara göre daha fazla olduğu görülmüştür (Alimohammadi vd., 2012).

Erbetta ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, PLGA sentez ve karakterizasyonu incelenmiştir. PLGA sentezi halka açılma polimerizasyon yöntemi kullanılmıştır. Toplamda 8 sentez yapılmış, bunlardan 4'ünde laktik asit/glikolik asit 70:30, diğer 4'ünde 50:50 oranında kullanılmıştır. İlk iki deneyde tıpasız bir reaktör içine monomerler ve katalizör (SnOct_2) eklenmiştir ve sentezin ilk 10 dakikası boyunca karıştırılarak ısıtılmıştır. 3. deneyde ortama azot enjekte edebilmek için sisteme döner evaporatör eklenmiştir. 4. sentezde reaktör ve evaporatör yer değiştirmiş ve yüksek vakum altında çalıştırılmıştır. Diğer 4 deneyde farklı olarak vakum yerine kauçuk tıpalı cam bir reaktör kullanılmıştır. Sentezler sonucu PLGA kopolimeri metilen klorür içinde çözündürülmüş ve $60\text{ }^\circ\text{C}$ de vakum altında kurutulmuştur (Erbetta vd., 2012).

Choi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, elastik PLGA/PCL/PLGA tri-blok kopolimerlerinin sentez ve karakterizasyonu incelenmiştir. Sentez yöntemi olarak halka açılma polimerizasyonu seçilmiştir. Burada PLGA sentezinde, laktik asit ve glikolik asit 50:50 ve 75:25 oranlarında bir cam reaktör içinde karıştırılmış, monomerler eriyene kadar $140\text{ }^\circ\text{C}$ de yağ banyosunda ısıtılmıştır. Daha sonra sıcaklık $120\text{ }^\circ\text{C}$ ye düşürülüp SnOct_2 katalizörü eklenmiştir. Reaksiyon azot ortamında 24 saat karıştırılarak devam etmiştir. Sentez sonucu PLGA kloroformda çözündürülmüş ve sonra etil eter içinde çöktürülmüştür. Daha sonrasında elde edilen polimere mekanik testler ve NMR karakterizasyonu yapılmıştır (Choi ve Park, 2002).

PLGA içerikli doku iskelesi üretimi ile ilgili literatür çalışmaları

Pelaseyed ve arkadaşları, TiO_2 nanoparçacıkları içeren poli (laktit-ko-glikolid) (PLGA) esaslı gözenekli doku iskelelerini, yeni bir yöntem olan air-liquid foaming tekniği ile üretmişlerdir. Sonuçlara bakıldığında, köpürtme işlemi parametrelerinin elde edilen doku iskeleleri üzerinde etkili olduğu ve iskelelerin gözenek boyutunun 200-600 μm aralığında olduğu görülmüştür. Doku iskelelerin mekanik özellikleri gözenek boyutu ile ters orantılıdır. Bu çalışmada optimum koşullarda gözenek boyutu 270 μm , basma dayanımı 0,97 MPa, gözeneklilik %90 olarak bulunmuştur. Ayrıca PLGA/ TiO_2 doku iskelelerinin suşa (bir bakteri veya virüsün farklı alttürlerinin, aralarında genetik farklılıklar bulunan grupları) karşı gösterdiği antibakteriyel etkisi E.Coli kullanılarak elde edilmiştir. Bu doku iskelesinin biyoyumluluğu MG 63 hücreleri ile test edilmiş ve üretilen doku iskelelerinin kemik doku uygulamaları için uygun olduğu görülmüştür (Pelaseyad vd., 2021).

Xu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kalsiyum karbonat (CC)/hekzagonal mezogözenekli silika (HMS)/PLGA sinterlenmiş mikro küre bazlı yapı iskeleleri geliştirmişlerdir. İskelelerin % 30-40 gözeneklilikte olduğu görülmüştür. Bozunma sonuçları CC/HMS/PLGA doku iskelelerinin, PLGA asidik yan ürünlerinin neden olduğu pH artışını nötralize ettiğini göstermiştir. CC katkı maddeleri hücrelerin doku iskelelerine tutunmasına izin veren yapışkan proteinlerin artışını sağlamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin (MSC'ler) proliferasyonu ve osteojenik farklılaşması CCK-8 testi ile, alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi Alizarin Red boyaması ile değerlendirilmiştir. HMS/PLGA doku iskeleleriyle karşılaştırıldığında, CC/HMS/PLGA doku iskelelerinde MSC'lerin çoğalmasının arttığı gözlemlenmiştir. CC/HMS/PLGA iskeleleri kemik onarımı ile rejenerasyonu için iyi bir alternatif olmuştur (Xu vd., 2021).

Shadman ve arkadaşları, porojen (NaCl) kullanarak çözücü döküm/partikül uzaklaştırma yöntemi ile polimerik bir doku iskelesi elde etmişlerdir. Sonuçlara bakıldığında, PLGA doku iskelesinin 50 ila 200 μm boyutlarında gözeneklere sahip olduğu görülmüştür. PLGA doku iskelesinin 80 saatlik bozunma deneyinde ağırlığının %80'ini kaybettiği görülmüştür. Hücre biyoyumluluk testleri, iskele üzerinde kullanılan LNCaP hücre hattının büyüdüğünü göstermiştir. İskele üzerindeki MSC'lerin büyümesi ve farklılaşması, 21 günlük süre boyunca meydana gelmiş olup bu durum alkalın fosfataz ve osteopontin genlerinin fonksiyonel protein yapılarına dönüşümüyle doğrulanmıştır.

Farklılaşmış hücrelerin kalsifikasyon miktarı da MSC'lerin osteoblastlara dönüşümünü doğrulamıştır. Bu veriler ışığında, PLGA matriksli polimerik doku iskelelerinin doku mühendisliği, implant ve ilaç taşıyım sistemleri için potansiyel olarak kullanılabilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Shadman vd., 2021).

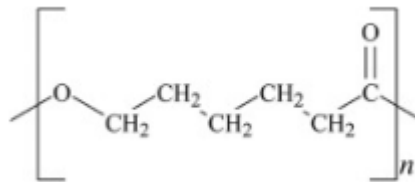
Huang ve arkadaşları, düzenli ve yüksek oranda birbirine bağlı gözenekli poli (laktik-ko-glikolik-asit) (PLGA) / nanohidroksi apatit (NHA) iskelelerini, ısı indüklemeye ile faz ayırma tekniği ile üretmişlerdir. Çözücü bileşimi ve polimer konsantrasyonunun yanı sıra NHA içeriğinin PLGA/NHA iskelelerinin mikro-morfolojik yapısı ve mekanik özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. NHA tozları ultrasonikasyon ile 1,4-dioksan/su karışımı içinde dağıtılmıştır. Devamında, NHA tozları homojen bir şekilde dağıldığında çözeltiye PLGA eklenmiştir. PLGA/NHA bileşikler, homojen PLGA/NHA çözeltisine dönüşene dek 65°C'de ısıtılmıştır. Numune, hızlı bir şekilde dondurulması için hemen sıvı nitrojene daldırılmıştır. Sonunda, çözücüler uzaklaştırmak için numune -60°C ve 14 Pa'da en az 48 saat dondurularak kurutulmuş ve gözenekli yapı iskeleleri elde edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, özellikle ağırlıkça % 10 NHA içeren PLGA/NHA iskelelerinin, yüksek oranda hücre büyümesi, alkalik fosfat aktivitesi sergilediği görülmüş ve % 84 gözeneklilik elde edilmiştir (Huang vd., 2008).

Schardoism ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, üç boyutlu gözenekli PLGA-biyomimetik karbon apatit kompozit yapı iskelelerini dondurarak üretmişlerdir. Tamamlayıcı karakterizasyon teknikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM), civa porozimetrisi ve X-ışını mikrotomografisi kullanılarak dolgu oranının iskele gözenekliliği ve mekanik ve bozunma özellikleri üzerindeki etkisini belirlemek için farklı katkı/polimer oranları denemişlerdir. Kompozit iskele içindeki apatit oranının, mekanik özellikler ve in vitro bozunma özellikleri açısından güçlü bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Deneysel çalışmada ilk olarak, PLGA, dimetil karbonat (DMC) içinde çözündürülmüştür. Sonrasında PLGA çözeltisi içerisine apatit eklenmiş ve 10 dk sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Süspansiyonlar (iç çap:2 cm, yükseklik:2 cm) teflon bir kalıba dökülmüştür. Bu süspansiyonu dondurmak amacıyla kapalı kalıplar 5 saat boyunca -20 °C de dondurucuya yerleştirilmiştir. Son olarak kalıplar açılıp donmuş süspansiyonlara 24 saat liyofilizasyon işlemi uygulanmıştır. In vitro bozunma çalışmaları yüksek apatit oranlarının PLGA bozunmasını sınırladığını ve iskelelerin hidrofilikliğini arttırdığını, bunun sonucu olarak da kemik mineraline benzer apatitin doku iskelelerinin biyolojik özelliklerini iyileştirdiğini göstermiştir (Schardoism vd., 2017).

Monárrez-Cordero ve arkadaşları Allium termal olarak indüklenen faz ayırma (TIPS) tekniği ile cepa özütleri (AC), kitosan ve PLGA ile birlikte osteokondüktif olabilen ve biyouyumluluk ve biyomineralizasyon özellikleri ile kemik dokusunun daha iyi ve daha hızlı yenilenmesini destekleyen PLGA/kitosan/AC doku iskeleleri geliştirmişlerdir. Deneysel çalışma konsantre asetik asit içinde %2'lik bir PLGA (70:30) polimer çözeltisi hazırlanmıştır . Çözelti 2 saat manyetik olarak karıştırıldıktan sonra kitosan ve Allium Cepa özütü eklenmiştir. Elde edilen çözelti, oda sıcaklığında 90 dakika boyunca ultrasonikasyon yöntemiyle karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti kuru buz ile 6 saat dondurulup, ardından 72 saat liyofilizatörde bekletilmiştir. Kompozitler, 12 saat boyunca -4°C sıcaklıkta susuz etanol içine daldırılmış ve sonrasında etanol dekantasyon yöntemi ile uzaklaştırılmıştır. Devamında -4°C'de 12 saat boyunca NaOH çözeltisine daldırılmış, NaOH çözeltisi uzaklaştırılıp numuneler kurumaya bırakılmıştır. Simüle edilmiş vücut sıvısı (SBF) kullanılarak biyoaktivite analizi yapılmıştır. İskele karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu, enerji dağılım spektroskopisi ve kızılötesi spektroskopi kullanılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, 50 ile 100 µm arasında gözenek boyutu dağılımına sahip bir yapı oluşmuş, yapı yüzeyinde apatit kristalleri olduğu görülmüştür. PLGA/kitosan/AC kemik dokuya çok yakın bir değer olan 1,6-1,7 arasındaki Ca/P oranı elde edilmiştir (Monárrez-Cordero vd., 2021).

2.2.1.4. Polikaprolakton (PCL)

Polikaprolakton (PCL), farmasötik ve biyomedikal alanlarında geniş uygulamalara sahip, tekrarlayan heksanoat birimlerine sahip alifatik polyester sınıfında biyobozunur bir polimerdir. PCL, mekanik özellikleri, diğer polimerlerle uyumluluğu, biyouyumluluğu, iyi çözünürlüğü gibi özellikleriyle önem kazanmıştır. Kimyasal yapısı Şekil 2.17'de gösterilmiştir.



Şekil 2.17. Polikaprolakton kimyasal yapısı (Laurance, 2021)

PCL, fizyolojik koşullar altında ester bağlarının hidrolizi ile bozunur ve bu nedenle vücuda implante edilebilir bir biyomateryal olarak kullanılmaktadır (Laurance, 2021). Daha çok kontrollü ilaç taşıyım sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılan bir polimerdir. Bununla birlikte, çok yavaş bozunması (2-3 yıl), hidrofobikliği gibi nedenlerle çalışmalarda PCL'nin doku mühendisliği, kemik dokusu rejenerasyonu, doku onarımı alanlarında implantlar veya iskele matrisi olarak kullanımının uygun olduğu görülmüştür (Kurakula vd., 2021). PCL'nin bazı kimyasal ve mekanik özellikleri Tablo 2.4'te verilmiştir.

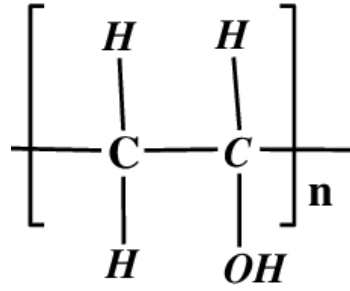
Tablo 2.4. *PCL'nin özellikleri (Mirbagheri vd., 2017)*

Erime sıcaklığı	56-65 °C
Camsı geçiş sıcaklığı	(-65) – (-60) °C
Bozunma sıcaklığı	350 °C
Yoğunluğu	1,071-1,2 g/cm ³
Çekme dayanımı	23 MPa (Vroman ve Tighzert, 2009)
Young modülü	0,21-0,44 GPa

2.2.2. Polivinil alkol ve polivinil asetat

2.2.2.1. Polivinil alkol (PVA)

Poli (vinil alkol), vinil polimerler arasında bozunması en kolay olan polimerdir. PVA, 180 -190°C arasında erime noktasına, 26-30 kDa arasında bir moleküler ağırlığına ve % 86,5 -89 arasında bir hidroliz derecesine sahiptir. PVA yarı saydam, tatsız, kokusuz, suda çözünen beyaz renkli granüler bir tozdur (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013). PVA polimerizasyonuna bakıldığında vinil asetatın polimerizasyonu ve hidrolizinden hazırlanan PVA'lar ataktik, vinil format, vinil pivalat ve vinil trifloroasetatın radikal polimerizasyonu ile hazırlanan PVA'lar sindiyotaktik, benzil vinil eterin katyonik polimerizasyonu ile hazırlanan PVA'lar izotaktiktir. PVA farklı aldehitler ile reaksiyon vererek molekül içi ve moleküller arası asetal bileşikler oluşturabilir ve glutaraldehit veya glioksal gibi iki işlevli aldehitler kullanılarak kimyasal olarak çapraz bağlanabilir. PVA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.18'de gösterilmiştir.

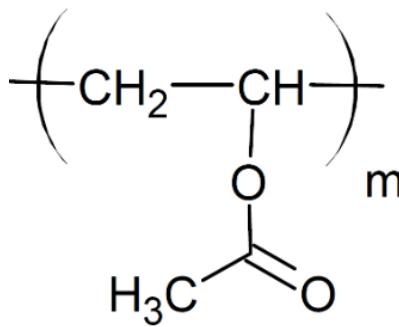


Şekil 2.18. PVA kimyasal yapısı

Yapılarının karmaşık olmaması, yapışkanlık, yüksek mukavemet, film oluşturma, biyouyumluluk, toksik olmama gibi özellikleri ile PVA polimerleri tekstil, kağıt, yapıştırıcı, gıda, biyomedikal ve özellikle farmasötik gibi farklı endüstrilerde uygulama alanı bulmuştur (Muppalaneni ve Omidian, 2013).

2.2.2.2. Polivinil asetat (PVAc)

PVAc, vinil asetatın polimerizasyonu ile sentezlenen renksiz ve genellikle toksik olmayan, biyobozunur termoplastik bir yapıştırıcıdır. PVAc, 1912 yılında Almanya'da Dr. Fritz Klatte tarafından keşfedilmiştir. En yaygın olarak kullanılan su dispersiyonlu yapıştırıcılardan biridir (Kaboarani ve Riedl, 2015). Polivinil asetatın polimerizasyon derecesi 100 ila 5000 arasında değişkenlik göstermektedir. Polivinil asetat, yaygın olarak ahşap tutkalı, beyaz tutkal, marangoz tutkalı veya PVAc tutkalı olarak adlandırılan bir tutkal türünün bir bileşenidir. PVAc'nin kimyasal yapısı Şekil 2.19'da gösterilmiştir.



Şekil 2.19. PVAc kimyasal yapısı

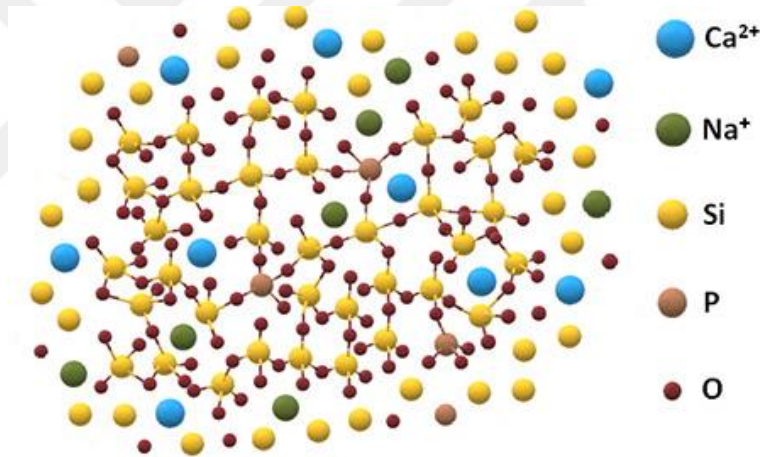
Sert homopolimer PVAc kağıt kaplamalarda, boyalarda ve diğer endüstriyel kaplamalarda, cam elyaflarında dokunmamış kumaşlarda, hijyenik pedlerde, filtrede, kağıt ve tekstil terbiyesinde bağlayıcı olarak kullanılır (Ghanbarzadeh ve Almasi, 2013).

3. BİYOSERAMİK MALZEMELER

3.1. Biyoaktif Camlar

3.1.1. Biyoaktif cam keşfi ve tarihçesi

Biyoaktif cam ilk olarak 1969 yılında Florida Üniversitesi'nde Profesör olan Larry Hench tarafından keşfedildi. Profesör Hench, bir ABD Ordusu albayı ile konuşması esnasında albayın kendisine, insan vücudunun kötü koşullar altında hayatta kalabilmesi için materyallerin geliştirilip geliştirilemeyeceğini sorması üzerine kemik dokuya alternatif bir malzeme bulma çalışmalarına başladı. Profesör Hench, $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ sisteminde, kalsiyum içeriği yüksek bileşime sahip bozunabilir bir cam yapmaya karar verdi. "Bioglass®" adı, Florida Üniversitesi tarafından orijinal 45S5 kompozisyonunun ticari marka adı olarak kullanılmaya başlandı (Jones, 2013). 45S5 biyoaktif camın kimyasal yapısı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 45S5 Biyoaktif camın kimyasal yapısı (Spirandeli vd., 2021)

1972 yılında biyoaktif camın maymun kemik parçalarına ve kaplanmış femoral gövdesine bağlanması; 1975 yılında ise koyun kalça implantlarına biyoaktif cam kaplı alümina kemik yapıştırılması denenmiştir. 1981 yılında 45S5 biyoaktif cama bağlanan yumuşak bağ dokusu keşfedilmiş; 1985 yılında ise FDA tarafından 510 (k) prosesiyle onaylanan ilk tıbbi ürün geliştirilmiştir. (Hench, 2013).

3.1.2. Biyoaktif camların bileşimi

Biyoaktif camın keşfinden sonraki son 40 yılda, çok sayıda farklı biyoaktif cam bileşiminin araştırılması ve geliştirilmesine başlandı. Bileşim açısından biyoaktif camlar, silikat bazlı biyoaktif camlar, fosfat bazlı biyoaktif camlar, borat bazlı biyoaktif camlar ve katkılı biyoaktif camlar olarak gruplandırılabilir. Ticari olarak bulunan bazı biyoaktif camların bileşimleri Tablo 3.1'de gösterilmektedir (Li, 2015).

Tablo 3.1. *Tipik biyoaktif camların % bileşimleri (Rahaman vd., 2011)*

Biyoaktif cam	Na₂O	K₂O	MgO	CaO	SiO₂	P₂O₅	B₂O₃
45S5	24,5	-	-	24,5	45,0	6,0	-
13-93	6,0	12,0	5,0	20,0	53	4,0	-
58S	-	-	-	32,6	58,2	9,2	-
70S30C	-	-	-	28,6	71,4	-	-
13-93B1	5,8	11,7	4,9	19,5	34,4	3,8	19,9
13-93B2	5,5	11,1	4,6	18,5	-	3,7	56,6
42S5	26,3	-	-	29	42,1	2,6	-
55S4	21,5	-	-	23,8	52,1	2,6	-
40S5B5	24,5	-	-	24,5	40	6	-

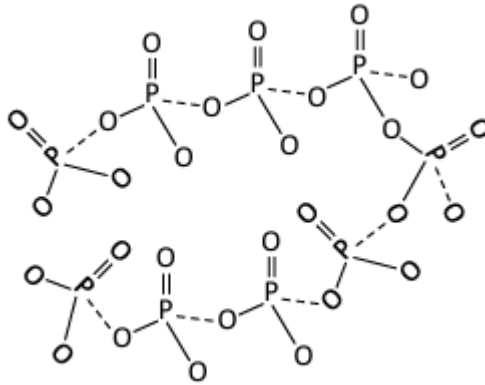
3.1.2.1. Silikat bazlı biyoaktif camlar

45S5 cam, silisyumun oksijene dört kat koordine edildiği 3-D cam oluşturan SiO₂ ağına sahip bir silika camdır. 45S5 camın biyoaktivitesini etkileyen temel bileşim özellikleri, düşük SiO₂ içeriği, yüksek Na₂O ve CaO içeriği ve yüksek CaO/P₂O₅ oranıdır. 45S5 cam, biyoaktif cam için altın standart olmasına rağmen bir iskele malzemesi olarak bazı dezavantajları vardır. Bunlardan biri, 45S5 camını gözenekli 3-D doku iskelelerinin yapısı içine dahil etme zorluğudur. Gözenekli biyoaktif cam doku iskeleleri, cam parçacıklarının sinterlenmesi ve parçacıkların, iç içe geçen bir gözenek ağı içeren güçlü bir cam fazına bağlanmasıyla hazırlanır. Oluşan iskeleler genellikle düşük mukavemete sahiptir. 45S5 camın bir diğer dezavantajı, yavaş bozunma hızı ve HA benzeri bir malzemeye dönüşmesidir, bu durum iskelenin bozunma hızının yeni doku oluşum hızıyla eşleşmesini zorlaştırır (Rahaman vd., 2011).

“13-93” olarak adlandırılan bir başka popüler biyoaktif cam, 45S5 bileşimine dayanmaktadır, ancak farklı olarak nispeten daha yüksek bir SiO_2 içeriğine ve K_2O ve MgO 'ya sahiptir. 13-93 cam viskoz bir akış davranışına sahiptir ve 45S5 BG'ye göre daha düşük kristallenme eğilimi gösterir. 13-93 cam, 45S5 BG'den daha yavaş bozunur, bu da bazı uygulamalar için dezavantaj oluşturabilir. Ancak genel olarak bakıldığında bu iki tip silikat bazlı biyoaktif camın her ikisinin de in vitro hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklediği, in vivo olarak kemik oluşumunu arttırdığı bilinmektedir (Li, 2015). 45S5 ve 13-93 camlara ek olarak, 58S ve 70S30C gibi camlar da silikat bazlı biyoaktif camlar sınıfında bulunmaktadır.

3.1.2.2. Fosfat bazlı biyoaktif camlar

Fosfat bazlı biyoaktif camların, yapılarında cam oluşturuçu olarak P_2O_5 ve değiştirici olarak CaO ve Na_2O bulundurmaktadır. Bu biyoaktif camlar asimetrik $[\text{PO}_4]$ tetrahedron yapısal birimi içerir (Li, 2015). Sahip oldukları bu asimetri, P-O-P bağlarının hidrasyonunun kolaylığı ile birlikte düşük dayanıklılıklarının kaynağını oluşturur. Fosfat camları rejeneratif tıp alanında büyük potansiyele sahiptir (Kaur vd., 2014). şekil 3.2’de fosfat bazlı biyoaktif cam ağ yapısı gösterilmiştir.



şekil 3.2. P-O-P köprüleri aracılığıyla bağlı tetrahedron yapıya dayalı fosfat bazlı bir cam ağı (Munoz vd., 2019)

Fosfat bazlı biyoaktif camlar, gümüş, bakır, çinko ve galyum gibi antibakteriyel iyonların kontrollü ilaç salınım araçları olarak kullanılmıştır. Buna ilave olarak lifler halinde olmaları kullanıldıkları yerlere esneklik kazandırmıştır. Bu özellikleri sayesinde sinir sistemi rejenerasyonunda kullanımları bir potansiyel oluşturmaktadır (Li, 2015).

3.1.2.3. Borat/borasilikat bazlı biyoaktif camlar

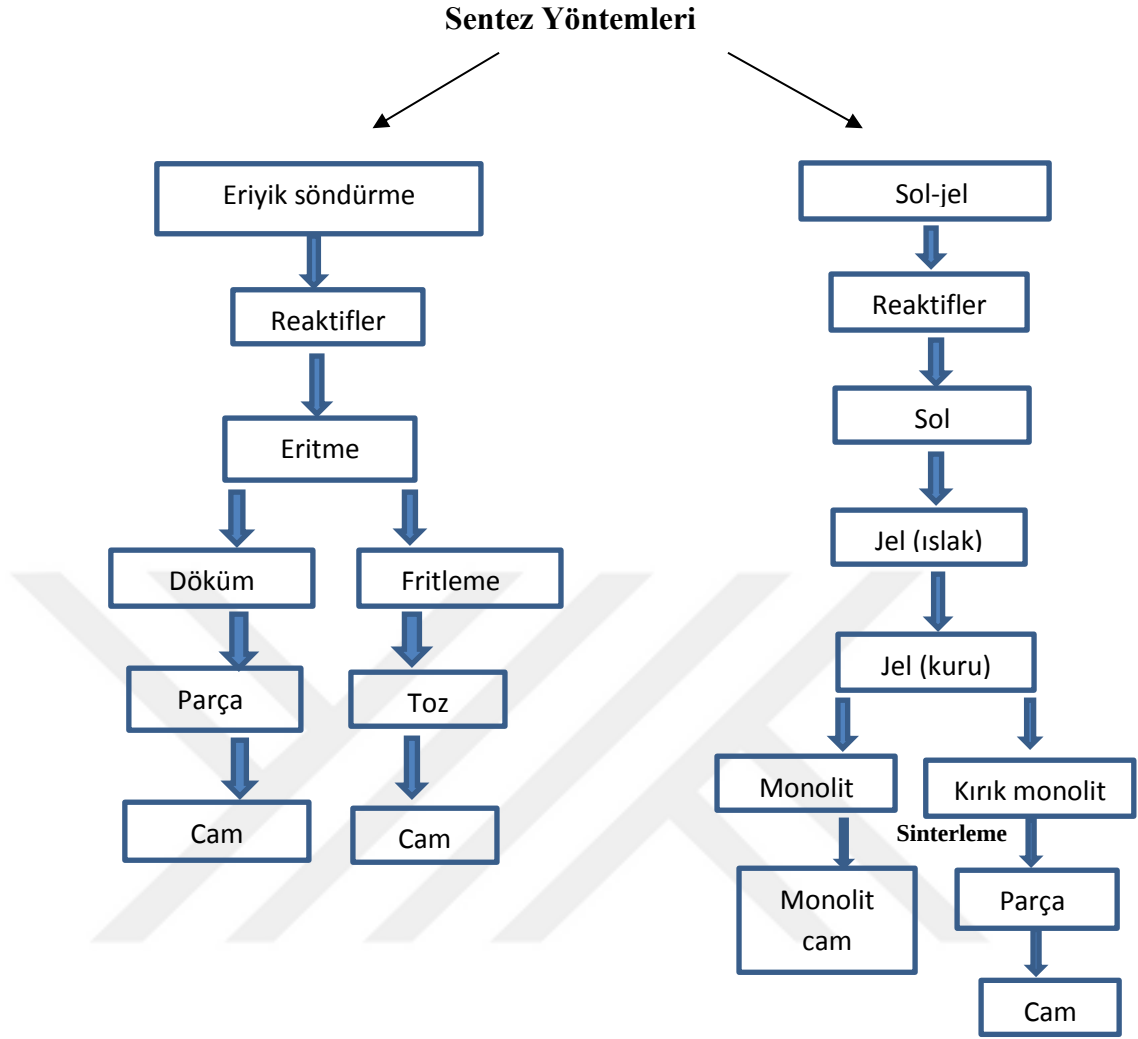
B₂O₃ ilavesinin camların karakteristik termal, yapısal ve mekanik özellikleri üzerinde önemli bir etkisi vardır (Balasubramanian vd., 2018). Borat camları çok reaktiftir ve daha düşük kimyasal dayanıklılığa sahiptir, bu nedenle silika bazlı biyoaktif camlara göre daha hızlı bir şekilde HA'ya dönüşürler (Kaur vd., 2014). Bu camların çözünürlüğü, bileşimleri değiştirilerek kontrol edilebilir. Bu nedenle bu camlar absorbe edilebilir materyaller olarak özellikle ilaç taşınımı gibi klinik uygulamalarda kullanılmaktadırlar (Rahaman vd., 2011).

3.1.2.4. Katkılı biyoaktif camlar

Camın bileşimi; camı biyolojik olarak bozunur hale getirmek için cam bileşimindeki ek katkı maddeleri kullanılarak değiştirilebilir. Biyoaktif camların özellikleri Cu, Zn, In, Ba, La, Y, Fe, Cr ve Sr gibi elementler kullanılarak modifiye edilmiştir. Ayrıca gümüş katkılı biyoaktif cam bileşimlerinin, biyoaktif işlevlerini korurken aynı zamanda antibakteriyel özelliklere de sahip oldukları bilinmektedir (Kaur vd., 2014).

3.1.3. Biyoaktif cam üretimi

Biyoaktif camların üretimi için hem melt-quenching (eriyik söndürme) hem de sol-jel prosesleri kullanılmaktadır. Bu proseslerin işleyiş mekanizması şematik olarak Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. *Biyoaktif cam sentez yöntemleri (Kaur, 2016)*

3.1.3.1. *Eriyik söndürme yöntemi*

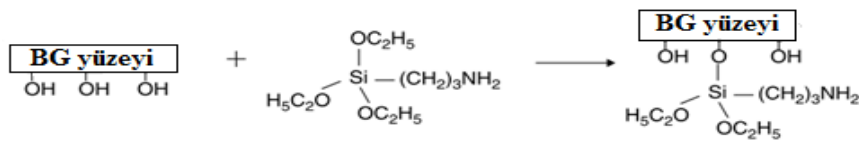
Eriyik söndürme tekniği, biyoaktif cam üretimi için en yaygın tekniktir. Prosedür silika, kalsiyum, fosfat ve sodyum oksitlerin 1300 °C üstünde platin bir potada eritilmesini ve bir grafit kalıpta (çubuklar veya monolitler için) veya suda (frit) söndürülmesini içerir. İlk olarak, malzemeler bir bilyalı değirmende toz haline getirilir. Öğütülmüş karışım daha sonra bir fırında eritilir ve eritilmiş malzeme, çubuk/silindir veya istenen başka herhangi bir şekli üretmek için kalıplara dökülür. Camlardan iç gerilimleri uzaklaştırmak için, su verilmiş camın 500°C'de tavllanması gerekmektedir (Kaur, 2016).

3.1.3.2. Sol-jel yöntemi

Sol-jel yönteminde hidroliz oranı, jelleşme süresi, yaşlandırma, kurutma ve kalsinasyon sıcaklığı gibi parametreler nihai ürünün özelliklerini etkilemektedir. Bu yöntem bu değişkenleri ayarlama imkanı sunduğundan, gözenekli biyoaktif camların sentezlenmesi için kolay ve oldukça verimli bir yöntemdir. Geleneksel yöntem ile karşılaştırıldığında sol-jel sentezi yöntemi daha düşük sıcaklıkta daha yüksek saflıkta, yüksek spesifik yüzey alanına ve gözenekli yapıya sahip camların üretilmesine imkan verir (Zhong ve Greenspan, 2000). Sol-jel türevli camların yüksek gözenekliliği ve yüksek spesifik yüzey alanına sahip olması bozunurluk ve biyoaktivite özelliklerinin iyileşmesine, ancak diğer taraftan daha düşük mekanik dayanıma sebep olur (Ma vd., 2010). Sol-jel yöntemi kullanılarak elde edilen camlar, kontrollü ilaç taşınımı ve kemik dokusu rejenerasyonu gibi uygulamalarda biyoaktif materyaller olarak kullanılmaktadır (Roberto vd., 2003).

3.1.4. Biyoaktif cam modifikasyonu

Modifikasyon, yüzey özelliklerini kontrol etmek, mevcut yüzeyi biyolojik uygulama için istenilen düzeye dönüştürmek için uygulanan bir yöntemdir. Biyoaktif camın yüzey özelliklerini iyileştirebilmek için silanlama yöntemi uygulanmaktadır (Chang ve Zhou, 2018). Biyoaktif cam (BG) yüzeyinde oluşan silika jel tabakası, kemik ile BG'lerin bağlanması için ilk adım olarak kabul edilir. Silika tabakası üzerinde, zamanla HA'ya dönüşen amorf bir Ca-P fazı çöker (Gao vd., 2011). Bu nedenle silanizasyon kavramı, BG'lerin yüzey modifikasyonu için önemlidir. Yaygın toksik olmayan protein bağlayıcı ajanlarından biri 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) biyolojik implantlarda protein bağlanmasını ve hücre büyümesini teşvik etmek için BG'lerin yüzeyini silanize etmede kullanılır (Howarter ve Youngblood, 2006). APTES ile yüzey modifikasyonundan sonra, eklenen amino grupları protein aşılama için kullanılabilir. Ayrıca osteoblastların modifiye edilmiş cam-seramik yüzeylerde daha iyi çoğaldığı gözlenmiştir. Şekil 3.4'te APTES ile BG yüzey modifikasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.4. APTES ile BG yüzey modifikasyonu prosesi

3.1.4.1. Biyoaktif cam modifikasyonu ile ilgili literatür çalışmaları

Biyoaktif camın yüzey modifikasyonu ile ilgili yapılan literatür çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

Chen ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada modifiye edilmiş biyoaktif cam ile PLGA kompozitlerini hazırlamış ve karakterizasyonlarını yapmışlardır. . Bu kapsamda γ -aminopropil trietoksisilan (γ -APTES) bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. Hidrolize bir γ -APTES (ağırlıkça% 1) çözeltisi, 95:15 etanol-su karışımına γ -APTES ilave edilerek ve 30 dakika karıştırılarak hazırlanmıştır. Biyoaktif cam tozu, γ -APTES çözeltisi içinde karıştırılarak dağıtılmıştır. 1,5 saatlik karıştırma işlemi sonrası, biyoaktif cam süspansiyon çözeltisi süzölmüş, daha sonra vakumlu etüvde 25 °C'de 24 saat süre ile kurutulmuştur. Hazırlanan kompozitlerin mekanik özellikleri üç nokta eğme testi ile karakterize edilmiş ve ayrıca in vitro biyoaktiviteleri incelenmiştir. Saf PLGA film ile karşılaştırıldığında, silanlanmış biyoaktif camın kompozitlerin film yüzeylerinde apatit oluşumunu tetiklediği gözlenmiştir (Chen vd., 2010).

Zhou ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, biyoaktif cam yüzeyine uygulanan modifikasyon işleminin PLA/biyoaktif cam kompozitler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sol-jel yöntemiyle elde edilen biyoaktif cam partiküllerine APTES ile silanlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Modifikasyondan sonra düzgün çok köşeli BG parçacıkları oluşturulmuştur. Modifiye edilmiş BG kullanılarak elde edilen kompozitlerin, modifiye edilmemiş BG kullanılarak hazırlanan kompozitlere göre eğilme dayanımı, eğilme modülü ve eğilme dayanımı gibi mekanik özelliklerinin daha iyi olduğu görülmüştür (Zhou vd., 2012).

Gao ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, modifiye edilmiş biyoaktif cam katılarak hazırlanmış PLLA kompozit filmler incelenmiştir. Modifikasyon işlemi için BG etil alkol-su karışımına eklenmiş ve ultrasonik işleme tabi tutulmuştur. Etil alkol uzaklaştırıldıktan sonra dodesil alkol ve katalizör olarak da paratoluensülfonat eklenmiştir. 260 °C'de karıştırıldıktan sonra partiküller santrifüj ile ayrıştırılmış daha sonra vakumda kurutulmuştur. Modifiye edilmiş biyoaktif cam ile hazırlanan kompozit filmlerin, modifiye edilmemiş filmlerle karşılaştırıldığında daha düzgün bir partikül dağılımına ve gelişmiş mekanik mukavemete sahip olduğu gözlenmiştir.

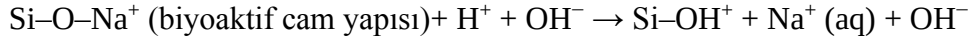
Sonuçlar incelendiğinde biyoaktif camların yüzey modifikasyonunun, kompozit filmlerin genel özelliklerinin iyileştirilmesinde oldukça etkili olduğunu göstermiştir (Gao ve Chang, 2009).

Oi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, nano biyoaktif camın (NBG) eteniltrimetoksisilan ile modifikasyonunun PLGA/PTMC (poli (laktit-ko-glikolid)/poli (trimetilen karbonat)) kompozitinin fizikokimyasal ve mekanik özellikleri ile in vitro biyoaktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. NBG, yaklaşık 40 dakika boyunca ultrasonik işlem kullanılarak 100 mL susuz etanol ve damıtılmış su karışımı içinde karıştırılmıştır. Diğer taraftan 2 g YDH171 (eteniltrimetoksisilan) etanol/deiyonize su karışımına ilave edilmiş ve 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra NBG çözeltisine eklenmiştir. Bundan sonra, karışım NaOH çözeltisi (1 M) kullanılarak pH=10'da sabitlenip, 80 ° C'ye ısıtılmış ve 10 saat boyunca bekletilmiştir. Son olarak, modifiye NBG distile su ile yıkanmış ve 48 ° C'de vakumlu etüvde 48 saat süre ile kurutulmuştur. Sonuçlar, yüksek miktarlarda YDH 171'in PLGA/PTMC kompozitinde aglomerasyona neden olduğunu ve zayıf mekanik özelliklere yol açtığını göstermiştir. Ağırlıkça % 5 silanlı NBG içeren kompozitin tüm üçlü kompozitler arasında en gelişmiş mekanik özelliklere ve kristalizasyona sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, iyi biyomineralizasyon ve biyouyumluluk göstererek kemik dokusu mühendisliğinde etkili bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Oi vd., 2020).

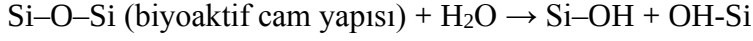
3.1.5. Biyoaktif camın biyoaktivitesi

45S5 biyoaktif cam, yapısındaki çözünür silika ve diğer iyonik türlerin salınımı ile yüksek yüzey alanı ve hidroksikarbonapatit tabakalarının gözenekliliği sayesinde kemik dokusunun çoğalması üzerinde hücre içi ve hücre dışı etkilere sahiptir (Oonishi vd., 2000). İmplant-doku bağının oluşumundaki ilk önemli olay, materyalin yüzeyinde hem in vitro hem de in vivo gözlemlenen, karbonatlı hidroksiapatit benzeri (HCA) bir tabakanın oluşmasıdır. Bu tabakanın oluşum aşamaları şu şekildedir:

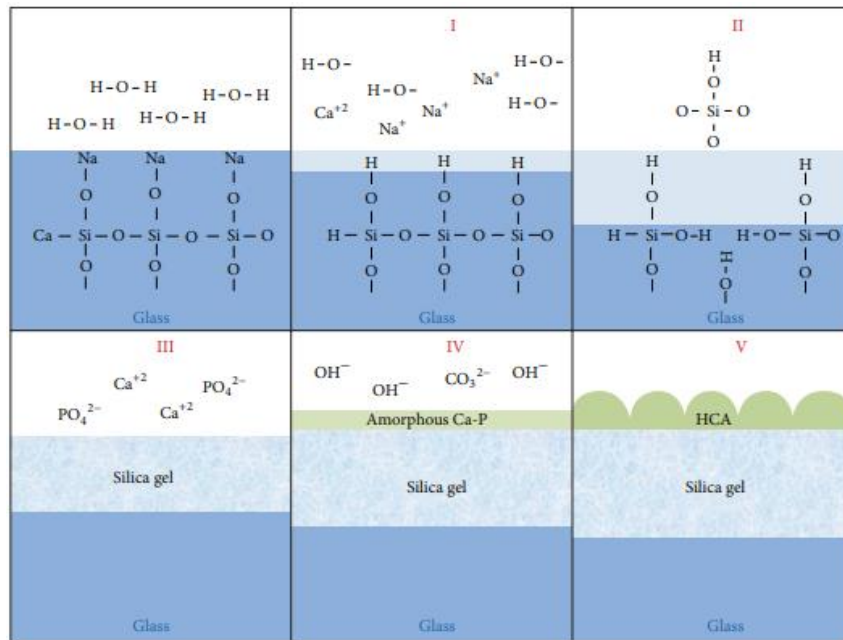
1. Malzemedeki Ca^{2+} ve Na^+ iyonları ile vücut sıvısında bulunan H^+ ve H_3O^+ iyonları arasında iyon değişimi meydana gelir. Silanol bağları (Si-OH) malzemenin yüzeyinde birikmeye başlar. Alkali iyonların salınması nedeniyle çözelti pH'ında bir artış gözlenir ve camın yüzeyinde silikadan zengin bir tabaka oluşur (Rahaman vd., 2011).



2. Yüksek pH değeri, OH^- gruplarının etkilediği O-Si-O bağlarının kopmasına yol açar. Çözünür silika, Si(OH)_4 formunda salınır ve silanol grupları malzemenin yüzeyinde oluşmaya devam eder (Rahaman vd., 2011).



3. Na^+ ve Ca^{2+} iyonları bakımından fakir, amorf silika açısından zengin bir tabaka yüzeyde yoğunlaşmaya başlar. Bu tabakanın kalınlığı 1-2 μm arasında değişmektedir (Fiume vd., 2018).
4. Ca ve P grupları hem camdan hem de çözeltiden ayrılarak silika bakımından zengin tabakaya doğru yer değiştirir. Bu katman üzerinde, amorf kalsiyum fosfattan (ACP) oluşan ikinci bir katman oluşur (Jones, 2013).
5. Hidroksil ve karbonatlı gruplar çözeltiye katılırken, camın çözünme işlemi yüzeyden başlayarak devam eder. Amorf tabaka kristalleşir ve HCA olur. Elde edilen yüzey, fizyolojik kemik dokusunun nano-kristal mineral fazına hem bileşimsel hem de yapısal açıdan çok benzerdir. Bu sebeple implantın canlı dokuya doğrudan bağlanmasına izin verir (Fiume vd., 2018). Şekil 3.5'te bu aşamalar şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Vücut sıvılarıyla temas halinde olan biyoaktif bir camın yüzeyinde hidroksikarbonat apatit (HCA) oluşum mekanizması (Renno vd., 2013)

3.1.6. Doku mühendisliği uygulamalarında biyoaktif cam

Doku mühendisliği (TE); yaralanma, patoloji veya yaşlanma sürecinden kaynaklanan hasarlı biyolojik dokuları onarmayı ve yenilemeyi amaçlayan modern bir yaklaşımdır. Bu stratejiler, hem in vivo hem de in vitro prosedürleri kullanarak fonksiyonel dokunun büyümesini teşvik etmek için doğal ekstraselüler matriksi (ECM) simüle edebilen biyouyumlu dokuların geliştirilmesine dayanmaktadır (Lanza, Langer, Vacanti, 2011). Fonksiyonel 3D yapı iskelelerinin üretimi için kullanılacak malzemeler içinde biyoaktif camlar bu uyumu sağladığı için ve diğer biyolojik/mechanik özellikleri sebebiyle TE uygulamalarında tercih edilmektedir. Kemik ve kıkırdak gibi kas-iskelet dokuları uzun süredir TE araştırmalarına konu olmakta ve her yıl yeni malzemeleri ve yeni iskele tasarımlarını test etmek için yeni deneysel protokoller ve klinik denemeler yapılmaktadır (Karp, Dalton, Shoichet, 2003)

BG'ler, biyoaktif inorganik malzemeler ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden oluşan kompozitler güçlü bir bağlanma arayüzü oluşturarak fizyolojik ortamla çok etkili bir şekilde reaksiyona girme yetenekleri nedeniyle kemik doku iskeleleri için seçilmiş biyomalzemelerdir (Gerhardt ve Boccaccini, 2010). İnsan süngerimsi ve kortikal kemiğinin mekanik özelliklerinin 45S5 Bioglass® ile karşılaştırılması Tablo 3.2'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. 45S5 BG bileşimine kıyasla süngerimsi ve kortikal kemiğin mekanik özellikleri (Gerhardt ve Boccaccini, 2010)

Mekanik özellik	Süngerimsi kemik doku	Kortikal kemik doku	45S5 BG
Basma dayanımı (MPa)	0,1-16	130-200	500
Çekme dayanımı (MPa)	-	50-151	42
Basma elastik modülü (GPa)	0,12-1,1	11,5-17	-
Young modülü (GPa)	0,05-0,5	7-30	35

3.1.7. PLGA/BG doku iskelesi ile ilgili literatür çalışmaları

Valanezhad ve arkadaşları bu çalışmada kemik dokusu rejenerasyonu için potansiyel bir iskele olarak poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kaplama ile biyoaktif cam (BG) doku iskelesinin mekanik özelliklerini iyileştirmeyi amaçlamışlardır. İlk olarak poliüretan (PU) köpük, sol-jel yöntemiyle elde edilmiş bir BG çözeltisine daldırılmıştır. Isıl işlem PU köpüğü uzaklaştırmak için 450°C'de; camı konsolide etmek ve nitrat gruplarını uzaklaştırmak için 860°C'de gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan BG doku iskeleleri daha sonra ağırlıkça %10 ve %15 PLGA çözeltisine daldırılmıştır. Kaplamasız BG iskelesi, DTA/TGA, XRD, SEM ve TEM ile karakterize edilmiştir. PLGA kaplı yapı iskeleleri, SEM kullanılarak karakterize edilmiş ve numunelerin basma dayanımları ölçülmüştür. Sonuçlara bakıldığında, DTA/TGA ve XRD analizleri, 700°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda tüm nitrat gruplarının uzaklaştırıldığını ve ayrıca 800°C'den sonra BG'nin kristalleştiğini göstermiştir. %10 ve %15 PLGA kaplı iskelelerin ortalama basınç dayanımı sırasıyla 1.36±0.39 ve 1.95±0.70 MPa olarak bulunmuştur. Ayrıca, PLGA kaplamanın; iskelede meydana gelen çatlamları destekleyerek sol-jel türevli BG iskelesinin elastikiyetini artırdığı ve kırılma dayanımını giderdiği de sonuçlar arasındadır (Valanezhad vd., 2021).

Kunwong ve arkadaşları bir başka çalışmada kemik dokusu rejenerasyonu için farklı oranlarda poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve biyoaktif cam ile kompozit bir iskele geliştirmeyi amaçlamışlardır. PLGA-biyoaktif cam doku iskeleleri, farklı biyoaktif cam yüzdeleri (ağırlıkça %10 ve %15) ile partikül uzaklaştırma tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Elde edilen doku iskeleleri, taramalı elektron mikroskobu ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (SEM-EDS), su temas açısı, mekanik ve pH analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. İskelelerin biyouyumluluğu, insan süt dişlerinden (SHED) alınan kök hücreler ve sıçan deneyleri ile araştırılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde %10 biyoaktif cam içeren doku iskelesinin, artan gözenek boyutu, hidrofiliklik ve mekanik özellikler dahil olmak üzere pek çok olumlu özellik sergilediğini göstermiştir. Tüm iskelelerin biyouyumlu olduğu ve %10 biyoaktif cam içeren kompozit iskelenin, diğer iskelelere kıyasla SHED içinde daha iyi tutunma, büyüme ve çoğalma gösterdiği görülmüştür (Kunwong vd., 2021).

Ensoylu ve arkadaşları, kemik doku mühendisliği uygulamaları için tungsten disülfid (WS_2) nanoparçacık içeren polimer kaplı biyoaktif cam kompozit doku iskeleleri üzerine çalışmışlardır. Poli- ϵ -kaprolakton (PCL) ve poli (D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA), polimer köpük replikasyon yöntemi ile üretilen biyoaktif cam iskelelerin yüzeyine uygulanmıştır. Sonuçlar, polimer içerisindeki WS_2 nanoparçacıkların (ağırlıkça % 0,1 - 2), hazırlanan doku iskelelerinin sıkıştırma mukavemetini ve simüle vücut sıvısında in vitro biyoaktivitelerini geliştirdiğini ortaya koymuştur. SEM analizi, hücrelerin iskele yüzeyine bağlı olduğunu ve birbirine bağlı gözenekli ağ boyunca yayıldığını göstermiştir. Gentamisin yüklü yapı iskelelerinin, kaplama tabakasına uygulanan polimerin tipine bağlı olarak kontrollü bir ilaç salma davranışı sergilediği ve WS_2 nanoparçacıklarının varlığının, doku iskelelerinin ilaç salım davranışını arttırdığı görülmüştür. Çalışmada üretilen biyoaktif cam esaslı kompozitlerin kemik doku mühendisliği amaçlı kullanım potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Ensoylu, Deliormanlı, Atmaca, 2021).

Diyabetli hastalarda kemik defektlerinin onarımının tedavisi, inhibe edilmiş osteogenez nedeniyle zordur. Chen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, yüksek glikozun bu süreçte önemli bir rol oynayan GSK-3 β aktivasyonunu etkilediğini bulmuşlardır. Bu sayede lityum iyonlarının osteojenik etkisi kanıtlanmıştır. Bu nedenle, lityum içeren mezo gözenekli biyoaktif camlar (Li-MBG) sentezlenmiş ve yüksek glikoz altında mezankimal kök hücre proliferasyonu, göçü ve osteojenik farklılaşması araştırılmıştır. Li-MBG / PLGA kompozit yapı iskeleleri 3D baskı ile hazırlanmış, ardından diyabetli farelerin kritik kafatası kusurlarının onarımı üzerindeki in vivo etkileri gözlenmiştir. Sonuç olarak Li-MBG/PLGA kompozit yapı iskelelerinin, kök hücreleri toplayarak mükemmel bir osteogenez etkisi sunarak diyabetli farelerin kafatası kusurlarını etkili bir şekilde onarabildiği görülmüştür (Chen vd., 2022).

Tian ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mikro-nano biyoaktif cam ile poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) bazlı in vitro osteogenez ve anjiyogenez kapasitesine sahip biyoaktif mikro-nano kompozit yapı iskelelerini freze-casting yöntemiyle üretmişlerdir. Sonuçlar, BG ilavesinin gözenek boyutunu ve basma modülünü arttırdığını, gözenekli PLGA doku iskelelerinin fizyolojik stabilitesini ve apatit oluşturma yeteneğini geliştirdiğini göstermiştir. İn vitro çalışmalarda PLGA-BG gözenekli yapı iskelesinin fare kemiği mezenkimal kök hücrelerinin (mBMSC'ler) bağlanmasını, çoğalmasını ve osteogenez belirteci (ALP) geliştirebileceği görülmüştür (Tian vd., 2019).

Karl ve arkadaşları, biyoaktif cam (BG) mikro küre tozlarının lazer sinterlemesi (LS) yöntemi ile hazırlanarak gözenekli poli (laktit-ko-glikolit)/biyoaktif cam kompozit doku iskelelerinin elde edilmesini ve karakterizasyonunu araştırmışlardır. Doku iskeleleri ağırlıkça %50'ye kadar değişen BG oranları ile solid-in-oil-in-water emülsiyon yöntemiyle üretilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında farklı makro/mikro yapılar içeren BG tozlarına lazer sinterleme uygulanarak elde edilen gözenekli kompozit parçacıkların üretimi yapılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), X-ışını floresansı (XRF), termal gravimetrik analiz (TGA), parçacık boyutu dağılımı (PSD) ve X-ışını tomografisi kullanılarak karakterizasyon yapılmıştır. Gözenekli partikül tozlarının, toplam gözeneklilikleri %73,7 ile %76,1 arasında değiştirdiği görülmüştür ve sonuç olarak ekstra gözenekli yapılar üreten lazer sinterleme deneyleri için hammadde olarak kullanımını rapor edilmiştir (Karl vd., 2019).

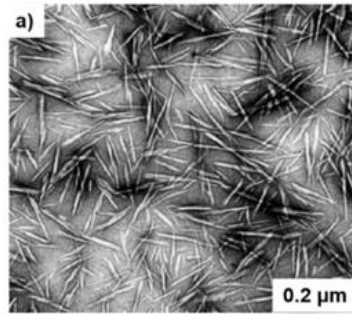
4. NANOSELÜLOZ

4.1. Nanoselüloz Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Yeryüzünde miktar olarak en bol bulunan polimer olan selüloz yenilenebilir, biyobozunur bir malzemedir. Ayrıca toksik değildir. Selülozu elde etmek için önce bitki liflerinden saflaştırılması gerekmektedir bu da, alkali ekstraksiyonu ve ağartmadan oluşan kimyasal işlemleri içerir (Dufresne, 2013). Nanoselüloz (NC), selülozdan ekstrakte edilebilen doğal bir elyafıdır. 1980'lerin başında keşfedilen nanoselüloz, üretiminde ilk zamanlarda lifleri katmanlara ayırmak için gereken yüksek miktarda enerji nedeniyle ticarileşme amacını kaybetmiştir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar ışığında NC'ye olan ilgi artmış ve selüloz liflerinden üretimi için enerji tasarrufluyöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır (http-7).

NC boyutlarına bakıldığında çapı 100 nm'den az ve uzunluğu birkaç mikrometredir. Nanoselüloz, düşük yoğunluklu (yaklaşık 1,6 g/cm³) ve yüksek mukavemet özelliğine sahip, biyobozunur bir nanofiberdir. Ayrıca nanoselüloz şeffaftır ve çeşitli yüzey özelliklerine göre işlevselleştirilebilen hidroksil gruplara sahiptir (Phanthong vd., 2018). Kağıt tabakalarının mukavemetinin temeli olan bu özellik, ana polimer matrisi içinde yük taşıyan yapıları oluşturur (Dufresne, 2013). Nanoselüloz üç grupta sınıflandırılabilir; nanokristalin selüloz, nanofibrillenmiş selüloz ve bakteriyel nanoselüloz. Kimyasal bileşimleri bütün gruplarda benzer olsa da, kaynak ve ekstraksiyon yöntemlerinin farklılığından dolayı morfolojik yapıları, parçacık boyutu, kristallik ve bazı özellikler bakımından farklıdırlar (Moon vd., 2011).

Nanokristalin selüloz (CNC): İğne şeklindeki CNC'ler, biyosentez işlemi sırasında selülozun temel nanofibrilleri içindeki kristal bölgelerdir. Odun/bitki liflerindeki selülozun amorf bölgelerinden izole edilerek elde edilirler (Bai, Holbery, Li, 2009). Şekil 4.1'de nanoselüloz kristalinin TEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.1. Nanokristalin selüloz TEM görüntüsü (Habibi vd., 2008)

İzolasyon prosedürü, fibrillerin düzensiz (amorf) bölgeleri boyunca, hidroliz yoluyla asitle muamelesine dayanır ve asit hidrolizine direnen yüksek kristalli bölgeler bırakır (Habibi vd., 2010). Selüloz nanokristalleri düşük boyut oranlarına (100–500 nm uzunluk ve 10–50 nm genişlik) ve proses koşullarına bağlı olarak yüksek derecede kristallliğe (%50–90) sahiptir (Bras vd., 2011). Nanoselülozun membran filmler, elektronik cihazlar, antimikrobiyal filmler, emülsiyon stabilizatörleri gibi çeşitli alanlarda uygulamaları vardır. Ayrıca yaklaşık 150 GPa'lık bir Young modülüne sahip olmaları, kompozitler için çevre dostu takviye malzemeleri olarak tercih edilme sebepleri olmuştur (Tayeb vd., 2018). Tablo 4.1’de nanokristalin selülozun bazı özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *Nanoselülozun özellikleri*

Yoğunluk	1,5 g/cm ³ (Chauhan ve Chakrabarti, 2012)
Çekme dayanımı	7,5 GPa (Chauhan ve Chakrabarti, 2012)
Elastik modülü	120-143 GPa (Chauhan ve Chakrabarti, 2012)
Bozunma sıcaklığı	241 °C (Bardet vd., 2015)
Kristalinite	54-88 % (Kaur vd., 2021)

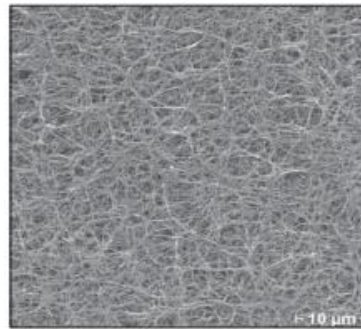
Nanofibril selüloz (CNF): CNF'ler, yüksek en/boy oranına sahip nano ölçekli fibrillerdir; genişlikleri 2 ila 60 nm arasında değişir (Hoeng, Denneulin, Bras, 2016). Ayrıca hem kristalin hem de amorf bölgelerinde %100 selüloz kimyasal bileşimi içerir (Phanthong vd., 2018). Nanofibril selüloz, uzun ve esnek bir nano malzeme olarak tanımlanır ve selüloz lifinden mekanik parçalanma ile elde edilir (Missoum, Belgacem, Bras, 2013). Bu işlem Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Nanofibrillenmiş selüloz elde etmek için tanımlanan klasik işlem (Missoum, Belgacem, Bras, 2013)

Nanokristal selüloz ile karşılaştırıldığında, nanofibrillenmiş selüloz, yüksek en boy oranı (uzunluk-çap), yüksek yüzey alanı ve yüzey modifikasyonu için kolayca erişilebilen yüksek kapsamlı hidroksil grupları ile daha uzun zincire sahiptir (Phanthong vd., 2018).

Bakteriyel nanoselüloz (BNC): Selülozik bir polimer olarak BNC, D-glukoz (dekstroz) yapı taşlarının tekrarlanan bağlantılarıyla moleküler olarak yapılandırılmıştır. Yüksek düzeyde hidroksil grubu işlevli, doğrusal katı zincirli homopolimer, belirgin hidrofiliklik, geniş kimyasal değiştirme kapasitesi ve önemli biyoyumluluk ile karakterize edilir (Gatenholm ve Klemm, 2010). BNC tekrar eden birimlerden oluşan çok uzun polimer zincirlerine ve % 80-90'lık belirgin bir kristalliğe sahiptir (Klemm vd., 2005). Şekil 4.3'te bakteriyel nanoselüloz TEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.3. Bakteriyel nanoselüloz TEM görüntüsü (Backdahl vd., 2006)

BNC, yumuşak dokuya benzeyen bir stres-gerilme davranışı sergiler. Mekanik özelliklerine bakıldığında 15-35 GPa Young modülüne ve 200-300 MPa çekme dayanımına sahiptir (Backdahl vd., 2008).

4.2. Nanoselüloz Hazırlama Teknikleri

4.2.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon ve mikroakışkanlaştırma

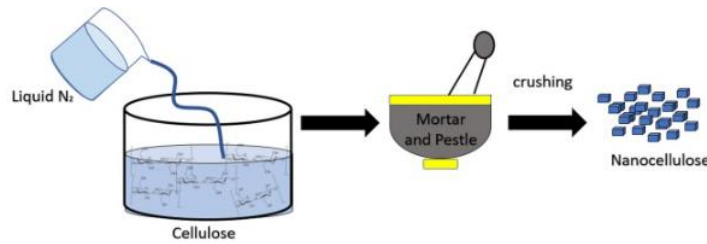
Yüksek basınçlı homojenizasyon, selüloz nanofibrillerin (CNF'ler) oluşumu için ticari olarak uygulanan bir tekniktir. Fibrillerin oluşumu, selülozik lifleri parçalayan yüksek basınç koşulları altında gerçekleşir. Homojenizasyon, verimli prosesi, solvent veya kimyasal içermemesi nedeniyle CNF'lerde üretim için pratik bir yaklaşımdır. Ancak yüksek enerji tüketimi, tıkanmalar gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Zinge ve Kandasubramanian, 2020).

4.2.2. Mikro öğütme ve frezeleme

Mikro öğütücüler, liflerin fibrilasyonu için kullanılan diğer mekanik yöntemlere bir alternatiftir. Selülozik liflerden oluşan bir bulamaç, kesme ve sürtünme hareketi kullanarak bulamacı parçalayan bir mikro öğütücüden geçer. Mikro öğütücüler, biri sabit olup diğeri dönerken, aralarındaki bulamacı keserek nano ölçekli lifler oluşturan iki öğütme taşından oluşur (Xie vd., 2018). Mikro öğütücüler, geleneksel olarak kullanılan yüksek basınçlı homojenizasyondan daha verimlidir, çünkü bu öğütücüler fibrilasyon için daha az enerji gerektirir. Frezeleme, bilyelerin çarpışma hareketi kullanılarak boyut küçültme amacıyla kullanılır (Xie vd., 2018).

4.2.3. Soğuk kırma

Soğuk kırma nanoselülozun üretilmesi için yararlanılan mekanik bir yöntemdir. Bu teknikte, lifler sıvı nitrojene maruz bırakılır, bir havan ve tokmağı yardımıyla açığa çıkan lifler nanomalzemeler oluşturmak için ezilir (Şekil 4.4) (Chakraborty vd., 2005). Bu yöntemle donmuş hücre duvarları yırtılır ve lifler parçalanarak 0,1–1 µm ölçeğinde çapa sahip lifler üretilir (Alemdar ve Sain, 2008).



Şekil 4.4. Soğuk kırma tekniği ile nanoselüloz üretimi (Zinge ve Kandasubramanian, 2020)

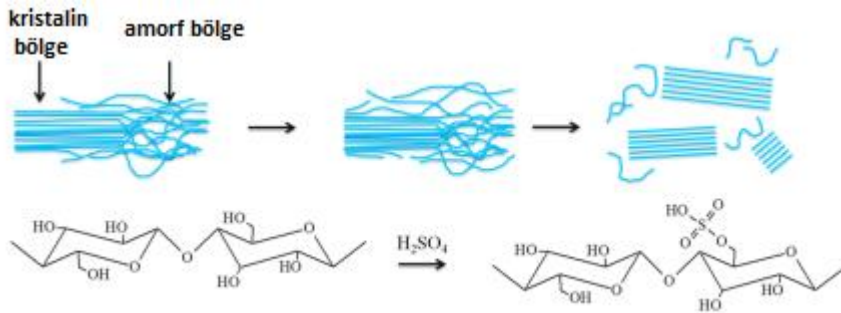
4.2.4. Elektropsining

Elektropsining, nano ölçekli liflerin hazırlanması için temel bir tekniktir. Bu teknik elektrik deşarjını kullanarak liflerin düşük maliyetli üretim ve güvenilirlikli üretiminde çok etkilidir. Elektropsining aparatı, bir voltaj kaynağı, bir şırınga pompası, bir plastik şırınga, bir iğne ve bir substrattan oluşur. Eğrilmiş lifler, substrattan toplanır. Voltaj kaynağı, iğne ile substrat arasında bir elektriksel potansiyel farkı yaratan yüksek bir akım üretir; bu, elyafların alt tabaka üzerine çekilmesi için itici güç görevi görür. Voltaj beslemesi sırasında, iğnenin ucunda bir çözelti damlası oluşur. Damlacık, yüzey gerilimi nedeniyle uçta durur ve voltaj yükseldikçe, elektrik potansiyeli yüzey geriliminininden fazla olmaya başlar, damlacık Taylor Konisi olan bir koni şekli oluşturur. Başlangıç aşamasında, püskürtülen madde düz bir çizgide ilerler, gerilme arttıkça çap küçülür ve çözücünün daha fazla buharlaşması mikro veya nano ölçekte bir çapa sahip liflerin oluşmasını sağlar (Zinge ve Kandasubramanian, 2020).

4.2.5. Asit hidrolizi

Asit hidrolizi, nanoselülozun kimyasal işlemler ile izolasyonu başlığı altında yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. Bu yöntemde, selülozda bulunan amorf bölgeleri bozan ve kristal bölgeleri ayıran güçlü asitler kullanır. Sülfürik asit (H_2SO_4), asit hidrolizinde kullanılan en yaygın kimyasaldır. (Liv vd., 2015)

Sülfürik asit hidrolizinin, sabit bir koşul altında tek bir kaynaktan eşit boyutlu CNC'ler ürettiği gösterilmiştir, ancak farklı selüloz kaynakları ve hidroliz koşullarında 3-70 nm genişlik ve 35-3000 nm uzunluklarda çok çeşitli boyutlarda CNC üretildiği de tespit edilmiştir (Jiang ve Hsieh, 2013). Şekil 4.5'te asit hidrolizi ile nanoselüloz eldesi gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Asit hidrolizi ile nanoselüloz eldesi (Rajinipriya vd., 2018)

4.3. Doku Mühendisliği Uygulamalarında Nanoselüloz

Bir biyomalzemenin 3D hücre kültürüne uygulanabilmesi için bir ekstraselüler matriks (ECM)'nin özelliklerini taklit etmesi gerekir. Bu teori kemik doku ve kırık doku mühendisliği vb. için geçerlidir. Mezenkimal kök hücrelerinin (MSC) yüksek çoğalma potansiyeline ve geniş farklılaşma kabiliyetine sahip olduğu düşünülmektedir. Biyomateryaller ve kök hücreler arasındaki etkileşim doku yenilenmesinin temelini oluşturmaktadır (Muñoz-Cánoves ve Huch, 2018).

Nanoselüloz (NC) yara iyileşimi, ilaç taşınımı, implantlar ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan bir malzemedir. Selülozun oluşturduğu üç boyutlu (3D) ağ, mekanik özellikleri ve potansiyel biyoyumluluğu gibi özellikleri ile çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir. NC'ler, yüksek kimyasal reaktiviteye sahip olmanın yanı sıra, kemik iliğinde bulunan nanoyapılı kollajeni taklit etme yeteneğine de sahiptir (Subhedar vd., 2021). NC'ler yüksek en-boy oranı, nano ölçekli boyutları, biyoyumluluğu, düşük sitotoksitesi ve yüksek gözenekliliği nedeniyle doku mühendisliği için kullanılan potansiyel bir malzeme olmuştur (Jorfi ve Foster, 2015).

BNC, çoğunlukla düşük sitotoksitesi ve yüksek gözenekliliği nedeniyle potansiyel doku mühendisliği için sıklıkla kullanılan bir malzeme olmuştur. Doku iskelelerinin yüzey gözenekliliği, yüzey topolojisi ve fiber yoğunluğu, hücre-biyomateryal etkileşimini ve dolayısıyla hücre davranışını etkileyen temel bileşenlerdir (Berti vd., 2013).

4.4. Doku Mühendisliğinde Nanoselüloz ile İlgili Literatür Çalışmaları

Nanoselüloz kullanılarak üretilen doku iskeleleri ile ilgili yapılan literatür çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

Lu ve arkadaşları (2019) hidroksiapatit (HA) modifiyeli nanoselüloz (NC) ile güçlendirilmiş polilaktik asit (PLA) ve kompozit özellikleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Farklı NC/HA oranlarının kompozit yapıların mekanik ve termal özellikleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Sonuçlara bakıldığında, NC'nin HA'ya oranı 30/70 olduğunda, kompozit filmin gerilme mukavemeti ve gerilme modülüsünün sırasıyla 45,6 MPa ve 2,34 GPa'ya ulaştığı görülmüştür. Termogravimetrik analiz sonuçları, saf PLA ile karşılaştırıldığında kompozitlerin termal stabilitesinin önemli ölçüde iyileştiğini göstermiştir. Sonuçlar, HA modifiyeli NC'nin PLA matrisi ile arasındaki arayüz uyumluluğunu önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir (Lu vd., 2019).

Radakisnin ve arkadaşları (2021), çözelti dökme tekniği ile hazırlanan yüksek gözeneklilikteki PLA/selüloz nanofiber (CNF) doku iskelelerinin fiziksel, termal ve mekanik özelliklerini incelemişlerdir. Ağırlıkça %5 -20 CNF kullanılmıştır. %90 oranında kullanılan porojenin uzaklaştırılması ile elde edilen doku iskelelerinin ortalama gözenek boyutu 67–137 μm ve gözenekliliği $> \%76$ 'dır. Ağırlıkça %15 CNF ilavesi basma dayanımını yaklaşık olarak %181 ve basma modülünü %210 oranında arttırmıştır (Radakisnin vd., 2021).

Tang ve arkadaşları (2017), biyobozunur poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ile ultrasonik olarak karıştırılmış (CNF) süspansiyonunun dondurarak kurutulmasıyla elde edilen doku iskeleleri üzerine çalışmışlardır. Doku iskeleri üzerine ekilen NIH 3T3 hücrelerinin agregasyon durumu ve canlılığı, sırasıyla SEM ve konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak gözlemlenmiştir. Sonuçlar farklı kütle oranlarına sahip doku iskelelerinin gözenekliliğinin %95'in üzerinde olduğunu ve doku iskelelerindeki gözenek boyutu dağılımının homojen olduğunu göstermiştir. İskelelerin mekanik mukavemetinin, CNF miktarı ile orantılı olarak arttığı görülmüştür. İki hafta boyunca doku iskeleleri üzerindeki kültürlenme işlemi sonrası, NIH 3T3 hücreleri iskeleye eşit şekilde bağlanmış ve canlı kalabilmiştir. Bu nedenle, CNF/PLGA nanokompoziti esaslı biyobozunur doku iskeleleri, hücre ekimi için uygun mekanik güce ve biyoyumluluğa sahiptir (Tang vd., 2017).

Mo ve arkadaşları (2015) yapmış oldukları çalışmada PLGA/CNC kompozit nanofiber membranlar üretmişlerdir. geliştirmek. PLGA ve kompozit nanofiber membranlar elektrospining yöntemi ile hazırlanmış ve hazırlanan membranların morfolojisi, termal ve mekanik özellikleri SEM, TGA, DSC ve mekanik analiz (DMA) ile karakterize edilmiştir. Nanofiber membranların sito-uyumluluğu ve hücresel tepkileri WST-1 testi, SEM ve konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) ile incelenmiştir. CNC'lerin (ağırlıkça % 1, 3, 5 ve %7) dahil edilmesi, hazırlanan nanofiber membranların ortalama fiber çapını 100 nm'den (saf PLGA) ~400 nm'ye (ağırlıkça %7 CNC içeren kompozit) arttırdığı görülmüştür. Ağırlıkça % 7 CNC içeren nanofiber membranın insan derisine benzer en iyi mekanik özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Hücre kültürü sonuçları, PLGA/CNC kompozit nanofiber membranların saf PLGA nanofiber membranlara kıyasla daha iyi sitouyumluluğa sahip olduğunu ve fibroblast yapışmasını, yayılmasını ve çoğalmasını kolaylaştırdığını göstermiştir (Mo vd., 2015).

5. DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE DOKU İSKELELERİ

5.1. Doku Mühendisliği Tarihçesi ve Gelişimi

Doku, organ ve hatta daha karmaşık canlı organizmaların yapay üretimi, insanlık tarihi boyunca bir hayal ürünü olarak kaldıysa da son yıllarda bu vizyon uygulanabilir hale geldi ve yakın zamanda klinik tıpta kullanılmaya başlandı (Meyer, 2009). Bu kapsamda doku mühendisliği, "hasarlı doku ve organların işlevini onaran, koruyan ve iyileştiren biyolojik ikamelerin geliştirilmesine yönelik mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir alan olarak tanımlanabilir. Multidisipliner bir bilim olarak doku mühendisliği; hücre biyolojisi, mühendislik, malzeme bilimi ve cerrahi alanlarını birleştirerek canlı hücreler ve doğal/yapay veya her ikisinin bir bileşimi olabilen bir matris veya doku iskelesi kullanarak yeni fonksiyonel dokular üretir (Chaignaud, Langer, Vacanti, 1997).

Tarihsel gelişimine bakıldığında ilk çağlarda eski Mısırlılar, vücut parçalarını eski haline getirmek ve inançları gereği yeniden canlanmaya olanak sağlamak için insan bedenini yeniden birleştirmenin önemine inanıyor ve bu konuda tıbbi çalışmalar yapıyorlardı. İlk dış protezinin MÖ 2500 civarında Mısır'da altından yapıldığına inanılmaktadır. Ayrıca Nerlich ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırmada bulunan eski bir ayak başparmağının en eski uzuv protezi (MÖ 950-710) olduğu düşünülmektedir (Mhanna ve Hasan, 2017). Fra Angeliac'ın Saints Damien ve Cosmos kardeşlerin yaralı bir askere Homograft uzuv nakletmelerini betimleyen "Justinianus'un İyileşmesi" başlıklı ünlü tablosu, genellikle "doku mühendisliği" için ilk tarihsel referans olarak anılmaktadır (Vacanti, 2006).

On dokuzuncu yüzyılda anestezi ve enfeksiyon önlemedeki ilerleme, cerrahi prosedürlerin hızla gelişmesine yardımcı olmuştur. Bu gelişme, canlı doku ve organların hasarlı bölgelere ilk uygulamalarının oluşmasını sağlamıştır (Mhanna ve Hasan, 2017). 1970'li yılların başında Çocuk Hastanesinde pediatrik ortopedi cerrahisi olarak çalışan, W. T. Green, kemik spiküllerine ekilen ve farelere implante edilen kondrositleri kullanarak yeni kıkırdak oluşturmak için çalışmalar yapmıştır (Vacanti, 2006). Birkaç yıl sonra Massachusetts Hastanesinden Dr. Burke ve Yannas M.I.T. ile birlikte dermal fibroblastların büyümesini desteklemek için bir kolajen matrisi kullanarak bir deri ikamesi oluşturmuş, hem laboratuvar koşullarında hem de insanlar üzerinde çalışmalar yapmışlardır.

Gelişmekte olan bu alanın doğuşundaki kilit nokta, 1980'lerin ortalarında, Çocuk Hastanesi'nden Dr. Joseph Vacanti'nin MIT'den Dr.Robert Langer'e hücreleri tohumlamak yerine hücre dağıtımı için ileriye dönük olarak uygun iskeleler tasarlama fikriyle yaklaşmasıydı (Vacanti, 2006).

BBC ilk olarak 1997'de gerçekleştirilen yapay kulak çalışmasını yayımlayarak doku mühendisliği ile ilgili kamuoyu farkındalığını ve medyanın ilgisini arttırmıştır. Vacanti deneyi olarak bilinen çalışmada, üç yaşındaki bir erkek çocuğa yönelik olarak tasarlanmış kulak, sığır kondrositleri ile tohumlanmış bir poliglikolik asit (PGA) iskelesi kullanılarak hazırlanmış ve kültür için bağışıklık yetersizliği olan bir fareye implante edilmiştir (Mhanna ve Hasan, 2017).

Drs. Charles A. ve Joseph P. Vacanti tarafından tasarlanan Doku Mühendisliği Derneği (TES) 1994 yılında Boston'da, 8 Ocak 1996'da Massachusetts eyaletinde resmi olarak kurulmuştur. Sonraki on yılda, Asya ve Avrupa Toplulukları ile birlikte TES, 2005 yılına kadar TESi ve ardından, Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp Uluslararası Derneği TERMIS olarak gelişecek ve organize olacaktır (Vacanti, 2006).

Günümüzde doku mühendisliğinin; kemik, kırık, tendon, bağ ve deri mühendisliğini içeren ortopedik ve maksil-lofasiyal uygulamalar, kalp kapakçıkları ve kan damarları mühendisliği ile kardiyovasküler alan; pankreas adacık hücrelerinin kapsüllenmesi ile endokrinoloji; gastrointestinal sistem, sentetik doku iskelelerinde hepatositlerin büyümesi ile sinir sistemi, kılavuzlu periferik sinir rejenerasyonu ve omurilik onarımı dahil; periodontal doku onarımı ve dentin rejenerasyonu gibi dental uygulamalar; ve oftalmolojide kornea ve lens dokusu gibi neredeyse tüm vücut sisteminde uygulamaları bulunmaktadır (Bonassar ve Vacanti, 1998).

5.2.Doku İskeleleri

Doku mühendisliğinin, gerekli işlevi sağlayan hücrelerin yerine izole edilmiş hücrelerin veya kullanılması, büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi doku indükleyici maddelerin hedeflenen yerlere teslimi ve üç boyutlu doku iskelelerinde büyüyen hücreler olmak üzere üç yaklaşımı bulunmaktadır. Doku iskeleleri hücrelerin büyümesine, hücre dışı matrisin ve diğer biyolojik moleküllerin sentezlenmesine rehberlik ettiği ve fonksiyonel doku ve organların oluşumunu kolaylaştırdığı için büyük öneme sahiptir (Kroschwitz, 2004).

Çeşitli biyomalzemelerden üretilen ve çok sayıda üretim tekniği kullanılarak üretilen doku iskeleleri doku tipinden bağımsız olarak, doku mühendisliğinde kullanım için bir dizi önemli husus içermektedirler:

- 1. Biyouyumluluk:** Herhangi bir doku mühendisliği iskelesinin ilk kriteri, biyouyumlu olmasıdır; hücreler yapışmalı, normal şekilde çalışmalı ve yeni matris oluşturmadan önce çoğalmaya başlamalıdır. İmplantasyondan sonra, doku iskelesi yapısı, iyileşmeyi azaltabilecek veya vücut tarafından reddedilmeye neden olabilecek bir enflamatuvar etkiye neden olmasını önleyebilecek bir bağışıklık ortaya çıkarmalıdır (O'brien, 2011).
- 2. Biyobozunurluk:** Doku mühendisliğinin amacı, zamanla vücudun kendi hücrelerinin implante edilmiş iskele yapısının yerini almasına izin vermektir. İskeleler, kalıcı implantlar olarak tasarlanmamıştır. İskele bu nedenle hücrelerin kendi hücre dışı matrislerini üretmesine izin vermek için biyolojik olarak bozunur olmalıdır. Bu bozunmanın yan ürünleri de toksik olmamalı ve diğer organlarla etkileşime girmeden direkt olarak vücuttan atılmalıdır (Lyons vd, 2010).
- 3. Mekanik özellikler:** Temel olarak, iskele implante edileceği anatomik bölge ile uyumlu mekanik özelliklere sahip olmalıdır. Bu, tüm dokularda önemli olmakla birlikte, özellikle kardiyovasküler ve ortopedik uygulamalar için bazı zorluklara sahiptir. Yeterli mekanik özelliklere sahip iskeleler üretmek, kemik veya kırık doku yapmaya çalışırken en büyük zorluklardan biridir. Bu dokular için, implante edilen iskele, implantasyon zamanından yeniden doku oluşumu sürecinin tamamlanmasına kadar işlev görecektir yeterli mekanik bütünlüğe sahip olmalıdır (Hutmacher vd., 2000). Diğer bir zorluk ise iyileşme oranlarının yaşa göre değişmesidir; örneğin, genç bireylerde, kırıklar normalde yaklaşık altı hafta içinde iyileşir; ancak yaşlılarda onarım hızı yavaşlar. Ortopedik uygulamalar için iskeleler tasarlanırken bu da dikkate alınmalıdır. İyi mekanik özelliklere sahip birçok malzeme üretilmiştir ancak yüksek mekanik özellik gözenekliliğin azalmasına neden olmuştur ve in vitro potansiyel sergileyen birçok malzeme, yetersiz vaskülarizasyon kapasitesi nedeniyle in vivo implante edildiğinde başarısız olmuştur. Hücre infiltrasyonu ve vaskülarizasyona izin vermek için yeterli mekanik özellik ve gözeneklilik arasındaki dengenin kurulması gerekmektedir (O'brien, 2011).

4. Doku iskelesi yapısı: Doku mühendisliği için kullanılan doku iskelelerinin morfolojik yapısı kritik öneme sahiptir. İskeleler, hücrel penetrasyonu ve besinlerin yapı içindeki hücrelere ve bu hücreler tarafından oluşturulan hücre dışı matrise yeterli difüzyonunu sağlamak için birbirine bağlı bir gözenek yapısına ve yüksek gözenekliliğe sahip olmalıdır. Ayrıca iskele bozunma ürünleri, diğer organlar ve çevre dokularla etkileşime girmeden vücuttan atılmalıdır. Doku mühendisliği alanında vaskülarizasyon eksikliğinden ve atıkların merkezden uzaklaştırılmasından kaynaklanan sorunlar doku mühendisliği alanında büyük bir endişe kaynağı olmuştur (Kov d., 2007). Diğer bir önemli bileşen, iskelenin ortalama gözenek boyutudur. Gözeneklerin, hücrelerin iskele içine göç etmesine izin verecek kadar büyük, ancak yeterince yüksek bir yüzey oluşturacak kadar da küçük olması gerekmektedir (O'brien, 2011). Bu kapsamda in-vitro kemik doku rejenerasyonuna dair bazı araştırmalarda 200-400 µm arasında değişen gözenek boyutuna ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Can ve Ersoy, 2014).

5.2.1. Doku iskelesi üretim yöntemleri

Temel olarak geleneksel üretim yöntemleri ve hızlı prototipleme olarak 2'ye ayrılır. Geleneksel yöntemler: Çözücü döküm/Parçacık uzaklaştırma, dondurarak kurutma, gazla köpüklendirme, elektrospinning ve ısı indükleme ile faz ayrımıdır. Hızlı prototipleme yöntemleri: Stereolitografi, lazer sinterleme, kaynaşmış biriktirme modellemesi ve biyobaskılamadır.

5.2.1.1. Geleneksel üretim yöntemleri

Çözücü döküm/parçacık uzaklaştırma yöntemi ve ilgili literatür çalışmaları

Gözenekli doku iskelelerinin üretimi için en kolay ve en yaygın tekniklerden biri, genellikle NaCl tuzu gibi bir porojende çözünen bir materyal içeren çözücü döküm/parçacık uzaklaştırma yöntemidir. Polimer çözeltisi kalıba dökülür ve polimer çözücünün uzaklaştırılmasından sonra yıkanır. Porojenin sızması, nihai yapıda gözeneklilik meydana getirir (Chimerad vd., 2022). Şekil 5.1'de yöntem şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Çözücü döküm/partikül uzaklaştırma yöntemi (Murugan ve Parcha, 2021)

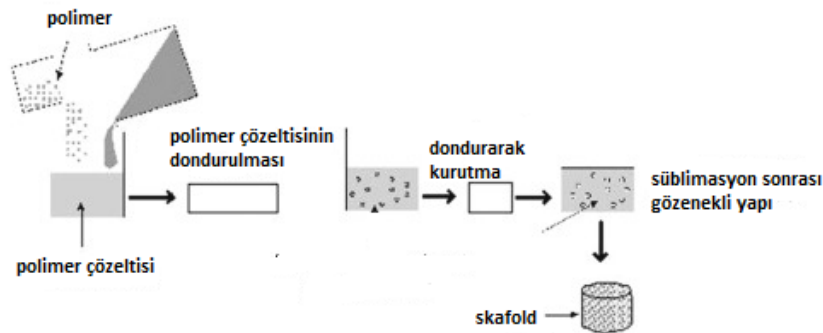
Bu tekniğin avantajlarından biri, üretilen iskelenin yüksek gözenekli olması ve gözenek boyutunu ayarlama kabiliyetine sahip olmasıdır, bu da iskeleyi hücrenin gelişimi ve büyümesi için uygun hale getirir (Sanzherrer, Garciaaznar, Doblare, 2009). Bu yöntemle ilgili yapılan literatür çalışmalarına bakılacak olursa;

Krok-Borkowicz ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, Poli(l-laktid-koglikolid) (PLGA) gözenekli doku iskeleleri, kolajen tip I (PLGA/coll) veya hidroksiapatit (PLGA/HAp) ile modifiye edilmiş ve biyouyumluluklarını ve kemik dokusu rejenerasyon potansiyellerini kontrol etmek için tavşanlar üzerinde in-vivo deneyler yapmışlardır. Deneysel yöneme bakıldığında, PLGA diklorometan içinde çözüldükten sonra porojen NaCl eklenmiştir. Bu karışım şekillendirmek için şırıngalara (4 mm çapında) yerleştirilmiş ve çözücünün buharlaşması için 24 saat bırakılmıştır. Bu işlemten sonra, tuz / PLGA kompozitleri kesilip (5 mm yüksekliğinde) ve porojeni süzmek için ultra saf suya daldırıldı. Su iletkenliği 2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 'nin altına düşene kadar su birkaç kez değiştirildi ve tüm tuz serbest bırakıldı (5 gün boyunca). İskelelerin fiziko-kimyasal özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılımlı X ışını spektroskopisi (EDX), X-ışını difraktometrisi (XRD), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılarak değerlendirilmiştir. In-vivo çalışmalarda, doku iskeleleri Yeni Zelanda tavşan femoral kusurlu bölgelere implante edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, %85 oranında gözeneklilik ve 250–320 μm çapında birbirine bağlı gözenekler elde edilmiştir. In-vivo modelde, PLGA ve PLGA/HAp iskelelerinin hücre çoğalmasını ve doku büyümesini arttırdığı görülmüştür (Krok-borkowicz vd., 2020).

Qi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada dondurarak kurutma/parçacıklı süzme yoluyla polimerlerin tuz parçacıklarıyla harmanlanmasını içeren yeni bir poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA)/poli(trimetilen karbonat) (PTMC) kompozit gözenekli polimerik yapının hazırlanması için bir teknik geliştirilmiştir. PLGA, oda koşullarında 8 saat süresince dioksan içinde çözüldükten sonra PTMC (politrimetilen karbonat) ilave edilmiştir. Karışıma tuz partikülleri de eklenip, polipropilen test tüplerine aktarılmıştır. Dondurulmuş tüpler, liyofilizatöre yerleştirilmiş ve dioksan, -10 ° C'de vakumlu kurutma yoluyla uzaklaştırılmıştır. Sonuçta, freze-drying/ salt leaching kombinasyonu ile elde edilen kompozitlerde tuz oranını arttırdıkça gözenekliliğin arttığı görülmüştür. % 90 tuz oranı için %94 porozite ve iyi derecede gözenekler arası bağlantı gözlenmiştir (Oi vd., 2020).

Dondurarak kurutma yöntemi ve ilgili literatür çalışmaları

Dondurarak kurutma işlemi ayrıca liyofilizasyon olarak da bilinir. İlk olarak uygun bir çözücü içinde sentetik bir polimerin çözünür. Çözünmeden sonra, polimer çözeltisi donma noktasının altında soğutulur, bu da çok sayıda birbirine bağlı gözenekli katı bir doku iskelesi bırakmak için süblimasyon yoluyla buharlaşan katı bir çözücü ile sonuçlanır. İskeleler, kurutmadan sonra elde edilir; basit çözme ve dondurarak kurutma ile makro gözeneklilik, başlangıçta buz kristalleri tarafından işgal edilen boş alana karşılık gelir. Bu tekniğin yararı, entegre biyolojik faktörlerin aktivitesini azaltabilecek yüksek sıcaklıkları önleme yeteneğidir. Ayrıca gözenek boyutu kontrollü ve dondurma yöntemi değiştirilerek yönetilebilir (Eltom, Zhong, Muhamad, 2019). Şekil 5.2’de dondurarak kurutma prosesi gösterilmiştir.

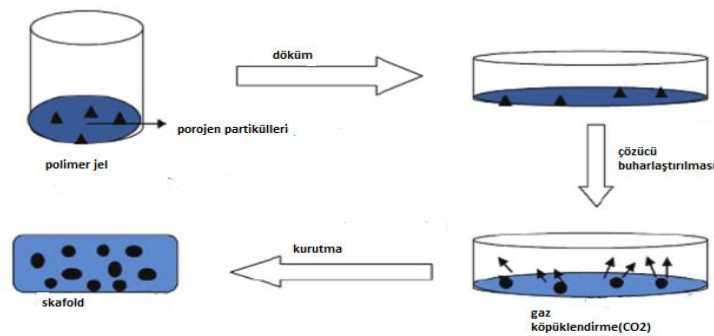


Şekil 5.2. Dondurarak kurutma (Ghalia ve Dahman, 2016)

Namini ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, ilk olarak PLGA, 2 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırma kullanılarak HFIP (hekzafloroisopropanol) içinde çözüldükten sonra HA eklenmiştir. Hazırlanan çözelti daha sonra katılaştırılmak üzere dondurucuya (-80°C 'de) yerleştirilmiştir. Katılaştıran çözelti, -10°C 'de dondurarak kurutma kabına yerleştirilmiştir. Su ve çözücü fazlarının tam olarak ayrılması için numuneler, 10 saat süreyle dondurularak kurutulmuştur. Bu çalışmada iskeleler elektrospining yöntemiyle de elde edilmiş ve karşılaştırma yapılmıştır. Sonuçlara göre, PLGA / HA nanofiberlerin SEM mikrofografisine göre, dondurularak kurutulmuş iskelelerin yapısının, elektrospun iskelelere kıyasla daha gözenekli olduğu görülmüştür. Ayrıca, dondurularak kurutulmuş PLGA / HA iskeleleri üzerinde kültürlen hücrelerin, elektrospun PLGA / HA yapı iskelelerindekiyle kıyasla önemli ölçüde daha yüksek hücre çoğalabilirliği gösterdiği tespit edilmiştir (Namini vd., 2018).

Gazla köpüklendirme yöntemi ve ilgili literatür çalışmaları

Gaz köpüklendirme, doku iskelesi üretiminde öncü yöntemlerden biridir. Son derece gözenekli ve birbirine bağlı yapıların elde edilmesini sağlar. Herhangi bir organik çözücü kullanmaya gerek olmaması, bu yöntemi hücre kültürü işlemi sırasında salınan biyoaktif türlerin kapsüllenmesi için uygun hale getirir. Bu tekniğin hidrofilik veya hidrofobik farklı biyopolimerlerle ve inorganik dolgunun bir polimer matris içindeki dispersiyonlarıyla uyumluluğu, onu diğer yöntemlere kıyasla avantajlı kılmaktadır. Bahsedilen avantajlara rağmen, gözeneklerin birbirine bağlılığının boyutu ve derecesinin kesin kontrolünün olmaması, bu yöntemin etkili bir yöntem olarak kullanılmasında bazı zorluklar yaratır. Bu yöntemde, dağılmış gaz (CO_2) fazı polimerin sürekli fazından uzaklaştırılırsa gözenekli polimer bazlı yapı oluşturulur (Chimerad vd., 2022). Şekil 5.3'te gaz köpüklendirme yöntemi gösterilmiştir.

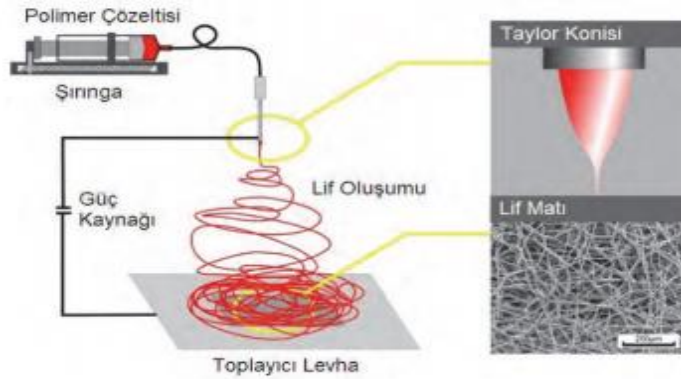


Şekil 5.3. Gazla köpüklendirme (Garg vd., 2012)

Salonius ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, PLGA parçaları 4.0 mm iç çapa sahip özel yapım teflon kalıplara yerleştirilmiştir. Kalıplar, 10 saat boyunca 55 bar karbon dioksit basıncına sahip bir hazneye yerleştirildi ve daha sonra basınç 5 saniye içinde hızla serbest bırakılmıştır. % 90'ın üzerinde bir gözenekliliğe sahip PLGA çubuklar elde edildi ve daha sonra köpüklü çubuklardan 8 mm uzunluğunda ve 24-27 mg kütleli iskeleler kesilmiştir. Sonuçta, gaz köpüklü PLGA yüksek gözeneklilik göstermesine rağmen gözenekler çökmüştü. Bununla birlikte, gaz köpüklü PLGA kullanımı, kendiliğinden iyileşmeden farklı olmayan onarım dokusu üretti, bu da iyileşme süreci üzerinde büyük bir genel etkiye sahip olmasa da onarımın malzeme tarafından engellenmediğini göstermiştir (Salonius vd., 2019).

Elektrospining yöntemi ve ilgili literatür çalışmaları

Bu teknik yüksek elektrik alandan faydalanarak çapları nanometre ile mikrometre arasında değişen fiberlerin üretilmesini sağlar. Bu yöntem için gerekli deney düzeneği temel olarak önemli üç ana parçadan oluşmaktadır. Bunlar; güç kaynağı, besleme ünitesi (şırınga) ve toplayıcı levhadır (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. *Elektrospining deney düzeneği*

Bu teknikte, polimer uygun bir çözücüde çözüldükten sonra bir şırınganın içine yerleştirilir. Daha sonra polimer çözeltisi ile şırınganın karşısındaki bir toplayıcı levha arasına 50 kV'a kadar gerilim uygulanır. Besleyici ünite üzerindeki iğnenin ucunda asılı durumda duran polimer damlası kritik bir voltaj değerine kadar, yüzey geriliminin uyguladığı kuvvetlerden dolayı, küresel bir biçimde bulunur.

Uygulanan potansiyel fark eşik değerine ulaştığı anda, elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimi kuvvetlerine eşitlenir ve bu noktada polimer damlası şekil değiştirerek koni biçimini (Taylor konisi) alır (Kozanoğlu, 2006).

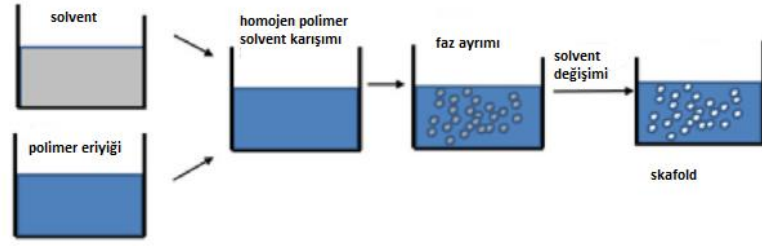
Elektriksel kuvvet yüzey gerilimini yendiği anda elektriksel olarak yüklenmiş polimer hızla dışarıya doğru yönelir ve aynı elektriksel yüke sahip partiküllerin birbirini itmesi ilkesinden hareketle de, polimer çok ince lifler halinde ayrılarak metal bir plaka üzerine düşer. Bu yöntem ile yüksek çekme mukavemetine sahip liflerden yapılmış homojen karışımlar elde edilebilir. Dezavantajları, biyomedikal uygulamalar için gerekli olan yeterli büyüklükte gözeneklerin yanı sıra 3D yapıları elde etmek sorunlu olabilir ve organik çözücü kullanımı riskli olabilir (Eltom, Zhong, Muhamad, 2019).

Hodge ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, PGA, PCL ve PLGA polimerleri ile PEO (polietilen oksit) mikropartikülü kullanılarak elektrospining yöntemiyle kompozitler elde edilmiştir. Sonuçta; PGA kompozit için %90, PCL kompozit için %83, PLGA kompozit için %84 gözeneklilik elde edilmiştir (Hodge ve Quint, 2019).

Cai ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, 5 farklı grupta PLGA/PCL/HA iskeleler üretilmiştir. Bunlar geleneksel elektrospining (2D), ıslak elektrospining (3D), ultrasonik işlem ile ıslak elektrospining (3Du), HA ilaveli ıslak elektrospining (3DH) ve ultrasonik işlem ve HA ilaveli ıslak elektrospining (3DHu) şeklindedir. Sonuçta, en yüksek gözeneklilik 3Du grubunda olup %99,4 oranındadır ve HA ilavesinin gözenekliliği düşürdüğü görülmüştür. Ayrıca 3Du ve 3DHu iskelelerinin hücrelerin çoğalmasını desteklediği görülmüştür (Cai vd., 2019).

Isıl İndükleme ile faz ayrımı (TIPS) (Freeze casting) yöntemi ve ilgili literatür çalışmaları

Bu yöntem, doku iskelesi hazırlamada iyi bağlantılı gözenekli yapı elde etmek için yaygın olarak benimsenen bir prosedürdür. Temel olarak, homojen bir polimer çözeltisinin karışmasını sağlamak için sıcaklıktaki değişime dayanır ve böylece çok fazlı bir sistem oluşturur. TIPS tekniği kullanılarak üretilen iskelelerde; gözenek morfolojisi, mekanik özellikler, biyo-aktivite ve bozunma oranları, çözeltideki polimer konsantrasyonu, ikincil fazın hacimsel oranı, işlemde kullanılan suyun sıcaklığı, kullanılan polimerin ve çözücünün türü değiştirilerek kontrol edilebilir (Conoscenti vd., 2017). Şekil 5.5'te proses gösterilmiştir.



Şekil 5.5. *Isıl İndükleme ile Faz Ayrımı (TIPS) (Tumbull vd., 2018)*

Yang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, önce Biyoaktif cam (BG) sonrasında PLGA tetrahidrofuranda çözünmüş. 60 °C de su banyosuna inkübe edilip, 2 saat karıştırılmıştır. Çözelti bir kalıba aktarılıp, -20 °C de dondurulup jel haline getirildikten sonra +4 °C de 1 gün bekletilmiştir. 48 sa süreyle liyofilizatöre konup, gözenekli PLGA/BG kompozitleri elde edilmiştir. Sonuçta, %93 gözeneklilikte ve 1-7 µm büyüklüğünde gözenekli yapı elde edilmiş, ayrıca iskele yapısının hücre tutunması ve çoğalmasına elverişli olduğu tespit edilmiştir (Yang vd., 2019).

5.2.1.2. Hızlı prototipleme yöntemleri

Stereolitografi

Stereolitografi yöntemi, ince bir ultraviyole (UV) ile kürlenebilir malzemeyi katman katman art arda basarak katı, üç boyutlu nesneler oluşturmak için kullanılır. Bir stereolitografi sisteminin dört ana bileşeni vardır, bunlar ışığa duyarlı sıvı reçineli bir tank, aktarılabılır bir yerleşik platform, reçine yaymak için bir UV lazeri ve bir dinamik ayna sistemidir. İşlem, platformdaki ışığa duyarlı sıvı reçine tabakası üzerine bir UV lazeri gönderilmesi ile başlar. İlk katmanın katılmasından sonra platform dikey olarak indirilir. Daha sonra 3D iskele oluşturulana kadar katmanlar üst üste eklenir. Son olarak, kürlenmemiş reçine temizlenir (Eltom, Zhong, Muhamad, 2019).

Lazer sinterleme

Bu teknikte, ince katmanlar halinde toz haline getirilmiş malzemeyi sinterlemek için güç kaynağı olarak lazer kullanılır. Lazer kullanımı nedeniyle bu teknik, polimer, metal veya seramik gibi çeşitli malzemelerin yapımında kullanılmıştır (Rimell ve Marquis, 2015). Lazer sinterleme, tercih edilen iskele özelliklerini elde etmek için kullanılacak polimer/kompozit toz karışımlarının yüzde bileşimleri gibi çeşitli parametreleri uyarlayarak üretilen iskelenin mikro yapıları üzerinde kullanıcı kontrolü sağladığı için avantajlı bir tekniktir (Eltom, Zhong, Muhamad, 2019).

Kaynaşmış biriktirme modellemesi

Bu teknikte, katı bir polimer, bilgisayar kontrollü bir ekstrüzyon ve biriktirme işlemi kullanılarak 3D nesnenin yüzeyinde eritmek ve ekstrüde edilmek üzere sıcak bir ekstrüzyon nozülüne dökülür; iskele, bitişik mikrofilamentlerin çoklu katmanlarından yapılır. Daha çok termoplastik biyopolimerleri işlemek için kullanılmıştır (Eltom, Zhong, Muhamad, 2019).

Biyobaskılama (3D-yazıcı)

Biyobaskı, "bazı biyolojik işlevleri gerçekleştirmek için önceden belirlenmiş bir yapıya sahip ilgili materyallerin, hücrelerin, moleküllerin, dokuların ve biyolojik olarak parçalanabilen biyomalzemelerin bir modelini geliştirmek ve bir araya getirmek için materyal transfer süreçlerinin kullanılması" olarak tanımlanan bir 3D-yazıcı tekniğidir (Murphy ve Atala, 2014).

3D biyobaskı teknolojileri, hücresiz ve hücreli yapılar olmak üzere iki şekilde sınıflandırılabilir. Hücresiz biyobaskı kullanarak, iskele ve biyomateryaller, baskı işlemi sırasında hücresiz üretilebilir. Hücreli biyobaskı, canlı doku yapılarını üretmek için üretim süreci sırasında hücreleri ve diğer biyoajanları malzemeyle bütünleştirir. Tüm doku iskelesi üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 5.1’de gösterilmiştir.

Tablo 5.1. Doku iskelesi üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Eltom, Zhong, Muhamad, 2019)

Doku iskelesi üretim tekniği	Avantajları	Dezavantajları
Çözücü döküm/partikül uzaklaştırma	-yüksek gözeneklilik (%50–90) - düşük maliyet	-toksik çözücü kullanımı
Dondurarak kurutma	-çeşitli amaçlarla kullanım -yüksek sıcaklıkları önleme yeteneği	-yüksek enerji tüketimi -sitotoksik çözücülerin kullanımı -düzensiz boyutta gözenekler -uzun sürmesi

Tablo 5.1. (Devam) Doku iskelesi üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Eltom, Zhong, Muhamad, 2019)

Gazla köpüklendirme	-% 85 e varan gözeneklilik	-elde edilen ürün kapalı gözenekli bir yapıya veya katı bir polimerik dokuya sahip olabilir.
Elektrospining	-doku mühendisliği için nanolifli yapı iskeleleri geliştirmek için temel teknik -yüksek çekme mukavemetli liflerden oluşan homojen karışım	-solventlertoksik olabilir -biyomedikal uygulamalar için yeterli büyüklükte gözeneklerin yanı sıra 3 boyutlu yapıların elde edilmesi sorunlu -süreç birçok değişkene bağlı
Isıl indükleme ile faz ayrımı	-yüksek gözeneklilik (95%) -iyi derecede gözenekler arası bağlantı -iskele yapısı ve gözenek boyutu kontrolü (Rezwan vd., 2006)	-çözücü süblimleştirmek için gereken uzun süre -organik çözücü kullanmak -küçük ölçekli üretim (Rezwan vd., 2006)
Stereolitografi	-yüksek çözünürlük -gözenekler arası iyi bağlanma	-monomer dönüşümünü iyileştirmek için çok miktarda monomer ve postpolimerizasyon işlemi gerektirmesi

Tablo 5.1. (Devam) Doku iskelesi üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Eltom, Zhong, Muhamad, 2019)

Lazer sinterleme	-ultra yüksek moleküler ağırlıklı polietilen kullanma -proses parametrelerini uyarlayarak üretilen iskelenin mikro yapıları üzerinde kullanıcıya mükemmel kontrol sağlama -oluşturulan iskelenin tercih edilen özelliklerini elde edebilme	-yüksek çalışma sıcaklığı
Kaynaşmış biriktirme modellemesi	-düşük sıcaklıkta biriktirme	-biyobozunur polimerlere uygulanmasında sınırlamalar
Biyobaskılama	-düşük maliyet -yüksek baskı hızı ile hücre canlılığını (%80-90) destekleme özelliği	-hücre varlığına bağlı

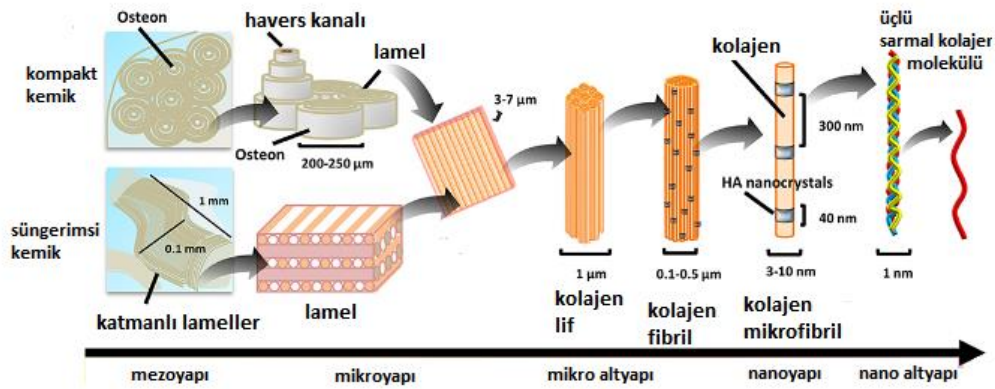
6. KEMİK DOKU

Kemik, vücudun iskeletini oluşturan canlı dokudur. İşlevleri, vücut yapısını desteklemek, hayati organları korumak ve vücudun hareket etmesine izin vermektir. Ayrıca, vücudun kan hücrelerini oluşturduğu kemik iliği için bir ortam sağlar ve mineraller, özellikle kalsiyum için bir depolama alanı görevi görür (http-3). Kemikler sürekli olarak yapısal ve biyolojik değişime uğrar ve kemiğin yeniden şekillenmesi yaşam boyunca devam eder. Kemikler büyüebilir veya küçülebilir, güçlenebilir veya zayıflayabilir ve aşırı kuvvet uygulanmasına maruz kaldığında kırılabilir.

Hasar alması durumunda, vücutta belirgin bir iz bırakmadan kendini yenileyebilen bir organdır. Bebeklerde tipik olarak yaklaşık 270 kemik vardır ve bunlar birleşerek yetişkin insanda 206 ila 213 kemiğe dönüşür (Paul, 2021). Çoğu kemik, kompakt ve süngerimsi kemik dokusu içerir, ancak bunların dağılımı ve konsantrasyonu, kemiğin genel işlevine göre değişir. Kompakt ve süngerimsi kemik aynı matris materyallerinden ve hücrelerden yapılmış olsa da, organize edilme biçimleri farklıdır.

Kompakt (Kortikal) kemik: Daha yoğun ve daha dayanıklı bir yapısı vardır. Tüm kemiklerin dış korteksini oluşturur ve periosteum ile doğrudan temas halindedir. Uzun kemiklerde dış kortikal kompakt kemikten iç medüller boşluğa geçerken kemik süngerimsi kemiğe geçiş yapar (Biga vd., 2019). Kompakt kemiğin fonksiyonel birimleri osteonlardır; Lamellerle (eş merkezli halkalar) kaplı, merkezi konumlu bir Havers kanalı içeren osteonlar arasındaki boşluklarda osteositler görülebilir. Osteonlar yoğun bir şekilde paketlenmiştir, bu da kompakt kemiği süngerimsi kemikten daha sert ve daha ağır hale getirir. Havers kanalları, gelişmekte olan kemiği besleyen kan damarlarının geçişini kolaylaştırır (http-4).

Süngerimsi (Trabeküler) kemik: Süngerimsi kemik, kemik iliği ve kan damarlarını çevreleyen trabeküller olarak bilinen anastomoz ince kemik şeritlerinden oluşur. Kemiklerin ilikle dolu nispeten daha yumuşak çekirdeğini oluşturur. Boşluklu alanlara sahiptir ve destekleyicidir, ancak aynı zamanda hafiftir ve değişen vücut ihtiyaçlarını karşılamak için kolayca yeniden şekillendirilebilir (http-4). Şekil 6.1’de kompakt ve süngerimsi kemik doku yapıları gösterilmiştir.



Şekil 6.1. Kompakt ve süngerimsi kemik doku yapıları (Filippi vd., 2020)

Kompakt ve süngerimsi kemik dokuya ait mekanik özellikler Tablo 6.1’de verilmiştir.

Tablo 6.1. Kompakt ve süngerimsi kemik doku mekanik özellikleri (Gerhardt ve Boccaccini, 2010)

Mekanik özellik	Süngerimsi kemik	Kompakt kemik
Basma dayanımı (MPa)	0,1-16	130-200
Çekme dayanımı (MPa)	-	50-151
Basma modülü (GPa)	0,12-1,1	11,5-17
Young’s modülü (GPa)	0,05-0,5	7-30

6.1. Kemik Oluşumu

Kemik dokusu, insan embriyosundaki üç ilkel doku katmanından esas olarak mezodermden türemiştir. Bazı kraniyofasiyal kemikler ve orta kulak kemikleri, nöral krest hücreleri yerine ortaya çıkar. Nöral hücre göçünün gelişimsel bozukluklarında, kraniyofasiyal malformasyonlar belirgindir (Paul, 2021). Gelişim sırasında, ilk olarak, birincil ve ikincil osteogenez olarak adlandırılan iki temel mekanizma bulunmaktadır. Birincil kemik oluşumu (yani endokondral ossifikasyon) için yer olarak hizmet eden epifizyal kıkırdak, 10-20 nm çapında fibril kollajen demetlerinin bir kombinasyonudur. Endokondral ossifikasyon süreci ile uzun ve kısa kemikler gelişir. Bu süreçte kemik, olgunlaşma sırasında kıkırdaklı bir öncülün yerini alır (Olszta vd., 2007).

Mineralizasyon için kristaller ya da yüksek konsantrasyonda iyonlar ileten matris veziküllerinin yüksek bir oluşumu da gerçekleşmektedir. Mineralizasyon nispeten hızlıdır, "örülmüş" bir kemik mikro yapısı oluşturur.

Bu temel maddede tip I kollajen bulunmasına rağmen (sıçan kıkırdığında ~%17), lameller halinde bulunmaz ve kollajen ile yakın ilişki içinde kristaller oluşmaz (Olszta vd., 2007). İkincil kemik oluşumunda (intramembranöz ossifikasyon), birincil kemik, insanlarda Haversian kanal sisteminin osteonlarını oluşturan eş merkezli lameller halinde organize olmuş paralel lifli daha optimal bir yapıya yeniden modellenir. Sekonder kemikteki kollajen fibrilleri, osteoblastlar tarafından salgılanır ve birincil kemiktekilerden daha büyük olup ortalama 78 nm çapa sahiptir (Raton, 1992).

Yassı kemikler, bu süreçte oluşur. Mezenkimal kök hücrelerden türetilen osteoblastlar, birbirleriyle kaynaşan ve trabeküller oluşturan kemik spikülleri üretir. Trabeküller, diğer trabeküllerle bağlantı kurmak ve kemik üretmek için büyür. Trabekülleri çevreleyen mezenkimal hücreler periostu oluşturmaya yarar. Periosttan kaynaklanan osteojenik hücreler, örülmüş kemiğin yüzeyi boyunca büyür ve mineralizasyondan sonra lameller kemik haline gelir (Paul, 2021).

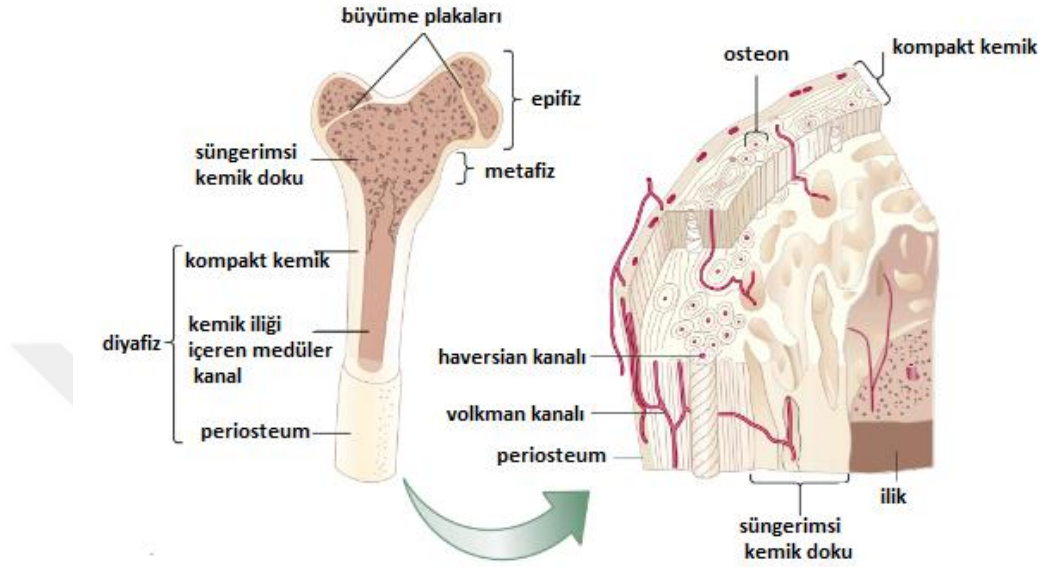
6.2. Kemik Morfolojisi

Uzun bir kemikte iki temel bölge vardır: diyafiz ve epifiz. Diyafiz, kemiğin proksimal ve distal uçları arasında uzanan içi boş, tübüler bölgedir. Diyafizin içinde sarı kemik iliği ile dolu olan medüller boşluk bulunur. Diyafizin dış duvarları (korteks, kortikal kemik), bir tür kemik dokusu olan yoğun ve sert kompakt kemikten oluşur. Kemiğin her iki ucundaki geniş bölümlere epifiz adı verilir ve bu kısım başka bir kemik dokusu türü olan süngerimsi kemikle doldurulur. Kırmızı kemik iliği, bazı uzun kemiklerde süngerimsi kemiklerin arasındaki boşlukları doldurur. Kemik büyümesi sırasında, metafiz, uzun kemiklerin uzama bölgesi olan epifiz plakasını içerir. Erken erişkinlik döneminde (yaklaşık 18-21 yaş) kemik büyümesi durduğunda, epifiz plakası şekilde görülen bir epifiz çizgisi haline gelir.

Endosteum (endo: "iç"; osteo: "kemik"), medüler boşluğa bitişik kemiğin içini kaplayan bir kemik hücresi tabakasıdır. Bu kemik hücreleri kemiğin yaşam boyunca büyümesini, onarılmasını ve yeniden şekillenmesini sağlar. Kemiğin dış kısmında kemiği büyüten, onaran ve yeniden şekillendiren başka bir hücre tabakası daha vardır. Bu hücreler periosteum (peri: "çevre" veya "çevreleyen") adı verilen çift katmanlı yapılardır.

Bu katman kortikal kemiğe bitişiktir ve yoğun düzensiz bağ dokusundan oluşan dış fibröz bir katmanla kaplıdır. Periosteum ayrıca kompakt kemiği besleyen kan damarları, sinirler ve lenf damarları içerir. Tendonlar ve bağlar periosteumdaki kemiklere bağlanır.

Kafatası kemiklerinde olduğu gibi yassı kemikler, her iki tarafı bir kompakt kemik tabakası ile kaplanmış bir diploe (süngerimsi kemik) tabakasından oluşur. İki kompakt kemik tabakası ve süngerimsi kemik, iç organları korumak için birlikte çalışır (Biga vd., 2019). Şekil 6.2’de kemik yapısı gösterilmiştir.



Şekil 6.2. Kemik anatomisi (http-5)

6.3. Kemik Matrisi

Kemik matrisi, gücünü basınç ve gerilmeye karşı dayanıklı bir mineral faz ve kolajen lifler açısından alan kompozit bir malzemedir. Kemiğin mineral fazı, kalsiyum hidroksiapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, küçük mikro kristallerden oluşan bir yapıdır, bu sayede iyon değişimi için geniş bir yüzey alanı yaratır. Kemik matrisi ayrıca kolajen ve osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi kolajen olmayan protein içerir (Thomson, 1998).

6.3.1. Mineral faz

Apatitin karbonatlı formu yaygın olarak biyolojik apatit ya da hidroksiapatit (HA) olarak adlandırılır. Kemik minerali, saf hidroksiapatit için teorik değer olan $\text{Ca:P} = 1,67$ oranına sahiptir. Kemik, sürekli olarak yeniden şekillenme ve onarım geçiren bir canlı doku olduğu için, kristallerin küçük boyutu ve stokiyometrisini, kemiğin osteoklastlar (kemik emen hücreler) tarafından emilmesi için gerekli olan çözünürlüğe sahip mineral fazı sağlar (Olszta vd., 2007).

6.3.2. Organik faz (Kolajen matris)

Kolajen proteini dört yapıya bölünmüş karmaşık bir hiyerarşik yapıya sahiptir: birincil yapı (amino asit üçlüsü), ikincil yapı (α -sarmal), üçüncül yapı (üçlü sarmal) ve dördüncül yapı (fibriller)dır (Gelse, Pöschl, Aigne, 2003).

Birincil yapı: Kolajen proteini, prolin bakımından zengin Gly-X-Y polipeptidinin karakteristik iki özelliği ile tanınır: (i) Gly, tüm uzunluğu boyunca tekrarlanan $-(\text{Gly-X-Y})_n-$ tripeptit dizisi ~ 1000 amino asit zinciri halinde bulunur. (ii) Tripeptid dizisinde ($\sim 20\%$) prolin (X) ve hidroksiprolin (Y)'den oluşur (Ferreira vd., 2012).

İkincil yapı: α zincirleri, tripeptit $-(\text{Gly-X Y})_n-$ 'nin tekrarları ile oluşturulur ve birbirine bağlanır, tip I, II ve III kolajenin karakteristik üçlü sarmalını oluşturur (Fratzl, 2003).

Üçüncül yapı: Üçlü sarmal yapı, özellikle tip I kolajende, genellikle iki özdeş $\alpha 1(\text{I})-$ ve $\alpha 1(\text{II})$ -zincirinin ve yaklaşık 1000 amino asitli bir $\alpha 2(\text{I})$ zincirin bağlanmasıyla oluşturulur ve uzunluğu yaklaşık olarak 300 nm'dir (Ferreira vd., 2012).

Dördüncül yapı: Yaklaşık 20 amino asit uzunluğunda sarmal olmayan bölgelerden oluşan telopeptidler, çapraz bağ oluşumu ile kolajen moleküllerinin stabilizasyonuna katkıda bulunarak fibrillojenezde önemli bir rol oynar. Kolajen çapraz bağları ikiye ayrılır: lizin hidroksilaz ve lisil oksidazın aracılık ettiği enzimatik çapraz bağlar ve yaygın olarak glikasyon veya oksidasyon ile indüklenen gelişmiş glikasyonun son ürünleri olan enzimatik olmayan çapraz bağlardır (Saito ve Marumo, 2010).

Kolajen tip I, büyük ölçüde doğrusal kolajen fibril dizilerinden oluşan tipik fibriller kolajendir. Trabeküler ve kortikal kemikte fibriller düzenli paralel dizilişlerini sürdürseler de, deri gibi diğer dokularda olduğu gibi homojen olarak dağılmazlar (Tzaphlidou, 2008). Deri, tendon ve kemik esas olarak Tip I kolajen, hiyalin kıkırdak Tip II, fetal cilt ve kan damarları Tip III ve bazal membran Tip IV kolajenden oluşur (Duance vd., 1977).

6.3.3. Kolajen olmayan proteinler

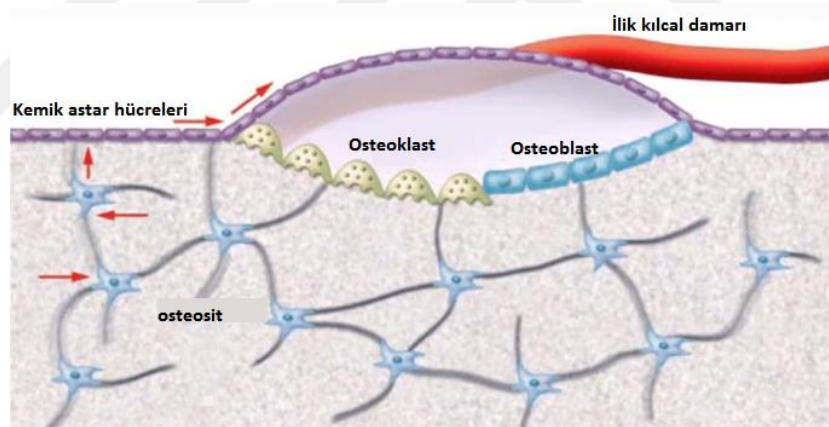
Osteokalsin, osteoblastik hücreler tarafından üretilen kemikte en kısıtlı miktarda olduğu düşünülen proteindir. K vitaminine bağlı bir enzimatik mekanizmada gama-karboksilasyon yoluyla üç glutamik asitin (GLA)/mol'de translasyonel olarak modifiye edilmesiyle oluşur (Pose vd., 1980). Asidik karakteri ve GLA kalıntıları nedeniyle osteokalsinin başlangıçta kemik mineralizasyonunun önemli bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (Gorski, 2011).

Osteonektin, hem hidroksiapatite hem kolajene seçici olarak bağlanabilen kemiğe özgü bir proteindir. Osteonektin çözünmeyen tip I kolajene bağlandığında, ortaya çıkan kompleks sentetik apatit kristallerini ve serbest kalsiyum iyonlarını tutar. Osteonektin-kolajen kompleksleri ayrıca yarı kararlı dengeli tuz çözeltilerinden mineral fazı birikimini de çekirdekler (Termine vd., 1981).

Osteopontin, kolajen olmayan matris proteinlerinin değişken şekilde fosforile edilmiş bir üyesidir. Kemik ve kemik iliğinde osteoblastik ve osteoklastik öncü hücreler, çok çekirdekli osteoklastlar, osteositler ve osteoblastlar ile ifade edilir. Osteopontinin uzun zamandır mineral kristallerinin büyüyen yüzlerine spesifik olarak bağlanarak kalsifikasyon reaksiyonlarının bir inhibitörü olarak işlev gördüğüne inanılmaktadır (Gorski, 2011).

6.4. Kemik Hücreleri

Kemik hücreleri; osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler olmak üzere 3'e ayrılır. Şekil 6.3'te şematik olarak gösterilmiştir.

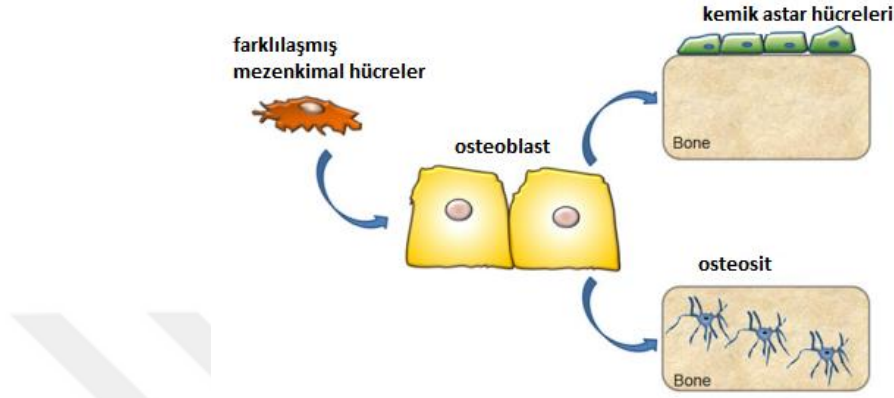


Şekil 6.3. Kemik hücreleri (Ogueri vd., 2019)

6.4.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar; adipositler, kondrositler, fibroblastlar ve miyoblastlar dahil olmak üzere diğer bağ dokusu hücreleri ile ortak bir mezenkimal kök hücreyi (MSC) paylaşan hücrelerdir. Toplam hücrelerin sadece % 4-6'sını temsil etmelerine rağmen, kemik inşasında önemli işleve sahiptirler. Osteoblastlar, hücrenin tabanında bulunan yuvarlak bir çekirdeğe ve kemik matris glikoproteinlerinin öncüllerini içeren pozitif granüllere sahip güçlü bir bazofilik sitoplazmaya sahip küp şekilli hücrelerdir. Osteoid adı verilen kireçlenmemiş kemik matrisini biriktirir ve daha sonra mineralizasyonunu sağlarlar.

Kemik oluşum fazı sonunda osteoblastlar; inaktif osteoblast veya kemik astar hücreleri haline gelebilirler, osteositler olarak kemik matrisinde sıkışıp kalabilirler, mineralize matris boyunca düzenli olarak dağılmış ve farklılaşmış mezenkimal hücelere dönüşebilirler (Del Fattore, Teti, Rucci, 2012). şekil 6.4'te bu oluşumlar gösterilmiştir.



şekil 6.4. Kemik oluşumu sonrası osteoblastların dönüşümü (Del Fattore, Teti, Rucci, 2012)

Osteoblastların genel sentetik ve düzenleyici aktiviteleri, kemik dokusu bütünlüğünü ve şeklini organize eder. Bu nedenle, çeşitli ciddi patolojik durumlar için tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, (osteoporoz, osteosarkom vb) osteoblast metabolizmasına, olgunlaşmasına ve çoğalmasına müdahale etme yeteneği çok önemlidir (Rosenberg vd., 2012).

6.4.2. Osteoklastlar

Osteoklastlar, çapı 100 mikrometreye kadar değişebilen, Havers sistemi içindeki endosteal yüzeylerde ve periostun altındaki periost yüzeyinde bulunan (Roodman, 1996) kemik rezorpsiyonundan sorumlu çok çekirdekli hücelerdir. Kristalli hidroksiapatiti çözmek ve kolajen lifleri açısından zengin organik kemik matrisini parçalamak çeşitli işlevleri arasındadır (Vaananen vd., 2000). Büyüyen kemiğin metafizinde olduğu gibi aktif kemik döngüsü bölgelerinde osteoklast sayıları artar. Osteoklastlar genellikle kemik yüzeyine yapışık olarak görülürler (Roodman, 1996).

6.4.3. Osteositler

Osteositler, mineralize kemik matrisine gömülü hüceler olarak tanımlanır ve tüm kemik hücelerinin % 90-95'inden fazlasını oluşturur. Mineralize matris boyunca düzenli olarak dağılırlar, birbirlerine ve kemik yüzeyindeki hücelere, her yöne yayılan, ancak genellikle kemik yüzeyine dik olan ince, sitoplazmik süreçlerle bağlanırlar (Bonewald, 2021).

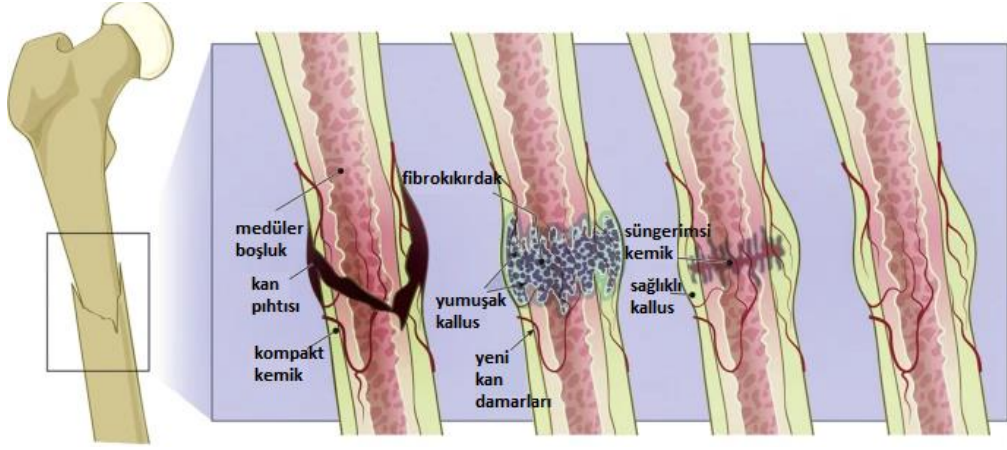
Osteositler, doğrudan matriks ile etkileşerek kemik homeostazında rol oynarlar. Tip I kolajen dahil olmak üzere kemik matriks bileşenlerinin nano ve mikro yapısını incelemeye yönelik tekniklerin daha yaygın hale gelmesiyle, kemik kalitesinin artırılmasında osteositin yeni rollerini ortaya çıkarmak da çalışmalar yapılmaktadır (Creedy, Damrath, Wallace, 2021).

6.5. Kemik Rejenerasyonu

Kemik dokusu, kortikal kemik adı verilen kompakt bir kabuk ve süngerimsi veya trabeküler kemik adı verilen gözenekli bir çekirdek olmak üzere iki ana kısımdan oluşur. Kortikal kemik, tekrarlayan osteon birimlerinden oluşurken, süngerimsi kemik, kemik iliği ile dolu serbest boşluklarla birbirine bağlanan bir trabekül çerçevesinden yapılır. Bu trabeküller ve osteon birimleri, kolajen liflerinden ve kalsiyum fosfat kristallerinden oluşur. HA kristalleri, kolajen molekülleri arasındaki boşluklarda yer alır ve kemiğin sertliğini artırır. Kemik dokularının özellikleri, ekstraselüler matriks (ECM) ve hücrelerin yapısına bağlıdır. Bu nedenle, kemik kusurlarının onarımı ve rekonstrüksiyonu yenilikçi stratejiler gerektirir. Kemik rejenerasyonu dört bileşen gerektirir: morfogenetik bir sinyal, sinyale yanıt verecek duyarlı konakçı hücreler, bu sinyali belirli bölgelere iletebilen uygun bir taşıyıcı ve canlı, iyi vaskülarize konak yatağı (Gong vd., 2015).

Kemik rejenerasyonu üç aşamada gerçekleştirilir: osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon. Osteogenez, kemik oluşum sürecidir. Osteoindüksiyon, farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüştürülmesi sürecidir. Osteokondüksiyon, biyo-inert veya fizyolojik matrisler üzerinde kemik büyümesi sürecidir (yeni hücre kolonizasyonu, kemik büyümesi ve kan damarı oluşumu (vaskülarizasyon)).

Hasarlı, kırık bir kemiğin yenilenme evrelerine daha ayrıntılı bir şekilde bakıldığında ilk olarak kırık çevresinde kan pıhtısı (hematom) oluşur, devamında onarıcı fazda granülasyon dokusu ve fibrin matriks formunda yeni kan damarları oluşturulur, hücrelerin osteoblastlara farklılaşması ve ektopik kemik oluşumu meydana gelir. Son olarak osteogenez veya osteoindüksiyon yoluyla yeni kemik oluşumu, yeni trabeküler ve kortikal kemik oluşumu; yeniden biçimlendirme aşaması (bu süreç aylardan yıllara kadar sürebilir.) meydana gelir (Yadroitsava vd., 2019). Bu aşamalar Şekil 6.5'te gösterilmiştir.



Şekil 6.5. Kırık kemik iyileşme süreci (Xiong ve Xiong, 2022)

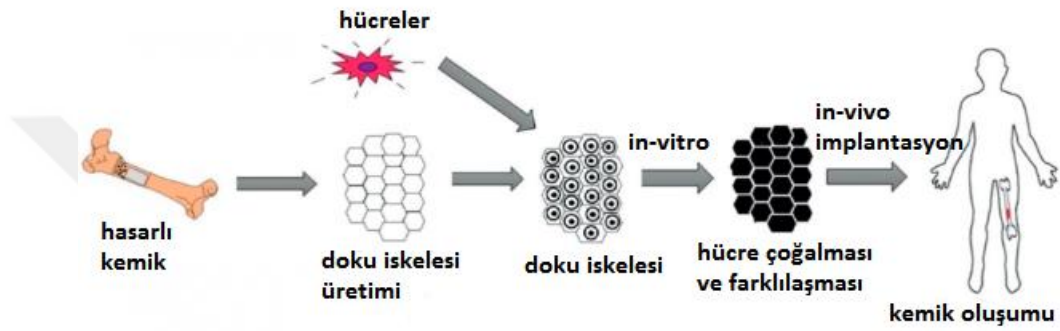
6.6. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyomateriyal Skafoldlar

Kemik, rejeneratif mühendislikte geniş çapta araştırılan bir dokudur. Günümüzde cerrahlar için otogreftler (aynı kişinin bir bölgesinden alınıp, hasarlı bölgesine aktarılan doku), allogreftler (aynı cinsten farklı kişiler arasında yapılan doku aktarımı) gibi çeşitli kemik grefti seçenekleri mevcuttur ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik aktivitelerinin osteoindüksiyon ve osteokondüksiyona bağlı olduğu bulunmuştur. Osteoindüksiyon, kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler) adı verilen aşından türetilmiş proteinlerin kullanılmasıyla sağlanır. Kullanılan biyolojik kemik greftleri arasında otogreft hala altın standart olarak kabul edilmektedir.

Ancak bununla birlikte, hastanın doğal kemiğinin veya dokusunun bir kısmını çıkarmak ve transfer etmek için ikinci bir prosedüre ihtiyaç duyulmadığı için allogreftler de tercih edilmektedir. Kemik greftleri avantajlı olmasına rağmen ,hasta bulaş riski, düşük osteoinduktivite, yüksek maliyet gibi dezavantajlardan dolayı yeni alternatif arayışları hız kazanmış ve sentetik kemik grefti ikamelerinin geliştirilmesini sağlamıştır.

Kemik ikameleri, genel olarak, kemik iyileşmesini teşvik etmek, kemik defektlerini doldurmak için kullanılan doğal, sentetik veya kompozit malzemelerdir. Bu biyomateriyaller arasında, biyobozunur polimerler ilgi çekici bir sentetik kemik grefti ikamesi sınıfını oluşturur. Materyal tasarımındaki son gelişmeler ve materyal-hücre etkileşimleri üzerine yeni bakış açıları, çeşitli özelliklere sahip kemik dokusu rejenerasyonu için sistemlerin geliştirilmesi için yeni fırsatlar sunmaktadır. Kemik dokusu rejenerasyonu genellikle doku yenilenmesi için fiziksel destek görevi gören polimerik doku iskelelerini kullanır (Ogueri vd., 2019).

Bu iskelelerin işlevleri şunları içerir: etkilenen bölgeye geçici mekanik destek sağlamak ve kemik kusurlarının boşluğunu doldurmak, dolaşımdaki öncü hücrelerin yapışmasını ve büyümesini teşvik etmek ve iskele yüzeyine ECM birikmesine izin vermek (osteokondüksiyon) , gözenekli yapı içinde damarların ve kemik büyümesini sağlamak ve moleküler sinyalleşme ve yeni kemik dokusu oluşumu (osteoindüksiyon) yoluyla osteojenik farklılaşmasını arttırmaktır (Filippi vd., 2020). Şekil 6.6’da doku iskelesi implantasyon süreci gösterilmiştir.



Şekil 6.6. Tipik kemik dokusu mühendisliği yaklaşımı (Dixon ve Gomillion, 2021)

7. POLİMERLERİN VE DOKU İSKELELERİNİN KARAKTERİZASYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER

7.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi ışın (FTIR) Spektroskopisi

FT-IR spektroskopisi, bir titreşim spektroskopisi biçimidir ve FT-IR spektrumu hem moleküler yapıyı hem de moleküler ortamı yansıtır. IR bölgesi (1 ila 100 μM), uzak- (100 ila 25 μM), orta-(25 ila 2.5 μM) ve yakın IR (2.5 ila 1 μM) olmak üzere üç bölgeye ayrılır. Orta IR (4000 ve 400 cm^{-1}), birincil moleküler titreşimleri gösterir ve kimya ve adli tıpta maddelerin analizi için en yaygın olarak kullanılan bölgedir. (Duygu vd., 2009). Temel biçiminde bir FTIR cihazı, iletim ilkesine göre çalışır ancak numune spektrumunun kaydedilme şekli, IR ışınının kaynaktan dedektöre nasıl ulaştığına bağlı olarak, dağıtıcı cihazlardan temel olarak farklıdır. Bir FTIR spektrometresinin çekirdek kısmı; IR kaynağı, ışın ayırıcı, iki ayna ve bir detektörden oluşur. Kaynaktan gelen IR radyasyonu ışın ayırıcıya çarpar ve iki aynaya doğru yönlendirilir. Biri sabitken diğeri veri toplama sırasında sabit bir hızla hareket ettirilir. Kızılötesi ışınlar aynalar tarafından yansıtılır, ışın ayırıcıda yeniden birleştirilir ve daha sonra numuneden geçirilerek IR'deki tüm dalga boylarını aynı anda kaydeden dedektöre ulaşır. Ortaya çıkan desen, interferogram olarak adlandırılır. Yeniden birleştirilen ışın numuneden geçtikten sonra dedektörde kaydedilen, numunenin IR spektrumunun Fourier dönüşümüdür (Blum ve Jhon, 2011).

7.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

Nükleer manyetik rezonans, 1946'da Purcell ve Bloch tarafından keşfedilmiştir. Çeşitli atomların çekirdeklerinin manyetik momentlerinin manyetik alanlarla etkileşimi prensibine dayanır. Çekirdeklerin manyetik momenti, bu çekirdeklerin sahip olduğu açısal momentumun bir biçimi olan nükleer spin ile ilişkilidir. Nükleer spinin değeri de bir spin sayısı ile tanımlanır. Çift sayıda proton ve nötronun çekirdeği sıfır nükleer dönüş ve manyetik momente sahipken, tek sayıda proton veya nötrona sahip olanlar sıfır olmayan bir dönüş ve manyetik momente sahiptir. Tek sayıda proton veya nötron içeren çekirdekler manyetik rezonansın pratik uygulamaları için uygun olan $\frac{1}{2}$ spin sayısına sahiptir (Mlynarik, 2017).

NMR spektrumunda yer alan bilgiler, malzemelerin kimyasal yapısını ve yapısını belirlemek için kullanılabilir. Örneğin, etanolün hidrojen (^1H) NMR spektrumu, üç hidrojen grubuna karşılık gelen üç frekans içerir ve tepe yükseklikleri, her bir kimyasal gruptaki ^1H çekirdeklerinin sayısı ile orantılıdır. Proteinler gibi daha büyük moleküller, üç boyutlu çözelti yapısını belirlemek için kullanılabilen çok daha karmaşık spektrumlara sahiptir. Sonuç olarak, NMR spektropisi ile bir numuneyi bir manyetik alana yerleştirerek ve bir sinyali uyararak, numunenin kimyasal içeriği ve yapısı tahribatsız bir şekilde belirlenebilir (Chatham ve Blackband, 2001).

7.3. Termal gravimetrik Analiz (TGA)

TGA, bir maddenin kütlesinin sıcaklığın veya zamanın bir fonksiyonu olarak gözlemlendiği bir termal analiz tekniğidir. Numunenin ısıtılması izotermal veya izotermal olmayan koşullarda olabilir. Geleneksel TGA deneylerinde, piroliz doğası gereği (oksijen yokluğunda ısıtma işlemi) yaygın kullanılan inert gazlar (azot, argon, helyum) çevreyi kontrol etmek için numunenin üzerinden geçirilir. Analizden elde edilen sonuçlar genellikle TG eğrileri şeklindedir. Bu eğriler, numunenin artan sıcaklığa (T) karşı ağırlık kaybı yüzdesini (ağırlıkça) gösterir. Sıcaklık arttıkça, numunenin termal bozunmasından kaynaklanan kütle kaybı nedeniyle ağırlık azalır. Polimerlerde 150°C 'nin altında su; 150°C - 250°C arasında düşük moleküler ağırlıklı uçucu bileşikler, oligomerler, çözücüler ve polimerin türüne göre yaklaşık 800°C ye kadar uçucu bileşenler ortaya çıkar (Escalante vd., 2022).

7.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

DSC kontrollü bir şekilde ısıtıldığında veya soğutulduğunda bir malzemeyle ilişkili çeşitli termal geçişleri ölçer. Bu tür geçişler arasında erime sıcaklığı (T_m), camı geçiş sıcaklığı (T_g), kristallenme sıcaklığı (T_c), polimorf dönüşümü, desolvasyon, dehidrasyon ve kimyasal reaksiyonlar yer alır (Byrn, Zografi, Chen, 2017).

Bu özellikler polimer malzemeler için de önemli olduğu için DSC, polimerleri ve kompozitleri karakterize etmede sıklıkla kullanılan termal analizlerden biridir. DSC ;geleneksel DSC, Paralel-Nano DSC (PNDSC), Mikro Elektro Mekanik Sistemler (MEMS) DSC, Modüle Sıcaklık DSC (MTDSC), Kızılötesi (IR) ısıtmalı DSC, Gaz Akışı Modülasyonlu DSC (GFMDSC)), Yüksek Performanslı (HPer) DSC, Flaş DSC ve Kendinden Referanslı DSC (SRDSC) gibi birçok tekniğe sahiptir.

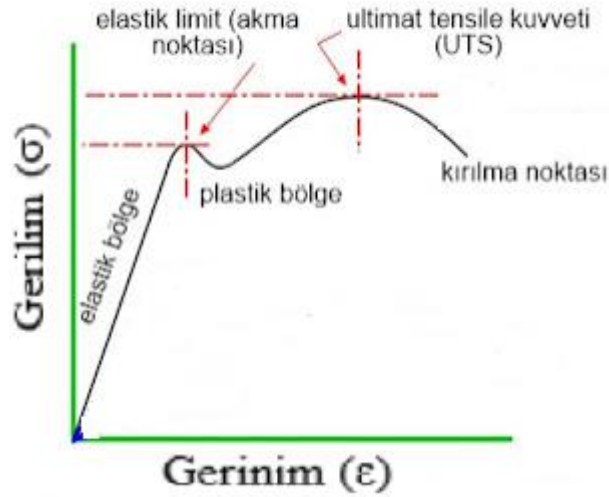
Geleneksel DSC yöntemine genel olarak bakıldığında, test malzemesi içeren bir numunenin bir referans numune ile karşılaştırılmasını kullanarak ısı transferinin ölçülmesini içeren DSC tekniklerinin temel yöntemidir. Ölçüm sırasında sabit bir ısıtma veya soğutma oranı korunur. DSC, polimerik malzemelerin erime noktası, camsı geçiş ve kristalleşme gibi özelliklerine göre tanımlanmasında kullanılır (Drzezdzon vd., 2019).

7.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), mikro yapı morfolojisi ve kimyasal bileşim karakterizasyonlarının incelenmesi ve analizi için mevcut olan çok yönlü araçlardan biridir. Elektron mikroskobunun temellerini anlamak için ışık optiğinin temel ilkelerini bilmek gerekir. Çıplak göz, ~0,1 mm'lik bir çözünürlüğe karşılık gelen (25 cm'lik optimum görüş mesafesinde) yaklaşık 1/60° görüş açısına sahip nesneleri ayırt edebilir. Optik mikroskopi, görsel açıyı optik lens aracılığıyla genişleterek ~ 2.000 Å çözünürlük sınırına sahiptir. 1890'larda çok sayıda deneyde elektronların manyetik alan tarafından saptırılabilmesinin keşfedilmesinden bu yana, ışık kaynağının yüksek enerjili elektron ışını ile değiştirilmesiyle elektron mikroskobu geliştirilmiştir (Zhou vd., 2007). Nanometreden mikrometreye (µm) geniş bir ölçekte organik ve inorganik malzemelerin analizinde etkili bir yöntem olarak kabul edilebilir. SEM, çok çeşitli malzemelerin çok hassas görüntülerini üretirken 300.000x gibi yüksek büyütme oranlarında çalışabilir (Mohammed ve Abdullah, 2018). SEM kullanımında görüntü alınabilmesi için iletkenlik önem taşıdığı için iletken olmayan malzemelere altın ile vakum altında kaplama yapılarak önce iletkenliği sağlanıp sonra görüntü alımı yapılabilmektedir.

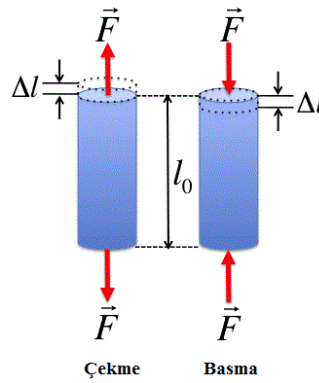
7.6. Mekanik Testler

Malzemelere istenilen özelliklerde ve farklı metotlarla mekanik testler uygulanmaktadır. Bunlar içinde çekme ve basma testleri, malzemeler üzerinde yapılan en yaygın mekanik testlerdir. Bir numunenin sabit bir hızla birbirinden ayrılan çeneler arasında kenetlendiği çekme testi, polimer testi için en yaygın deformasyon modudur. Numuneler, ASTM D638'e eşdeğer olan ISO 527-1 standartlarında “dog bone” şeklinde kullanılır (Swallowe, 1999). Çekme testi sonuçlarında gerilme-gerinim eğrileri (Şekil 7.1) esas alınarak modül hesaplamaları yapılır.



Şekil 7.1. Termoplastik bir polimer için gerilim-gerinim eğrisi

Gerilim-gerinim eğrisindeki doğrusal olan elastik bölgenin eğimi Young modülünü verir ve $E = \sigma/\epsilon$ şeklinde formülize edilir. Gerilme için $\sigma = F/A_0$ formülü kullanılırken, F , çekme kuvveti; A_0 , başlangıç yüzey alanı olarak ifade edilir. Gerinme için ise, $\epsilon = \Delta L / L_0$ formülü kullanılırken, ΔL , numune boyutundaki değişim; L_0 , başlangıç boyu olarak ifade edilir.



Şekil 7.2. Numunelere uygulanan çekme ve basma kuvvetleri ile boyutlarındaki değişim (http-6)

Basma testi, malzemenin sıkıştırıldığında nasıl tepki vereceğini gösterir, malzemenin davranışını veya ezme yükleri altındaki tepkisini belirleyebilir ve bir malzemenin plastik akış davranışını ve kırılma limitlerini ölçebilir. Basma testleri, kırılma malzemelerin veya düşük süneklikteki malzemelerin elastik ve basınçla kırılma özelliklerini ölçmek için önemlidir (Chua ve Yeong, 2017). Numuneler genellikle üretim yöntemlerine göre silindirik yada dikdörtgen şeklinde basma testlerine tabi tutulur.

8. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

8.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan malzemeler ve özellikleri Tablo 8.1’de gösterilmiştir.

Tablo 8.1. Çalışmada kullanılan malzemelerin özellikleri

Malzeme	Özellikleri
Toluen (C_7H_8) (Isolab chemicals)	Yoğunluk: 0,87 g/cm ³ (20°C)
Kloroform ($CHCl_3$) (Isolab chemicals)	Yoğunluk: 1,47 g/cm ³ (20°C)
Metanol (CH_3OH) (Merck)	Yoğunluk 0,79 g/cm ³ (20 °C) Erime noktası: -97,8 °C
Laktit (3,6 Dimetil-1,4-dioksan-2,5 dion)(Sigma Aldrich)	Kaynama noktası: 142 °C/8 mmHg Erime noktası: 116-119 °C
Glikolit (1,4 Dioksan-2,5 dion) (Sigma Aldrich)	Erime noktası: 81-83 °C
Kalay (II) 2-etilheksanoat (Sigma Aldrich)	Yoğunluk: 1,251 g/L (25°C)
Sodyum klorür (NaCl) (Sigma Aldrich)	Erime noktası: 801 °C Yoğunluk: 2,16 g/cm ³
Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) (Tekkim)	Erime noktası: 270°C
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Tekkim)	Erime noktası:250 °C
Magnezyum klorür hekzahidrat ($MgCl_2.6H_2O$) (Tekkim)	Erime noktası: 117 °C
Hidrojen klorür (HCl) (Isolab chemicals)	Yoğunluk:1,19 g/cm ³ (20 °C)
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$) (Sigma Aldrich)	Yoğunluk:2,15 g/cm ³ (25 °C) Erime noktası: 775 °C

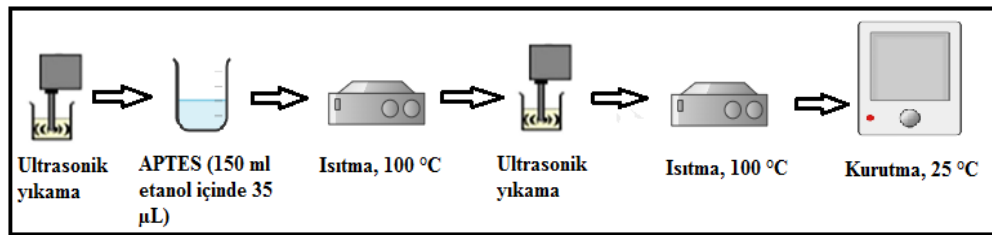
Tablo 8.1. (Devam) Çalışmada kullanılan malzemelerin özellikleri

Sodyum sülfat (NaSO ₄) (Tekkim)	Erime noktası: 884 °C
Tris (hidroksimetil)aminometan((CH ₂ OH) ₃ CNH ₂) (Carlo Erba)	Erime noktası: 175 °C Kaynama noktası: 219 °C
Dipotasyum fosfat (K ₂ HPO ₄) (Isolab chemicals)	Yoğunluk: 2,44 g/cm ³ Kaynama noktası: 158 °C
Nanoselüloz (Mikrokrystalin selülozun asit hidrolizi yoluyla elde edilmiştir.)	Çapı: 15-20 nm En/boy oranı:20-25
45S5 Biyoaktif cam	Ortalama tane boyutu: 114 µm (Dx(50) µm)
APTES (3-Aminopropil)trietoksisilan (Acros organics)	Yoğunluk:0,946 g/mL at 25 °C

8.2. Biyoaktif Cam Modifikasyonu

Deneysel çalışmalarda katkı malzemesi olarak kullanılan biyoaktif cam (sBG) “Nanotech (Eskişehir)” firması tarafından temin edilmiştir. Silan ile modifiye edilerek kullanılmıştır ve modifikasyon yöntemi aşağıdaki gibidir:

Biyoaktif cama uygulanan silanlama işleminde, yüzeyde silan bağlanmasını ve fonksiyonel grup oluşumunu sağlamak için 5 dakika asetonda ve 3'er kez de 5 dakika saf suda ultrasonik yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, numuneler oda sıcaklığında 6 saat boyunca etanol bazlı 3- aminopropiltrietoksisilan (APTES, %99, 150 ml etanol içinde 35 µL APTES) çözeltisine daldırılmıştır. Bu ıslatma işlemi sonunda numuneler 1 saat 100°C'de mekanik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Oda koşullarında soğutmaya bırakılan numuneler, silan fazlalığını gidermek için etanol ile 5 dakika boyunca üç kez ultrasonik banyoda yıkanmış ve tekrar 1 saat 100°C'de mekanik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Deneysel çalışmanın şematik gösterimi Şekil 8.1'de gösterilmiştir.

**Şekil 8.1.** Biyoaktif camın modifikasyonu için deney aşamaları

8.3. Poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) Kopolimerinin Sentezi

Doku iskelelerini hazırlamak için kullanılan PLGA kopolimeri laboratuvar çalışmalarında sentezlenmiştir. Bu süreç dimer saflaştırma ve polimerizasyon basamaklarından oluşmaktadır.

I.aşama: Dimerlerin Saflaştırılması

Bu aşama sentez öncesi dimerlerin (laktit ve glikolit) saflaştırılıp, tekrar kristallendirilmesini kapsamaktadır. Dimer/Toluen oranı ağırlıkça %40 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde küçük bir beher içine alınan dimer ve toluen, beherin ağzı kapatılarak su seviyesi hazırlanan solüsyonun seviyesini geçmeyecek şekilde su banyosunun içine koyulmuş (Görsel 8.1), 100 °C’de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süzme işleminin ardından vakumlu etüvde 1 gün bekletilerek çözücü uçurulmuştur. Bu işlemi yapmaktaki amaç, daha yüksek verimlilikte polimerizasyon gerçekleştirmek ve daha yüksek molekül ağırlığında bir polimer elde etmektir.



Görsel 8.1. Dimer saflaştırma deney düzeneği

II.aşama: Polimer Sentezi

Yığın (blok) polimerizasyonu ile gerçekleştirilen yöntemde, kalay (II) 2-etilhekzanoat (SnOct)₂ katalizörü seçilmiştir. Bu katalizör FDA tarafından onaylanmış bir gıda katkı maddesi ve kuvvetli bir esterleşme ajanıdır (Nuhoğlu, A.İ., 2015). Dolayısıyla alifatik polyesterlerin polimerizasyon reaksiyonlarında sıklıkla tercih edilmektedir.

Bu denemede laktit ve glikolit dimerleri 80:20 ve 90:10 oranlarında, katalizör de 1:1000 oranında kullanılmıştır.

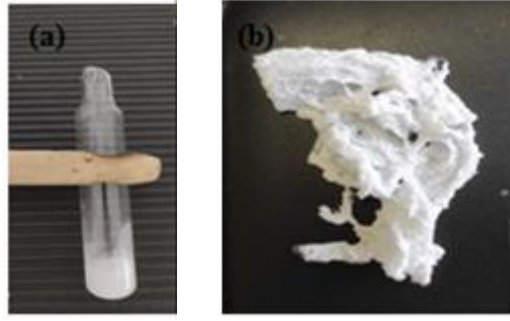
Katalizör toluen içinde çözündürülerek kullanılmıştır. 80:20 oranındaki kopolimer, PLGA 8 olarak; 90:10 oranındaki kopolimer ise PLGA 9 olarak isimlendirilmiştir. Cam reaktöre dimerler ve 0,5 ml katalizör çözeltisi eklendikten sonra toluen vakumla 20-25 dakika boyunca reaksiyon ortamından uzaklaştırılmıştır (Görsel 8.2a).

10 dakika boyunca azot geçirildikten (Görsel 8.2b) sonra reaktörün ağzı kapatılmış ve 120 °C’de önceden ısıtılmış olan etüve koyulmuştur. Etüve konulduktan sonraki ilk bir saat içerisinde reaktör belirli aralıklarla elle çalkalanarak karıştırılmış ve polimerizasyonun daha homojenize gerçekleşmesi sağlanmıştır. Sonrasında reaktör 24 saat süreyle 120 °C’de etüvde tutulmuş ve bu sürenin sonunda etüvden alınan reaktör oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır.



Görsel 8.2. (a)Tuzaklı vakum pompası (b)Polimer sentezinde kullanılan cam reaktör

Elde edilen kopolimeri saflaştırmak için oda sıcaklığında olan polimer önce kloroformda çözülmüş, sonra mekanik karıştırıcı yardımı ile soğuk metanolde çöktürülmüştür. İşlem sonucunda polimer 48 saat süre ile vakumlu etüvde 45°C’de kurutulmuştur. Elde edilen polimer, +4 °C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Polimerin polimerizasyon sonrası ve saflaştırma işlemi sonrasındaki görüntüleri Görsel 8.3’te gösterilmiştir.



Görsel 8.3. PLGA kopolimeri (a) polimerizasyon sonrası (b) saflaştırma işlemi sonrası

8.4. Çözücü Döküm/Partikül Uzaklaştırma Yöntemi ile Doku İskelesi Hazırlanması

Yöntem olarak çözücü döküm/partikül uzaklaştırma yöntemi seçilerek deneyler yapılmıştır. Öncelikle farklı oranlardaki (Tablo 8.2) katkı maddesinin (biyoaktif cam (sBG) ve/veya nanoselüloz (NC)) ultrasonikasyon cihaz kullanılarak oda sıcaklığında kloroform içinde dağılması sağlanmıştır.

Tablo 8.2. Hazırlanan doku iskelelerinin farklı kompozisyonları

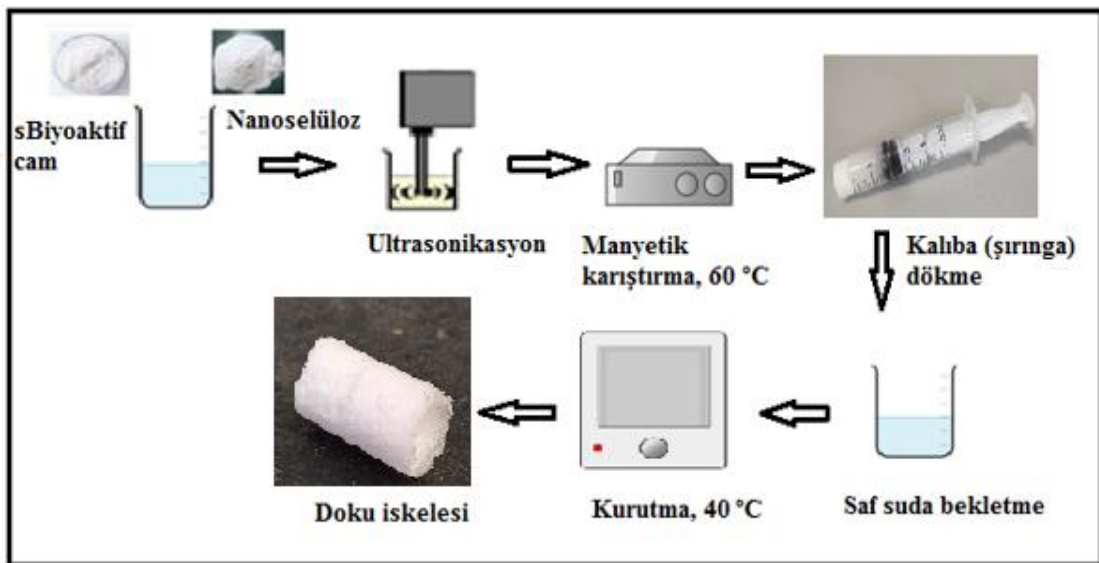
	sBG(%)	NC (%)
PLGA 8	-	-
PLGA 9	-	-
PLGA 8/5 sBG	5	-
PLGA 8/10 sBG	10	-
PLGA 8/15 sBG	15	-
PLGA 8/20 sBG	20	-
PLGA 8/5 NC	-	5
PLGA 8/10 NC	-	10
PLGA 8/15 NC	-	15
PLGA 9/5 sBG	5	-
PLGA 9/10 sBG	10	-
PLGA 9/15 sBG	15	-
PLGA 9/20 sBG	20	-
PLGA 9/5 NC	-	5
PLGA 9/10 NC	-	10
PLGA 9/15 NC	-	15

Tablo 8.2. (Devam) Hazırlanan doku iskelelerinin farklı kompozisyonları

PLGA 9/10 sBG/15 NC	10	15
PLGA 9/10 sBG/5 NC	10	5
PLGA 9/20 sBG/5 NC	20	5
PLGA 9/20 sBG/15 NC	20	15

Daha sonra PLGA polimeri eklenip, 60 °C’de su banyosunda polimer çözünene kadar (yaklaşık 45 dk) mekanik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Gözenekliliği arttırmak için karışım içine (polimer/porojen oranı=1:9 olacak şekilde) NaCl (224-425 µm) eklenerek bu şekilde 2 saat kadar karıştırılmaya devam edilmiştir. Yoğunlaşan karışım kalıp işlevi gören şırıngaya dökülmüştür. Çözücüsü uçurulan doku iskelesi şırıngadan çıkarılarak, saf su içine koyulmuş ve tuzu yapıdan uzaklaştırmak için 3-4 gün bekletilmiştir. Bu işlem sırasında su belli aralıklarla yenilenmiştir. Son olarak doku iskelesi vakumlu etüvde 40 °C’de kurutulmuştur. Doku iskelelerinin üretim basamakları Şekil 8.2’de gösterilmiştir. Deneylerde öncelikle her iki orandaki PLGA polimeri ile ikili kompozitler (PLGA/ sBG ve PLGA/NC) şeklinde doku iskeleleri üretilmiş ve her iki grup için karakterizasyon yapılmıştır.

Sonraki aşamada tek bir polimer oranı seçilmiş (90:10), optimum koşulları sağlamak adına üçlü kompozit (PLGA 9/sBG/NC) yapılar üretilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Üçlü üretimlerde esas amaçlanan, çalışmanın orijinalliğini de belirleyen nanoselüloz katkısının yapıya etkisini incelemek olmuştur.



Şekil 8.2. Doku iskelesi üretimi şematik gösterimi

8.5. Biyoaktif Cam, PLGA ve Üretilen Kompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

8.5.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrometresi analizi

APTES ile modifiye edilen biyoaktif camın yapısındaki amin gruplarının, saf biyoaktif cam ile arasındaki kimyasal farklılıkların belirlenmesi ve sentezlenen polimer ile biyoaktif cam ve nanoselüloz katkılı doku iskelelerinin yapısındaki fonksiyonel grupların karakterizasyonu için FTIR spektroskopisi kullanılmıştır.

FT-IR spektrometresi analizi Kimya Mühendisliği Bölümü laboratuvarında bulunan Thermo Scientific Nicolet IS10 FT-IR kullanılarak 4000-600 cm^{-1} aralığında gerçekleştirilmiştir.

8.5.2. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrometresi analizi

^1H -NMR Spektrometresi Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (BİBAM) Bruker 400 MHz ile ve çözücü olarak CDCl_3 (dötero kloroform) kullanılarak yapılmıştır.

8.5.3. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) analizi

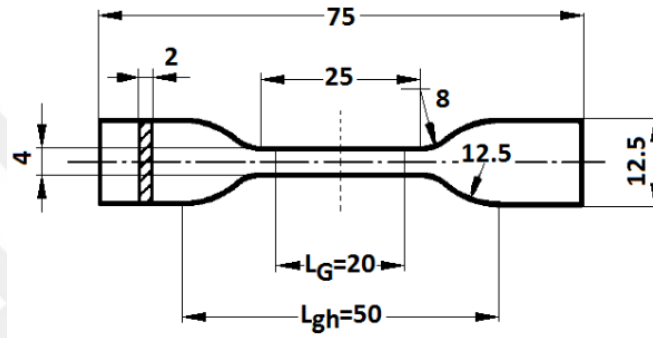
Molekül ağırlığı ölçümü için GPC (Jel Geçirgenlik Kromatografisi) Analizi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Teknoloji ve İnovasyon Merkezi Polimer Araştırma Laboratuvarı'nda Refraktif İndeks dedektörü ile tetrahidrofuran içerisinde çözünerek yapılmıştır. Burada bir polimerin moleküler ağırlık dağılımı "heterojenlik indeksi (H.I.)" ya da "polidispersite" olarak ifade edilmiştir. Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığının (M_w) sayıca ortalama molekül ağırlığına (M_n) oranı ile hesaplanmaktadır. ($\text{H.I.} = M_w / M_n$)

8.5.4. Çekme testi

Sentezlenen polimerin mekanik ölçümleri Instron 5944 model çekme testi cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu test yöntemi ile çekme gerilmesi, kopmada uzama ve modülüs değerleri ölçülmüştür. Numune enjeksiyon kalıplama cihazında 180 °C'de ve 3 bar basınçta, ISO 527-5A prosedürüne göre dog bone şeklinde üretilmiştir ve uç kısımlarından çekme testi cihazının çenelerine tutturularak 1 mm/dk çekme hızıyla ölçümler gerçekleştirilmiştir. ISO 527-5A standartlarına göre en az 4 numune ile ölçüm alınarak ortalaması hesaplanmıştır. Görsel 8.4'te çekme testi yapılan cihaz ve dog bone şeklinde üretilen numune; Şekil 8.3'te ise ISO 527-5A standardına göre numune boyutları gösterilmektedir.



Görsel 8.4. (a) Çekme testi cihazı (b) dog bone şeklindeki numune



Şekil 8.3. ISO 527-5A standardına göre numune boyutları (mm cinsinden)

8.5.5. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

DSC analizi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği laboratuvarında, polimerin ve doku iskelelerinin termal davranışını belirlemek için, DSC Q2000-TA cihazı kullanılarak ısıtma /soğutma /ısıtma yöntemi ile 5 mg numune hazırlanarak oda sıcaklığından 10 °C/dk ısıtma hızıyla 20°C' den 200 °C'ye ilk ısıtma devamında oda sıcaklığına soğutulur ve ikinci ısıtmada tekrar 200 °C'ye çıkılarak azot atmosferinde yapılmıştır.

8.5.6. Termogravimetrik (TGA) analiz

Sentezlenen polimerin TGA analizi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği laboratuvarında TGA Q500- TA cihazı ile 8 mg numune hazırlanarak oda sıcaklığından 800 °C'ye kadar 10 °C/dk ısıtma hızıyla azot atmosferinde yapılmıştır. Farklı katkı maddeleriyle hazırlanan doku iskelelerinin termal bozunma davranışı da aynı koşullar altında incelenmiştir.

8.5.7. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Biyoaktif camın ve doku iskelelerinin yüzey morfolojisini incelemek amacıyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM) SEM laboratuvarında JEOL JSM 5600 marka SEM cihazı kullanılarak analiz yapılmıştır. Numunelerin yüzeyi incelenmeden önce görüntü alınabilmesi için her bir numune AGAR sputter kaplama cihazında 60 saniye altın-paladyumla kaplanmıştır.

Biyoaktif cam ve nanoselüloz katkılı doku iskelelerinin gözenek çap dağılımını belirlemek için bir görüntü analiz yazılımı (ImageJ) kullanılmıştır. Her doku iskelesi numunesi için rastgele 50 por çapı ölçülerek çap dağılım histogramları oluşturulmuştur.

8.5.8. Gözeneklilik hesaplaması

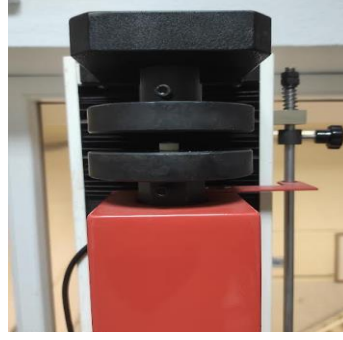
Doku iskelelerinin gözenekliliği *Archimedes* Prensibi kullanılarak ölçülmüştür. Bu geliştirilmiş yöntemde, bir doku iskelesinin gözenekliliğini ölçmek için piknometre kullanılmıştır. Arşimet prensibine göre aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak hesaplama yapılmıştır (Yang vd., 2002).

$$\varepsilon = (W_2 - W_3 - W_s) / (W_1 - W_3) \quad (8.1)$$

Burada ε ; poroziteyi, W_1 ; etanol ile dolu şişenin ağırlığını, W_2 ; etanolle dolu şişeye doku iskelesi daldırılıp, hava kabarcıkları boşaltıldıktan sonra şişe tekrar etanolle doldurulup tartıldıktan sonraki ağırlığını, W_s ; doku iskelesi ağırlığını, W_3 ; doku iskelesi şişeden çıkarıldıktan sonraki şişenin ağırlığını ifade etmektedir.

8.5.9. Basma testi

Doku iskelelerinin mekanik özelliklerini belirlemek için, numuneler 10 mm çapında ve 10 mm kalınlığında silindirik şekilde hazırlanarak (üretim esnasında şırıngaya döküm yapılmıştır) ve Osmangazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölüm laboratuvarında bulunan Computer Control Electronic Universal Test Machine (WDW-5) (Görsel 8.5) kullanılarak basma modunda yapılmıştır. Testler en az 4 numune ile ölçüm alınıp ortalaması hesaplanacak şekilde, oda sıcaklığında 5 kN kuvvetle ve 1 mm/dk sabit basma hızıyla gerçekleştirilmiştir.



Görsel 8.5. Basma testi düzeneği

8.5.10. Apatit oluşumu

Doku iskelesi yüzeyinde kemik dokunun büyük bir bölümünü oluşturan apatit oluşumunu tespit edebilmek için Tablo 8.3.'teki miktarlara göre hazırlanan 20 ml simüle vücut sıvısı (SBF) kullanılmıştır. Tabloda hazırlanan çözelti ve insan plazmasında yer alan reaktifler ve miktarları karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Kimyasallar sırasıyla saf su içine her bir numune tamamen çözündükten sonra eklenmiştir. En son işlem olarak pH'ı 7,4'e ayarlamak için 1 M HCl damla damla çözelti içine eklenmiştir. SBF içerisine daldırılan doku iskeleleri 37 °C ve 100 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde 3,7 ve 14 gün süreyle bekletilmiş, daha sonra 48 saat süreyle vakumlu etüvde kurutulmuştur.

Tablo 8.3. SBF solüsyonu (Jalota, 2008)

Reaktif	Miktar (g)	İyon	Hazırlanan SBF (mM)	İnsan plazması(mM)
NaCl	6,547	Na ⁺	142	142
NaHCO ₃	2,268	HCO ₃ ⁻	125	103
KCl	0,373	K ⁺	27	27
Na ₂ HPO ₄	0,178	HPO ₄ ²⁻	5	5
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,305	Mg ²⁺	1,5	1,5
1.0M-HCl	30 ml	Cl ⁻	2,5	2,5
CaCl ₂	0,368	Ca ²⁺	1	1
Na ₂ SO ₄	0,071	SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

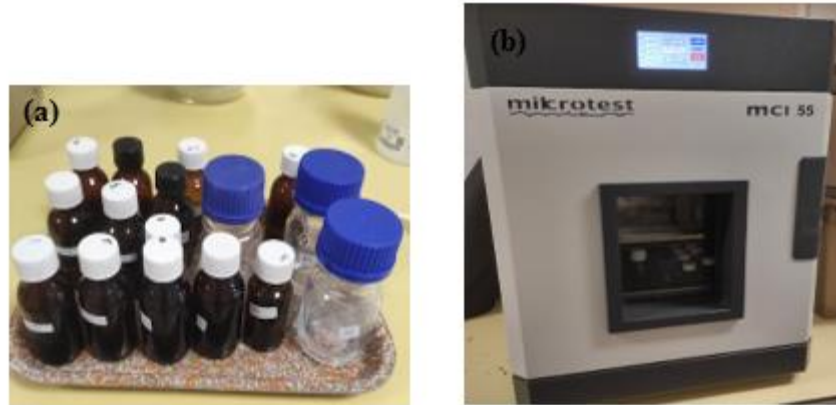
Tablo 8.3. (Devam) SBF solüsyonu (Jalota, 2008)

$(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$	6,057	-		
1 M-HCl	-	-	pH 7,4	pH 7,4

Deney bitiminde her bir numune AGAR sputter kaplama cihazında 60 saniye altınla kaplanıp, SEM ve SEM-EDS analizleri yapılmıştır.

8.5.11. Hidrolitik bozunma

Bozunurluk deneyinde Tablo 8.4'teki miktarlara göre hazırlanan 20 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisine daldırılan doku iskeleleri (~ 20 mg) 37 °C ve pH=7,4 olacak şekilde 60 rpm'de çalkamalı inkübatörde bekletilmiş ve haftalık tartımlar yapılarak ağırlık kaybı ile pH'ı ölçülmüştür. Solüsyon aylık periyotlarla yenilenmiştir. Görsel 8.6a'da numuneler ve 8.6b'de inkübatör cihazı gösterilmiştir.



Görsel 8.6. (a) Solüsyon içindeki numuneler (b) inkübatör cihazı

Tablo 8.4. Fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonu

Reaktif	Miktar(g)
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,44
K ₂ HPO ₄	0,24

8.5.12. Şişme Testi

Doku iskelelerinin su tutma kapasitesi şişme testi ile belirlenmiştir. Numuneler tartıldıktan sonra 24 saat boyunca 37 °C'de 20 ml fosfat tamponlu tuz (PBS, pH = 7,4) çözeltisinde bekletilmiştir. Numune başlangıçta ıslak durumda ve yüzeyindeki su uzaklaştırıldıktan sonra belli aralıklarla tartılmıştır. Şişme derecesi aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$\text{Şişme derecesi} = [(W - W_0) / W_0] \quad (8.2)$$

Burada, W_0 başlangıç ağırlığını ve W numunenin ıslak ağırlığını ifade etmektedir.

8.5.13. Hücre çalışmaları

8.5.13.1. Sitotoksikite ve hücre canlılığı analizi

Ekstraksiyon Hazırlanması:

Her numune derişimi 10 mg/mL olacak şekilde DMEM- glikoz besiyeri içerisinde alınmıştır. Bu besiyeri içerisinde 34°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası elde edilen ekstrakt 1000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı kısım yeni steril bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine etiketleme yapılan ekstrakt numunesinden bir kısmı hemen deneye alınmış, kalan numune miktarı - 20°C'de dondurularak tekrar edilme olasılığına karşı stoklanmıştır.

Hücrelerin Pasajlanması:

Sıvı azot tankı içerisinde taşınımı yapılan hücreler (h FOB 1.19-insan fetal osteoblast hücresi) için gerekli kalite kontrol testi olarak Mycoplasma kontaminasyonu ve doubling time kontrolü yapılarak çalışmalara sonrasında devam edilmiştir. Hücrelerin pasajlanması için DMEM/F12 (1:1) besiyeri kullanılmıştır. Tam besiyeri içeriği DMEM/F12+ %10 FBS+ %1 L Glutamine + 0,3 mg/mL G418- Geneticin'dir. Hücreler T25 flasklarda 7 mL besiyeri içerisinde, T75 flasklarda 20 mL besiyeri içerisinde inkübe edilmişlerdir. Her pasaj iki günde bir kontrol edilmiş ve besiyeri %50 oranında değiştirilmiştir. Hücreler ile yapılan çalışma bir sonraki pasaja ya da sitotoksikite testine alınacaksa % 65-75 konfluensiye ulaştığında, hücreler dondurularak saklanacaksa % 75-85 konfluensiye ulaştığında hücreler zeminden kaldırılmıştır.

Hücrelerin Kaldırılması:

Çoğaltılan hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştıklarında zeminden kaldırılmaları gerekmektedir. Bu aşama tripsinizasyon olarak da bilinir. Zeminden kaldırma işleminde aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulanmıştır.

1. Çoğalmış hücrelerin üzerindeki besiyeri serolojik pipetle çekilerek atılmıştır.
2. Hücrelerin üzerine soğuk PBS eklenmiş yavaşça çalkalanarak PBS atılmıştır. (T25 Flask için 2 mL, T75 Flask için 5 mL)
3. Hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA eklenmiştir.
4. 34°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5. Süre sonunda mikroskopta kontrol edilerek hücrelerin tamamen yüzer şekilde olup olmadığı kontrol edilmiştir.
6. Hücreler tamamen zeminden ayrıldıktan sonra bulunduğu flasktan yıkanarak santrifüj tüplerine alınmıştır.
7. 300xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj sonrası tüpün dibindeki pelet kaldırılmadan yavaşça üstte bulunan sıvı atılmıştır.
9. Kalan hücre üzerine 1 mL besiyeri eklenerek sayım işlemine geçilmiştir.

Live/Dead Değerlendirmesi için Hücrelerin Çoğaltılması:

Doğrudan temas yönteminde olduğu gibi biyomateryaller hücreler ile belirlenen sürelerde inkübe edilmiştir. Süre sonunda 100 µL Live-Dead boyası eklenerek hücrelere floresan mikroskop altında bakılmıştır.

Hücrelerin Sayılması:

Hücreler Trypan Blue boyası ile boyanarak sayım işlemi yapılmıştır. 10 mikrolitre Trypan Blue Boyası ile 10 mikrolitre hücre solusyonu karıştırılmıştır. Luna II otomatik sayım cihazında sayım yapılmıştır.

Hücrelerin Dağıtılması:

Sayım yapıldıktan sonra her kuyucuk başına 10⁴ hücre gelecek şekilde tam besiyeri yeri ile seyreltme işlemi yapılmıştır. Hücreler her kuyucukta 100 mikrolitre tam besiyeri içerisinde olacak şekilde kuyulara dağıtılmıştır. Çalışmanın konsantrasyon sayısından bağımsız olarak mutlaka pozitif kontrol (toksisite kontrol), negatif kontrol (canlılık kontrol) kuyularına hücre içeren tam besiyeri eklenmiştir. Dağıtım yapıldıktan sonra en az 24 saat hücrelerin zemine tutunması için beklenmiştir.

24 saat sonunda yapılan kontrollerde hücrelerin her kuyucukta % 70-75 konfluenside olması beklenmiştir. Eğer hücreler % 70-75 konfluensiye ulaşmadıysa bir gün daha inkübasyona devam edilmiştir.

Çalışmanın Başlatılması:

Çalışmada 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL ve 0,125 mg/mL konsantrasyonlar kullanılmıştır. Her konsantrasyona ait 24 saat ve 72 saatlik çalışmaları yapılarak analiz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler konfluensiye ulaştıklarında üzerlerindeki tam besiyeri çekilerek atılmıştır. Bunun yerine daha önce gerçekleştirilen ekstraksiyonu tam besiyeri ile karıştırarak gerekli konsantrasyonlar hazırlanmış ve hücrelerin üzerine pipet ile aktarılmıştır. Daha sonrasında analiz edilinceye kadar 34°C sıcaklıkta ve % 5 CO₂ inkübe edilmiştir.

WST-8 Uygulanması:

İnkübasyon süresinin bitimine 1 saat kala kuyucuklardaki besiyerinin %10'u kadar WST-8 reaktifi kuyucuklara eklenmiş ve inkübasyona 90 dakika daha devam edilmiştir.

WST-8 Analizi:

Ortalama 90 dakika inkübasyon sonrasında örnekler hemen ELISA reader (numunelerdeki biyolojik, kimyasal veya fiziksel olayları tespit etmek ve ölçmek için kullanılan mikroparka okuyucu) cihazında 450 nm ve 630 nm absorbans değerlerinde okuma yaparak analiz edilmiştir.

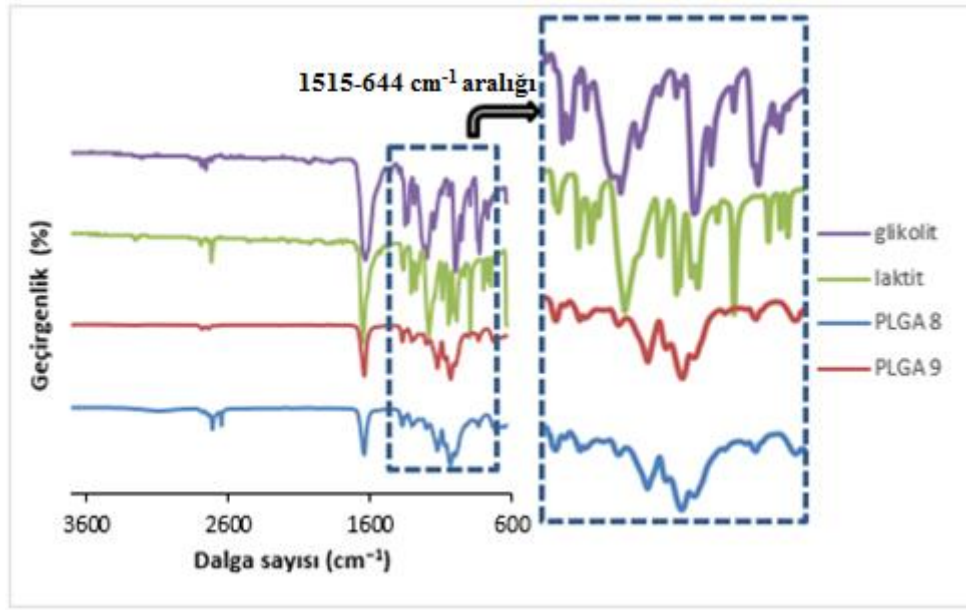
Live/Dead Analizi:

Doğrudan temas ile sitotoksite analizi yapılacak şekilde deneye başlanmıştır. Analizlerden önce tüm besiyeri çekilerek hücrelerin üzerine 100 µL Live/Dead analiz solüsyonu eklenmiş ve uygun sıcaklıkta 1-2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler FITC ve Texas Red filtreleri ile floresan mikroskopta gözlem yapılmıştır.

9. SONUÇLAR

9.1. PLGA, Doku İskeleleri ve Modifiye Biyoaktif Camın FT-IR Analizi

FT-IR spektroskopi, polimer, polimer karışımları ve polimer kompozit malzemelerdeki yapı kimyasal bileşimini ve bileşenlerin bağlanma düzenini aydınlatmak için gerekli ve önemli bir karakterizasyon tekniğidir (Singh vd., 2014). Dimer ve sentezlenen PLGA'lar için elde edilen FT-IR spektrumu Şekil 9.1'de gösterilmektedir.



Şekil 9.1. Dimerler ve polimerlerin FT-IR spektrumu

Karboksil grubu esas olarak, hidrojen bağıyla belirgin şekilde değişen iki karakteristik gerilme absorpsiyonu C=O ve O-H ile ilişkilidir (Rueda vd., 2015). Laktit ve glikolit dimerlerinde bulunan karbonil (C=O) gruplarının gerilmesinden dolayı sırayla 1727 ve 1760 cm^{-1} 'de güçlü pikler gözlemlenmiştir. 3542 ve 3450 cm^{-1} piklerinde sırayla laktit ve glikolit için O-H gerilmesi görülmüştür. 2923 cm^{-1} piki laktit için -CH₃ gerilmesini; 2967 cm^{-1} piki glikolit için -CH₂ gerilmesini temsil etmektedir (Pattaro vd., 2020). Karbonil asimetrik esneme titreşimleri (C=O) PLGA 8 için 1749 cm^{-1} 'de; PLGA 9 için 1745 cm^{-1} 'de görülmüştür. PLGA 8 için 1179 cm^{-1} 'de ve 1450 cm^{-1} 'de görünen pikler ve PLGA 9 için 1181 ve 1447 cm^{-1} 'de sırasıyla C-O gerilme ve O-H bükülme titreşimlerine karşılık gelmektedir. PLGA kopolimerlerinde ayrıca laktit (L)-laktit (L) ve glikolit (G)-glikolit (G) ile laktit (L)-glikolit (G) bağının dalgalanma titreşimine karşılık gelen $\sim 1378 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik -CH₂ varlığını göstermektedir (Pattaro vd., 2020).

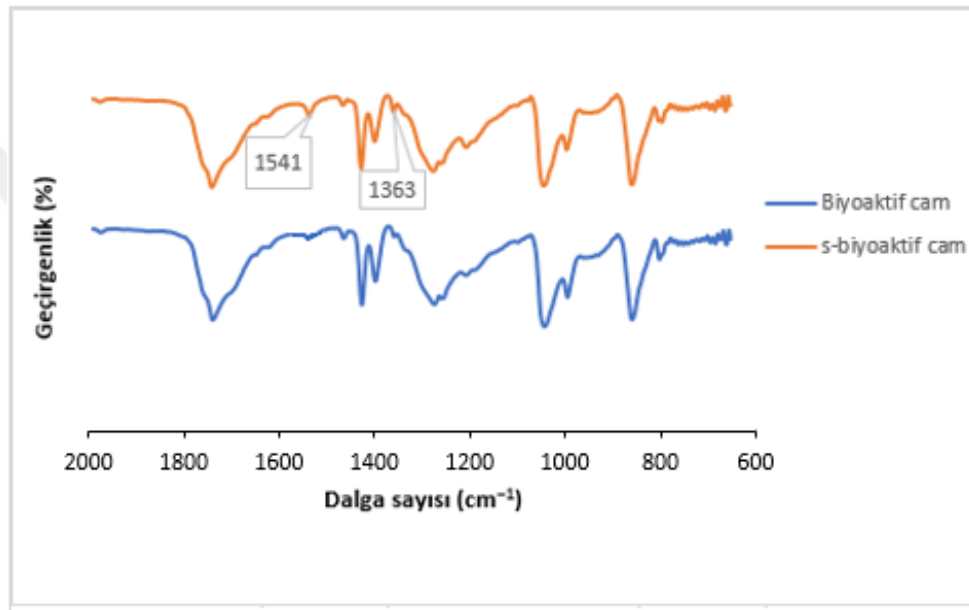
Glikolitin reaktivitesinin daha yüksek olması sebebiyle artan glikolit uç grubuna sahip bir zincir, başka bir glikolit birimi eklemek için 3:1 gibi bir orana sahipken, literatüre (Gilding ve Reed, 1979) göre artan laktit ucuna sahip eşdeğer bir zincir glikolit eklemek için 5:1 gibi bir orana sahiptir. Bu davranış sentezlenen PLGA kopolimerlerinde de gözlenir çünkü PLGA kopolimerlerinde G içeriğindeki artışa göre G-G bağlarından gelen $-\text{CH}_2$ yoğunluğu, L-G bağlarından gelen $-\text{CH}_3$ 'ün yoğunluğuna göre daha fazladır (Gilding ve Reed, 1979). PLGA 8 için 2915 cm^{-1} 'de ve PLGA 9 için 2990 cm^{-1} 'de $-\text{CH}_2$; PLGA 8 için 2847 cm^{-1} 'de ve PLGA 9 için 2937 cm^{-1} 'de $-\text{CH}_3$ gerilmeleri, C-O titreşimleri gözlenmiştir. 2915 ve 2990 cm^{-1} 'de görünen metilen grupları karakteristik olarak glikolit, 2847 ve 2937 cm^{-1} 'de görünen metil grubu da laktiti göstermektedir. Ayrıca dimer ve polimere ait karakteristik pikler Tablo 9.1'de listelenmiştir.

Tablo 9.1. Dimer ve PLGA'lara ait karakteristik IR pikleri

Laktit (L)	Glikolit (G)	PLGA 8	PLGA 9	Fonksiyonel grup (Pattaro vd., 2020)	Bağ
1727	1760	1749	1745	C=O	L ve G
1444		1450	1447	$-\text{CH}_3$	L-L
	2967	2915	2990	$-\text{CH}_2$	G
2923		2847	2937	$-\text{CH}_3$	L
3542	3450			O-H	
		1179	1181	C-O	L
		1378	1378	$-\text{CH}_2$	L-G
	840			$-\text{CH}_2$	
917	929			C-COO	G
	1003				L
1033		1037	1039	C- CH_3	
1096		1079	1079	C-O-C	L-G

Saf ve silanlı biyoaktif cam için yapılan FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 9.2); saf ve silanlı biyoaktif cam için sırayla 657 ve 659 cm^{-1} 'de PO_4 grubu içindeki P-O gerilmeleri, 1040 ve 1044 cm^{-1} 'de Si-O-Si titreşimleri görülmektedir (Das vd., 2021)

FTIR spektrumu 1363 ve 1541 cm^{-1} 'de (Chen vd., 2010). APTES modifiyeli BG'de bulunan N-H bağı gerilme titreşim noktasına karşılık gelen karakteristik bir pik gösterir. N-H bağının saf biyoaktif cam yapısında olmaması modifikasyonun başarılı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, biyoaktif cama ait karakteristik pikler Tablo 9.2'de listelenmiştir.

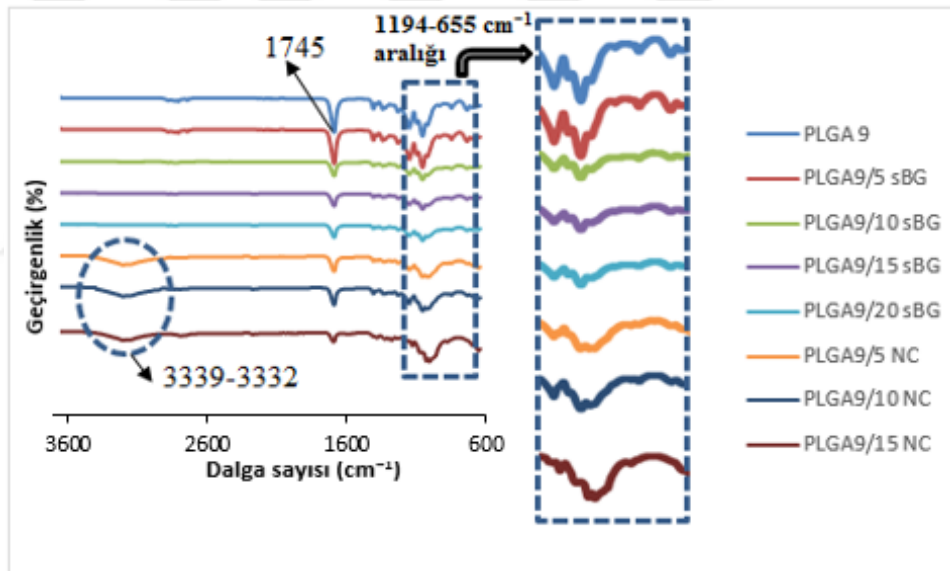


Şekil 9.2. Saf ve silanlı biyoaktif cama ait FT-IR spektrumu

Tablo 9.2. Saf ve silanlı biyoaktif cama ait karakteristik IR pikleri

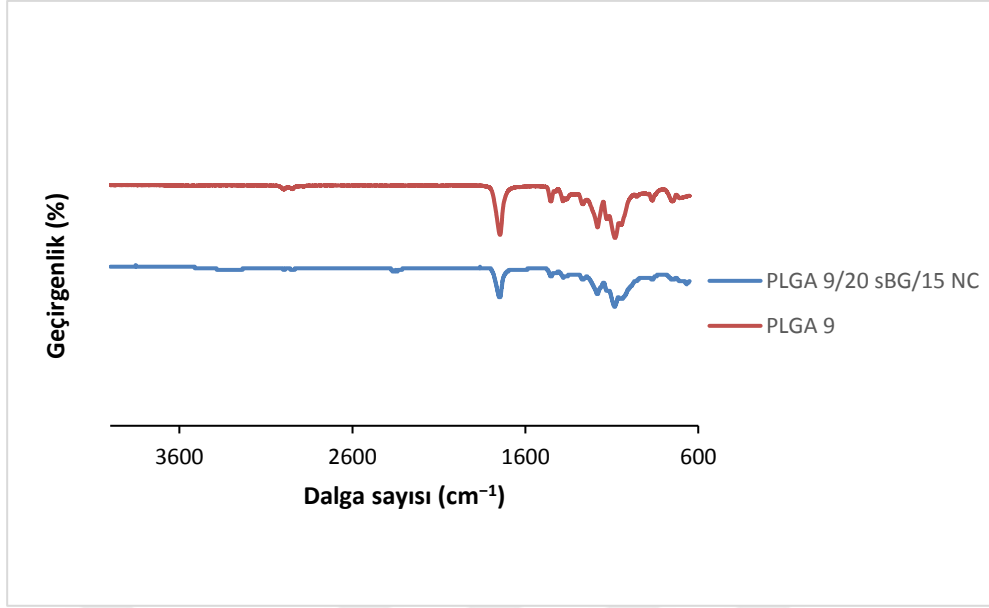
Fonksiyonel grup	Karşılık gelen pik (cm^{-1})
Si-O-Si asimetrik gerilme	1040, 1044
P-O bağı	657, 659
N-H bağı	1363, 1541

Şekil 9.3'te PLGA 9/sBG ve PLGA 9/NC ikili doku iskelelerine ait FTIR spektrumu ve 1194-655 cm^{-1} pik aralığının büyütülmüş hali gösterilmiştir. Sonuçlara göre tüm yapılarda 1745 cm^{-1} de güçlü karbonil (C=O) tepe noktası PLGA'nın karakteristik piki olarak görülmektedir (Renno vd., 2013). BG partikülleri içeren iskelelerin, sırasıyla 734, 864 ve 1132 cm^{-1} tepe noktalarının kombinasyonuna karşılık gelen (Renno vd., 2013) oksijen atomlarının Si-O simetrik gerilmesi, Si-O-Si simetrik ve asimetrik gerilme dahil olmak üzere bir silikat ağı sergilediği görülmektedir (Liu vd., 2015). NC nanopartikülleri içeren iskelelere bakıldığında, her 3 numunede de 3332- 3339 cm^{-1} kombinasyonundaki pik intramoleküler hidrojen bağı gerilmesini (O-H) göstermektedir (Lu vd., 2019). Bu spektrumda saf PLGA'nın karakteristik pik noktası 1745 cm^{-1} deki C=O tepe noktasının katkı maddesi ilaveleriyle polimerin saf haline kıyasla daha zayıf bir pik vermesi polimer-katkı maddesi etkileşimini doğrulamaktadır.



Şekil 9.3. PLGA 9 ve PLGA 9/ sBG ve PLGA 9/NC doku iskelelerinin FTIR spektrumu

Şekil 9.4'te PLGA 9 ve PLGA 9/ 20 sBG/15 NC üçlü doku iskelesine ait FTIR spektrumu gösterilmektedir. Spektrum incelendiğinde, 1745 cm^{-1} 'de bulunan PLGA 9'a ait karbonil grubu (C=O), üçlü doku iskelesinde daha zayıf bir pik vermiştir dolayısıyla polimer-katkı maddesi etkileşimi doğrulanmıştır. Üçlü doku iskelesinde sırayla 2956 ve 2937 cm^{-1} pikleri PLGA için karakteristik pikler olan -CH₂ ve -CH₃ gerilmelerini temsil etmektedir (Yu vd., 2017). Ayrıca 3315 cm^{-1} 'deki geniş bant NC varlığını gösteren kuvvetli hidrojen bağına karşılık gelmektedir. 864 ve 1048 cm^{-1} pikleri Si-O-Si asitmetik gerilmelerine karşılık gelip, BG varlığını göstermektedir.



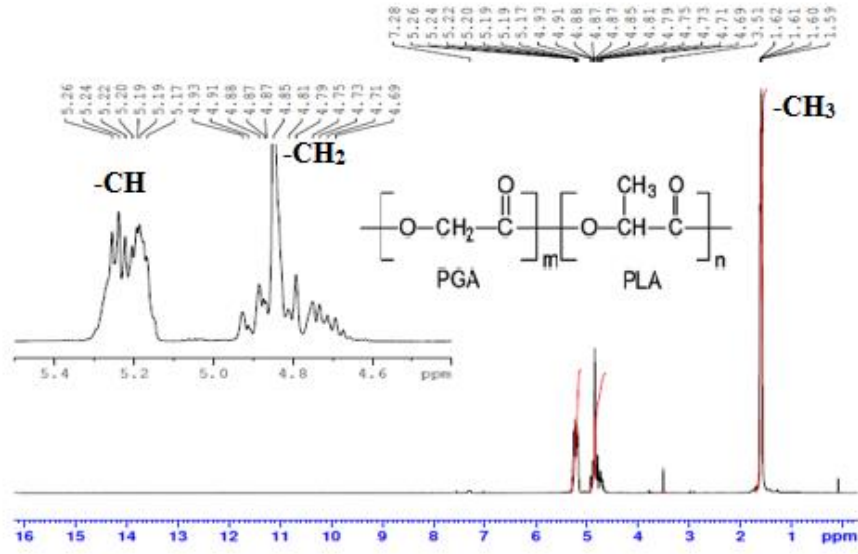
Şekil 9.4. PLGA 9 ve PLGA9/20 sBG/15 NC doku iskelesinin FTIR spektrumu

9.2. ¹H-NMR Spektrometresi Analizi

¹H-NMR spektroskopisi kullanılarak elde edilen spektrumlar, karakteristik fonksiyonel grupları ve PLGA kopolimerlerini oluşturan PLA ve PGA oranlarını belirlemek için kullanılmıştır (Erbetta vd., 2012). Şekil 9.5 ve Şekil 9.6'daki spektrumlar incelendiğinde oluşan pikler literatürle benzerlik göstermektedir (Zhang vd., 2017). Ayrıca Tablo 9.3 ve Tablo 9.4'te sırası ile PLGA 8 için ve PLGA 9 için NMR pik aralıkları verilmiştir.

Spesifik olarak bakıldığında PLGA 8 polimerinde laktatı temsil eden H atomuna ait karakteristik pik grubu 5.17-5.26 ppm bölgesinde bulunmaktadır. Ayrıca 1,60 ppm pik grubu da yine laktata ait hidroksil uç gruplarına bağlanmış metil grupları -CH₃ bulunmaktadır. 4,69-4,93 ppm bölgesinde glikoliti temsil eden -CH₂ grubu bulunmaktadır.

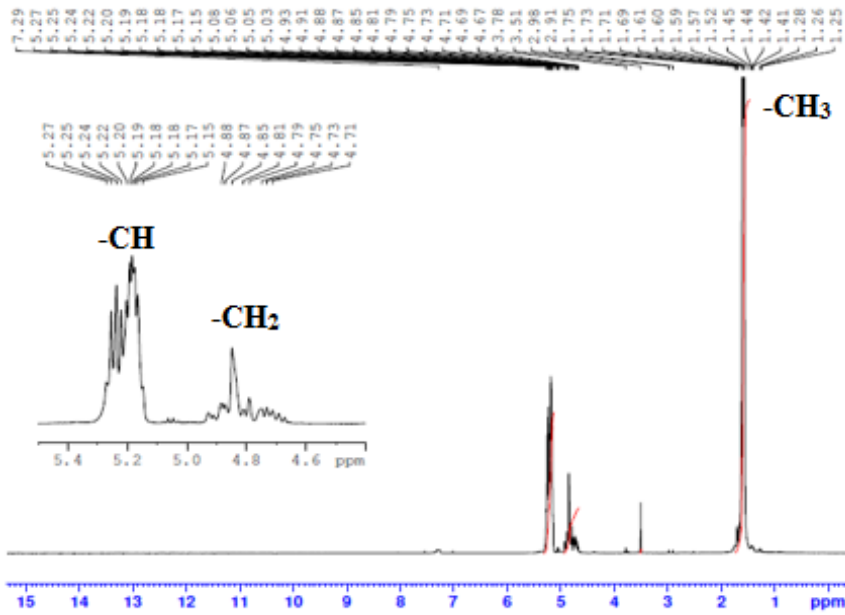
Diğer taraftan PLGA 9 polimerinde laktat dimerini temsilen 5,15-5,27 ppm pik aralığı -CH'ı, 1,25-1,75 ppm pik aralığı -CH₃'ü göstermektedir ve ayrıca glikolit dimerini temsilen 4,71-4,88 ppm pik aralığı da -CH₂'yi göstermektedir. Bu polimerde laktat oranının yüksek olması nedeni ile NMR spektrumundaki laktatı işaret eden pik şiddeti de daha yüksek görünmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen PLGA kopolimerlerinin ¹H-NMR spektrumlarının, literatürle uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır (Kiremitçi-Gümüşderelioğlu ve Deniz, 1999).



Şekil 9.5. PLGA 8'e ait NMR spektrumu

Tablo 9.3. PLGA 8 için fonksiyonel grup ve karşılık gelen pik aralıkları

Fonksiyonel grup	Karşılık gelen pik (ppm)
-CH	5,17-5,26
-CH ₂	4,69-4,93
-CH ₃	1,60



Şekil 9.6. PLGA 9'a ait NMR spektrumu

Kopolimerlerin NMR spektrumlarında monomerlere ait herhangi bir pike rastlanmaması polimerleşmenin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Tablo 9.4. PLGA 8 için fonksiyonel grup ve karşılık gelen pik aralıkları

Fonksiyonel grup	Karşılık gelen pik (ppm)
-CH	5,15-5,27
-CH ₂	4,71-4,88
-CH ₃	1,25-1,75

Laktitin glikolite oranı; NMR spektrumlarındaki laktite ait metil grubu hidrojenlerinin integrali ile sınırlandırılan alanın glikolite ait metilen grubu hidrojenlerinin integrali ile sınırlandırılan alana bölünmesi temel alınarak hesaplanmıştır (Hausberger ve DeLuca, 1995). Bu eşitlikler şu şekildedir:

$$\% \text{ Laktit oranı (L)} = \frac{\text{CH}_3 \text{ integral alanı}/3}{\text{CH}_3 \text{ integral alanı}/3 + \text{CH}_2 \text{ integral alanı}/2} \times 100 \quad (9.1)$$

$$\% \text{ Glikolit oranı (G)} = \frac{\text{CH}_2 \text{ integral alanı}/2}{\text{CH}_3 \text{ integral alanı}/3 + \text{CH}_2 \text{ integral alanı}/2} \times 100 \quad (9.2)$$

PLGA içindeki dimer dağılım oranını belirlemek için yapılan hesaplamaların sonuçları ve teorik değerlerle yapılan karşılaştırmalar Tablo 9.5'te gösterilmektedir. Her iki PLGA için elde edilen sonuçlar, gerçek ve teorik oranlar arasında uyumluluk gözlenmiştir. Ayrıca glikolitin reaktivitesi laktit dimerinin reaktivitesinden daha büyük olduğu için, PLGA kopolimerinde teorik orana kıyasla daha büyük glikolit oranlarına rastlamak yaygındır (Gilging ve Reed, 1979).

Tablo 9.5. PLGA kopolimerlerinin gerçek bileşimi için belirlenen sonuçların teorik değerlerle karşılaştırılması

Teorik L/G (%)	Deneysel L (%)	Deneysel G (%)
80/20	72	28
90/10	86	14

9.3. GPC Analizi

PLGA moleküler ağırlığı dağılımı sentez ve saflaştırma yöntemlerinden etkilenmektedir (Ochi vd., 2021). PLGA8 ve PLGA 9 polimerleri için molekül ağırlığı ve heterojenlik indeksine (polidispersite) ait sonuçlar Tablo 9.6’da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda yüksek molekül ağırlığı elde edilmiş olması polimerizasyon ve koşullarının uygun olduğunu göstermektedir. Molekül ağırlığı daha yüksek olan 90:10 oranındaki PLGA polimeri, daha iyi mekanik özelliklere ve daha yüksek T_g değerine sahip olması beklendiği için polimer sentezi sonrası çalışmanın devamında üretilen kompozit yapılarda bu polimer (PLGA 9) seçilmiştir. Bu varsayımın doğru olduğu çekme testleri sonucunda da görülmüştür. Çekme testi sonuçlarına göre PLGA 9 polimerinin çekme dayanımının daha yüksek olması ve termal analiz sonuçlarına göre T_g değerinin daha yüksek olması bunu doğrulamaktadır. Benzer sonuçlar literatürde de görülmektedir (Betriu ve Semino, 2019; Upson vd., 2016).

PLGA içeriğindeki laktit ve glikolit oranları değiştirilerek farklı uygulamalarda kullanılabilir. Laktit miktarı ne kadar yüksek olursa, bozunma süreci o kadar yavaş olmaktadır (Prajapati, Jani, Kapadia, 2015) Düşük molekül ağırlıklı (~5000-6000 Da) olduğu belirlenen PLGA polimerleri , hızlı bozunmanın avantajlı olduğu kontrollü ilaç salım sistemleri için kullanılırlar ve yüksek molekül ağırlıklı PLGA’dan daha hızlı ilaç salımı sağlarlar (Brauner vd., 2020). Bunun tersi olarak doku iskelesi, doku mühendisliği uygulamalarında, vücutta yapay bir destek sağlayacağı için bozunma sürecinin daha yavaş olması istenmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada PLGA 9 için laktat oranı yüksek tutulmuş ve daha yüksek molekül ağırlığında polimer elde edilmiştir. Yao ve arkadaşları bu çalışmayla benzer şekilde PLGA/BG doku iskelelerini üretmek için farklı markalardan temin ettikleri 3 farklı molekül ağırlığında (25, 50, 100 kDa) PLGA (50:50) kullanmışlardır. Sonuçta yüksek molekül ağırlıklı polimerden elde edilen doku iskelelerinin kemik doku için optimum koşulları sağladığı tespit edilmiştir (Yao vd., 2005).

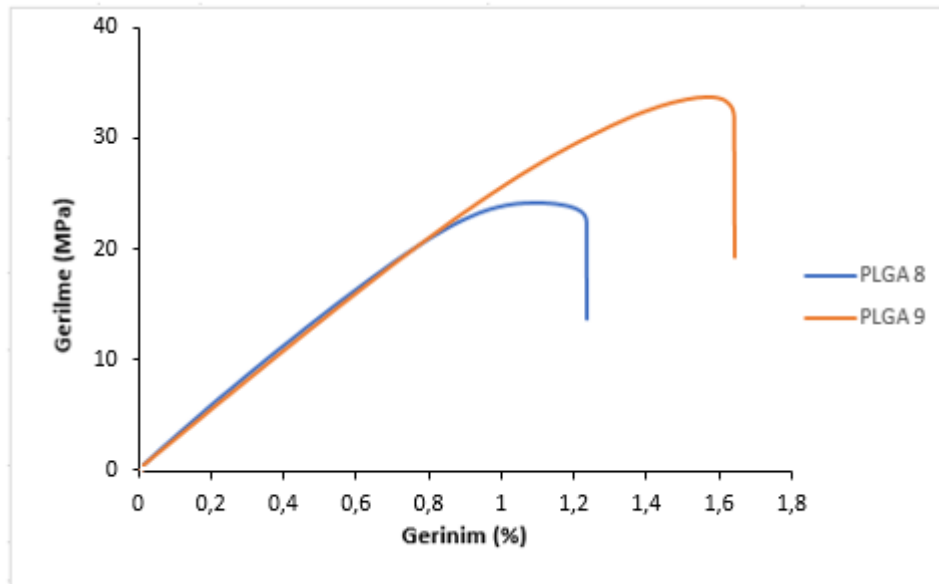
Bu çalışmada da farklı oranda L/D içeren PLGA'lar için yüksek molekül ağırlıkları elde edilmiş, bu durum polimerizasyonun başarılı olduğunu ve polimerin doku iskelesi kullanımı için uygun olduğunu göstermiştir.

Tablo 9.6. PLGA 8 ve PLGA 9 'un molekül ağırlığı ve heterojenlik indeksi sonuçları

	Mw (kDa)	Mn (kDa)	H.I.
PLGA 8	200,14	132,44	1,51
PLGA 9	207,99	142,41	1,46

9.4. Çekme Testi

Çekme testi sonucu elde edilen polimerlere ait Gerilme-Gerinim eğrisi Şekil 9.7'de, çekme dayanımı, kopmada uzama ve Young modül değerleri Tablo 9.7' de verilmiştir. Artan mekanik özelliklerin ve T_g değerlerinin yüksek molekül ağırlığı sonucu olduğu bilinmektedir (Aman vd., 2011). Analiz sonuçları incelendiğinde, PLGA 9 polimerinin çekme özelliklerinin PLGA 8'e göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca literatüre göre (Kapoor vd.,2015) PLA'nın mekanik dayanımı PGA'dan daha yüksek olduğu için ve bu çalışmada da PLGA üretiminde kullanılan laktit içeriğinin fazla olmasından dolayı PLGA 9'da daha yüksek değerler elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmanın ilerleyen aşamalarında doku iskelelerinin oluşturulmasında PLGA 9 kullanılmıştır.



Şekil 9.7. PLGA kopolimerlerine ait Gerilme-Gerinim eğrisi

Tablo 9.7. Çekme testi sonuçları

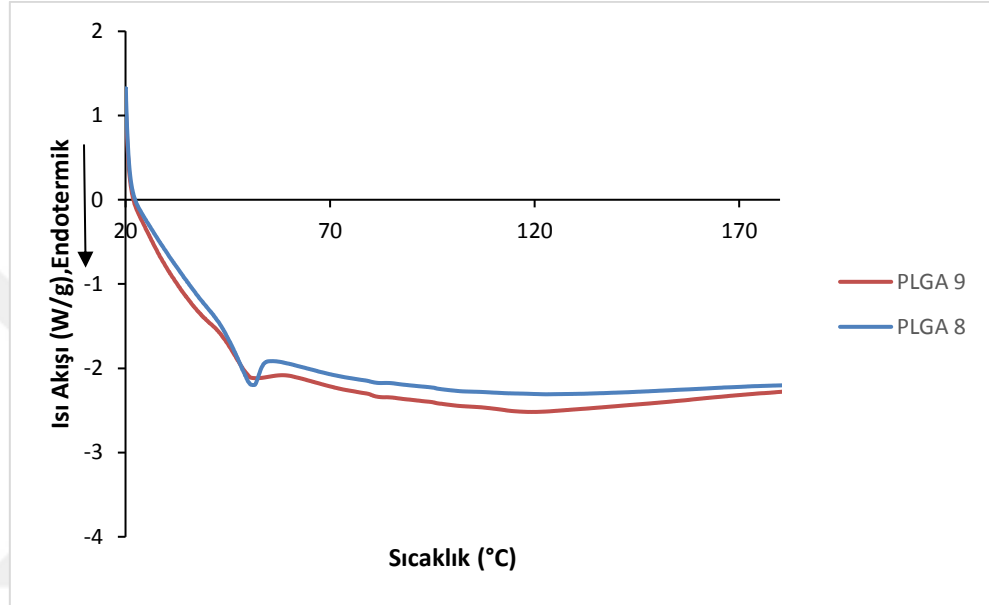
	Çekme Dayanımı (MPa)	Kopmada Uzama (%)	Young Modülü (GPa)
PLGA 8	26,7±2,3	1,2±0,1	3,2±0,2
PLGA 9	37,6±2,3	1,6±0,1	3,2±0,1

9.5. DSC Analizi

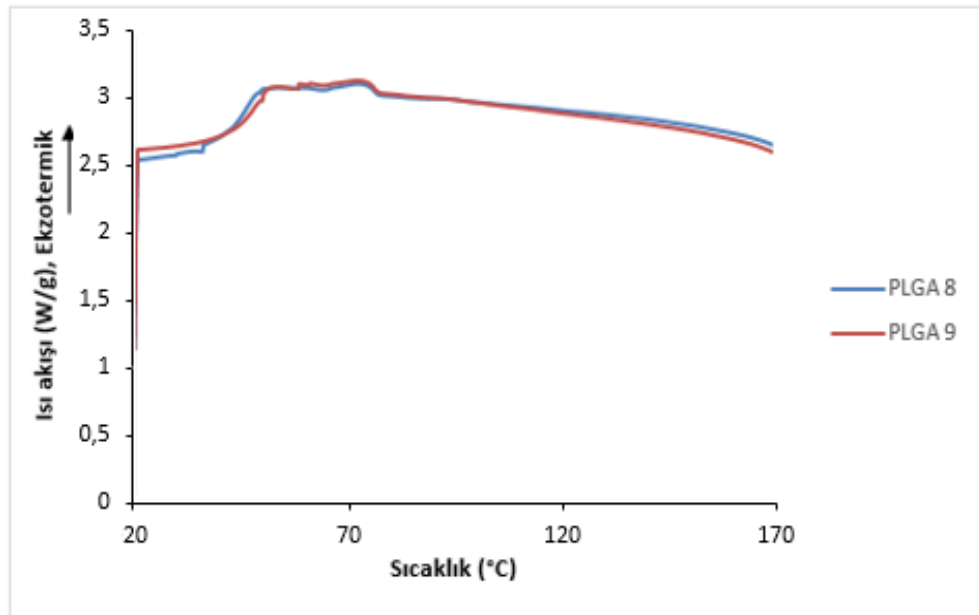
Kopolimerler ve kompozitler, diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) kullanılarak termal geçiş özellikleri belirlemek üzere karakterize edilmiştir. Saf polimer için birinci ısıtma (Şekil 9.8), soğutma (Şekil 9.9) ve ikinci ısıtma (Şekil 9.10) eğrileri çizilmiştir. İkinci ısıtma eğrisine göre, PLGA 8 için T_g sıcaklığı 52 °C, PLGA 9 için 55°C olarak bulunmuştur. Bu değerler literatürde bulunan değerlerle benzerlik göstermektedir. Rueda ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada PLGA 8 için T_g değeri 54 °C ve PLGA 9 için T_g değeri 58 °C olarak bulunmuştur (Rueda vd., 2015 Sentezlenen PLGA kopolimerlerinin T_g değerleri, literatürle uyumlu olarak 37 °C'nin üzerinde çıkmıştır (Gentile vd., 2014). Burada, L'nin G ile rastgele kopolimerizasyonu, L ve G birimlerinin düzenliliğini ve simetrisini değiştirerek amorf bir kopolimer (PLGA) oluşturmuştur (Atkinson ve Vyazovkin, 2012).

Laktik asit içeriği PLGA kopolimer özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. L içeriğindeki artış, burada gözlemlendiği gibi T_g değerlerini iyileştirmiştir. G'nin L zincirlerine dahil edilmesi, L'nin kristalleşmesini kesintiye uğratabilirken, kristalin bölgeler, amorf alanlarda zincir hareketliliğini azaltarak T_g 'yi arttırabilmektedir. Laktik asit içeriğinin PLGA'nın T_g 'si üzerindeki etkisi zincir hareketlilik mekanizması ile açıklanabilir. Laktik asit kısmında bulunan ekstra metil grubu sterik engel nedeniyle polimer zincirinin esnekliğini azaltır ve böylece PLGA'ların T_g 'si artar (Wang vd., 2000). DSC eğrilerinden, camsı geçiş ile ilgili termal geçişleri görmek mümkün olduğu gibi bir erime geçiş fazı olayının olmadığı da görülebilmektedir. İncelenen tüm kopolimerlerin literatürle uyumlu olarak amorf olduğu söylenebilir. % 85'ten az glikolit içeren PLGA'lar amorfudur (Kumar ve Banker, 1993). Amorf yapılar, PLGA'ların hidrolitik bozunmasını kolaylaştırabilir.

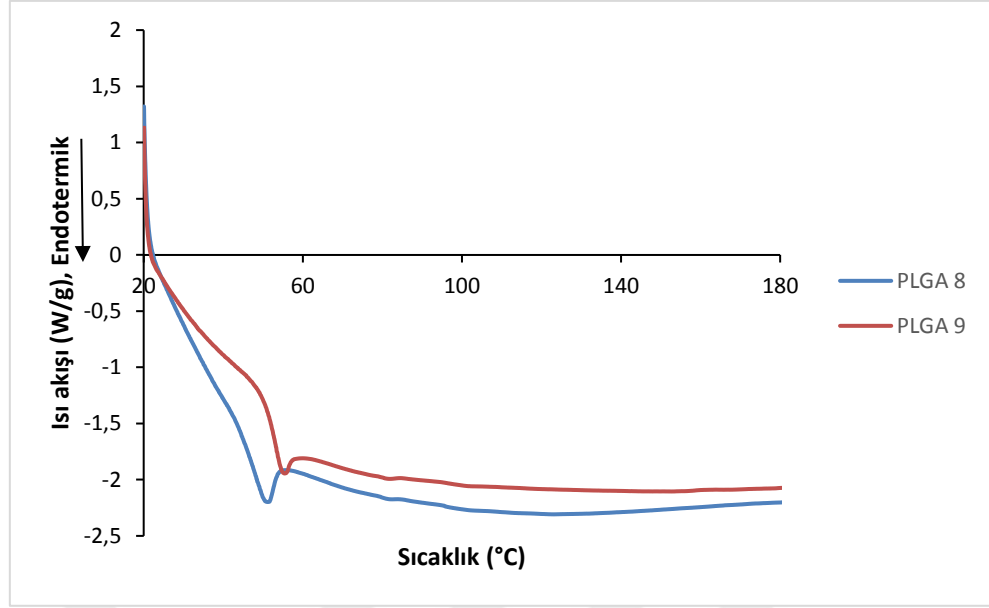
Bu düzensiz yapı, ester hidrolizi için su ve enzim erişimini kolaylaştırarak PLGA'ların doku iskelesi olarak kullanıma uygun olmasını sağlar. PLGA 9'un T_g değerinin az da olsa daha yüksek olması polimer moleküler ağırlığı ile de orantılıdır. Polimer zincir uzunluğundaki artış, polimer zincir dolaşıklığı polimer içi ve polimerler arası zincir etkileşimlerini arttırır. Bu nedenle polimer zincir hareketliliği azalır ve sonuç olarak T_g artar (Wang vd., 2020).



Şekil 9.8. PLGA 8 ve PLGA 9'a ait DSC birinci ısıtma eğrisi



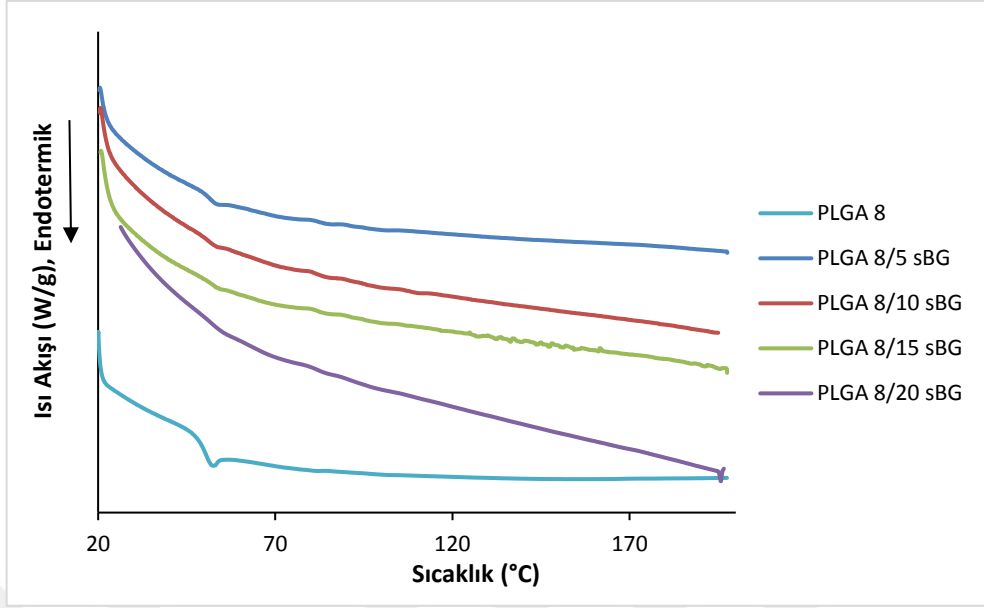
Şekil 9.9. PLGA 8 ve PLGA 9'a ait DSC soğutma eğrisi



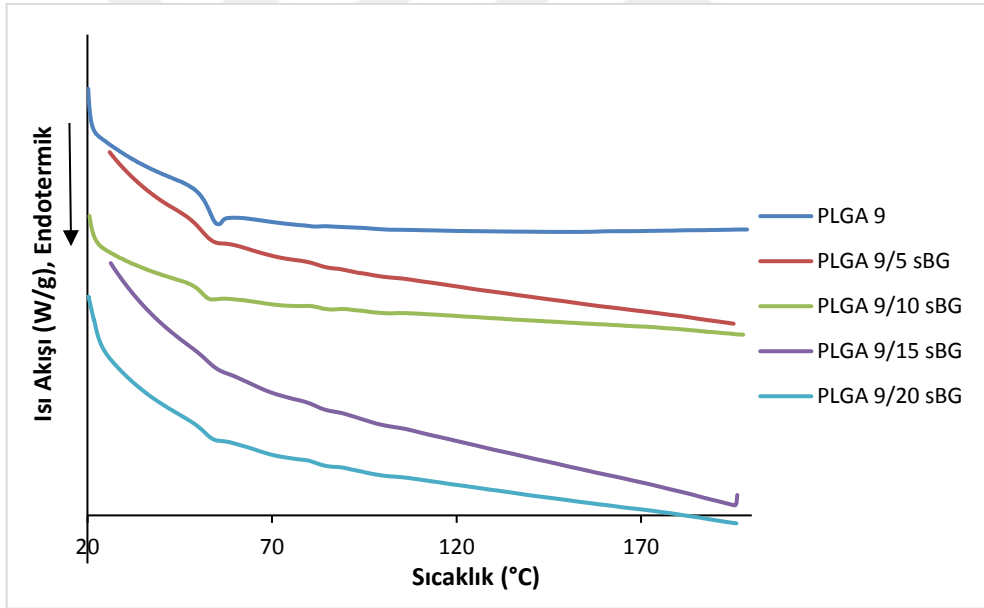
Şekil 9.10. PLGA 8 ve PLGA ' a ait DSC ikinci ısıtma eğrisi

İkili ve üçlü doku iskelelerinin DSC eğrilerine (Şekil 9.11-9.15) ve Tablo 9.8'deki sonuçlara bakıldığında saf polimerlere biyoaktif cam ve nanoselüloz eklenmesinin T_g değerlerinde önemli bir değişime neden olmadığı görülmektedir. Aynı şekilde, Ambone ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada polimer içine ilave edilen nanoselülozun T_g değerinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı belirtilmiştir (Ambone ve Shanmuganathan, 2020). Khoo ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada da nanoselüloz ilavesi T_g değerini değiştirmemiştir (Khoo, Ismail ve Chow, 2016).

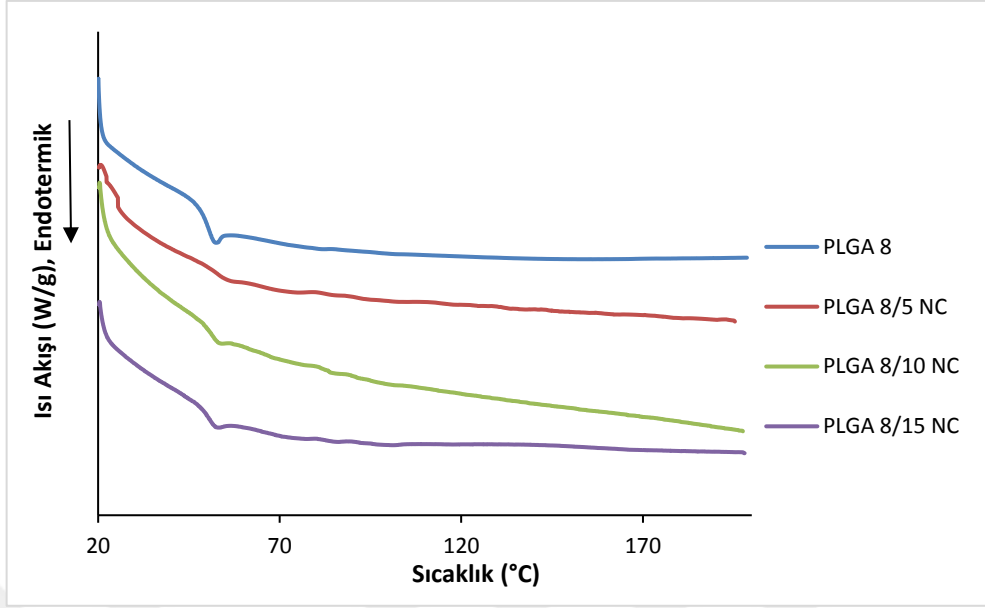
Deney sonuçlarına göre biyoaktif cam ve nanoselüloz ilavelerinin T_g değerini değiştirmemiş olması, doku iskelesi uygulamalarında, vücut sıcaklığı 37 °C'de bu kompozit yapıların kullanımını uygun kılmaktadır.



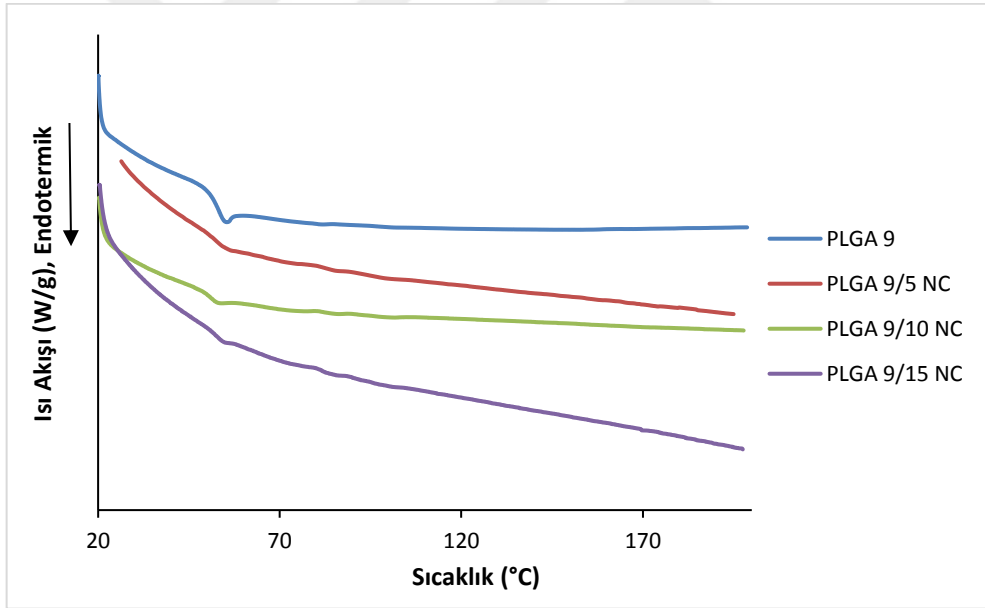
Şekil 9.11. PLGA 8 ve PLGA 8/sBG doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi



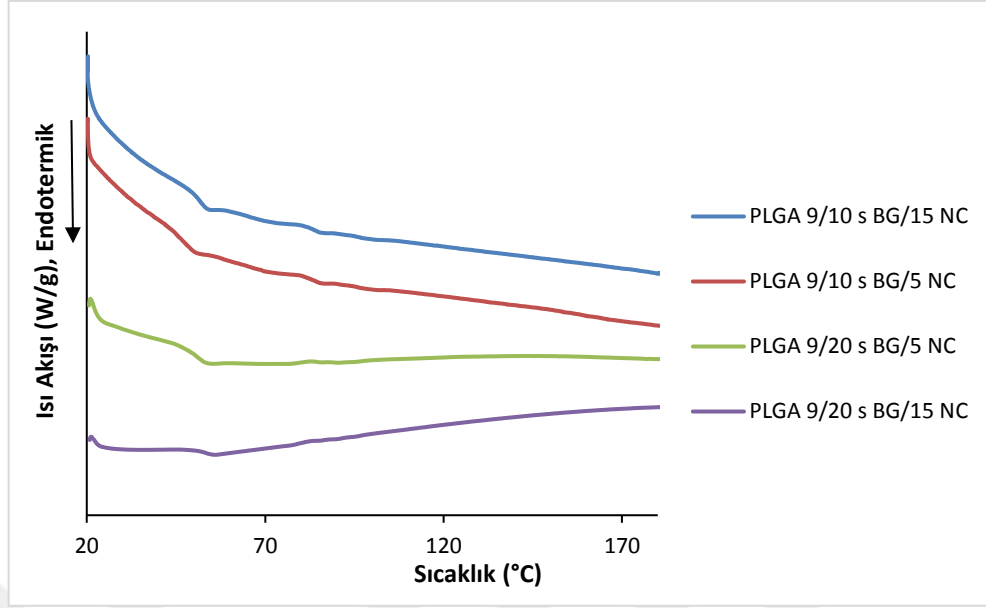
Şekil 9.12. PLGA 9 ve PLGA 9/sBG doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi



Şekil 9.13. PLGA 8 ve PLGA 8/NC doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi



Şekil 9.14. PLGA 9 ve PLGA 9/NC doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi



Şekil 9.15. PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin DSC ikinci ısıtma eğrisi

Tablo 9.8. İkili ve üçlü doku iskeleleri için T_g değerleri

	T_g (°C)
PLGA 8	52
PLGA 9	55
PLGA8/5 sBG	53
PLGA8/10 sBG	53
PLGA8/15 sBG	53
PLGA8/20 sBG	53
PLGA9/5 sBG	55
PLGA9/10 sBG	54
PLGA9/15 sBG	55
PLGA9/20 sBG	55
PLGA8/5 NC	52
PLGA8/10 NC	53
PLGA8/15 NC	52
PLGA9/5 NC	55
PLGA9/10 NC	54
PLGA9/15 NC	55

Tablo 9.8. (Devam) İkili ve üçlü doku iskeleleri için T_g değerleri

PLGA9/10 s BG/ 15 NC	53
PLGA9/10 s BG/ 5 NC	51
PLGA9/20 s BG/ 5 NC	53
PLGA9/20 s BG/ 15 NC	55

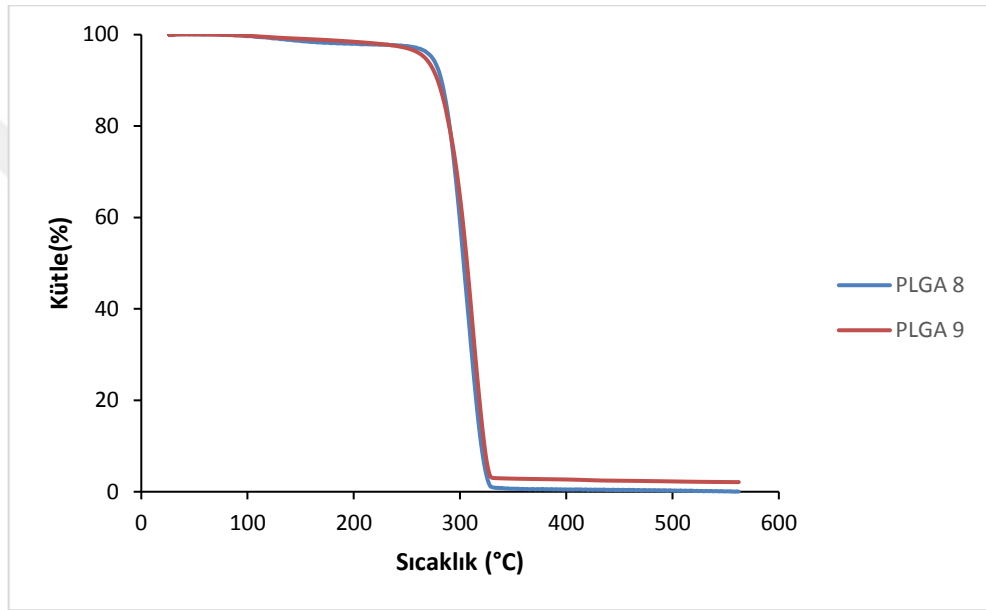
9.6. TGA Analizi

Polimer ve kompozitlerin termal bozunma özellikleri, termal gravimetrik analiz yöntemi kullanılarak karakterize edilmiştir. Saf polimer için yapılan TGA analiz sonucuna göre, PLGA 8 için bozunmaya başlama sıcaklığı 256 °C, PLGA 9 için 244 °C olarak bulunmuştur (Şekil 9.16). Polimere eklenen biyoaktif cam ve nanoselüloz ile elde edilen doku iskelelerine ait termogramlar Şekil 9.18-9.23 aralığında, sonuçları ise Tablo 9.9'da gösterilmiştir. PLGA kopolimerleri, 240 °C'ye kadar termal olarak kararlılık göstermiş ve artan glikolit içeriği ile termal bozunmaya karşı artan direnç göstermişlerdir.

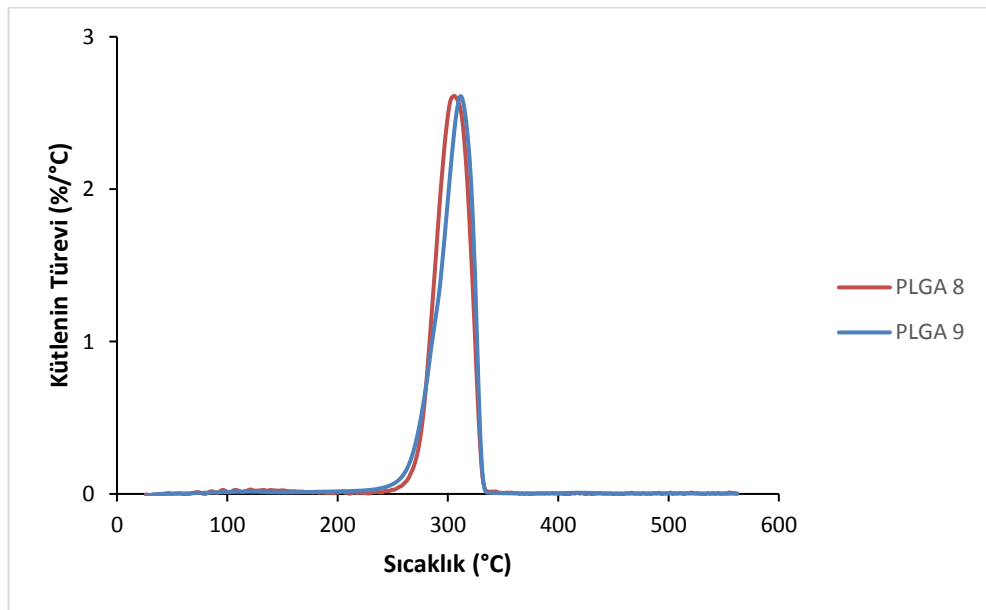
Daha yüksek molekül ağırlığına ve daha düşük heterojenlik indeksine (H.I.) sahip polimerler, daha yüksek termal kararlılık göstermektedir (Gilding ve Reed, 1979). Tablo 9.6'da verilen GPC sonuçlarında da görüldüğü gibi PLGA 9'un molekül ağırlığı PLGA 8'den daha yüksek olup, H.I. değeri daha düşüktür. Ancak PLGA 8 içeriğindeki glikolit oranının daha yüksek olması (Tablo 9.6) PLGA 8'in daha geç bozunmasına sebep olmuştur. Bu beklenmeyen bir durum değildir çünkü glikolit düzenli moleküler yapıya sahip olması nedeniyle düzensiz akışkan faza dönüşmek ve sonuç olarak ayrışmak için daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duymaktadır (Putten ve Gruter, 2020). Alifatik bir poliester olan PLGA'nın termal bozunması polimer zincirindeki ester gruplarının hidrolizi ile ilişkilidir. Karboksilik uç gruplar bozunma sürecinde otokatalitik etki göstererek kütle kaybını büyük ölçüde hızlandırmaktadır (Piemonte ve Gironi, 2013).

Kopolimerde 200 °C'ye kadar suyun buharlaşması nedeniyle ağırlık kaybı yaşanmıştır. PLGA 8 256-337 °C sıcaklıkları arasında %100; PLGA 9 ise 244-329 °C sıcaklıkları arasında % 99 oranında kütle kaybına uğramıştır. Silva ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, PLGA için 170 °C ile 370 °C arasında tek adımlık bir ağırlık kaybı gözlenmiştir. PLGA'nın bozunma ürünleri, PLA ve PGA polimerlerinininkine benzer. Bu tür polyesterlerin, bozunmanın başlangıcında rastgele bir zincir ayrışması ve sonunda ise daha spesifik bir zincir ayrışması içeren bir bozunma mekanizması sergilediği deneysel olarak bulunmuştur.

Düşük sıcaklıklarda, saf PGA ve PLA için temel bozunma mekanizması, radikal olmayan, OH zincir uçlarını içeren bir ester değişim reaksiyonunu içerir. Bu reaksiyon, zincirlerdeki karboksil gruplarının dekarboksilasyonu yoluyla monomer, asetaldehit (PLA için), metil glikolat (PGA için) ve karbondioksit ile halkalı oligomerlerin oluşmasına yol açar. Sıcaklık yükseldikçe, zincir ayrışma mekanizmasının sonucu olarak karbon monoksit, metilketen (PLA için), keten ve formaldehit (PGA için) salınımı ortaya çıkar. (Silva vd., 2015).

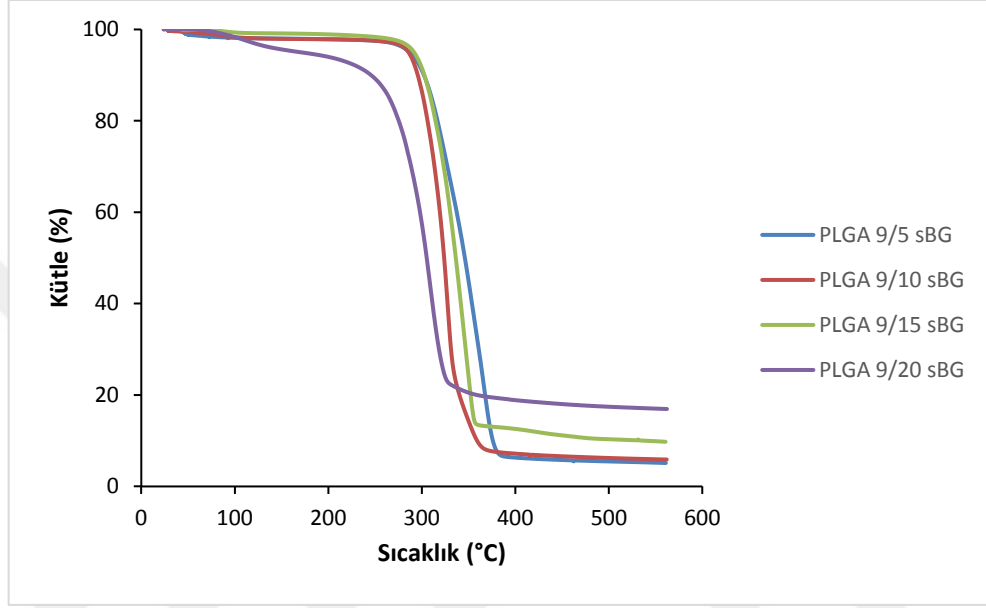


Şekil 9.16. PLGA 8 ve PLGA 9'a ait TGA termogramı

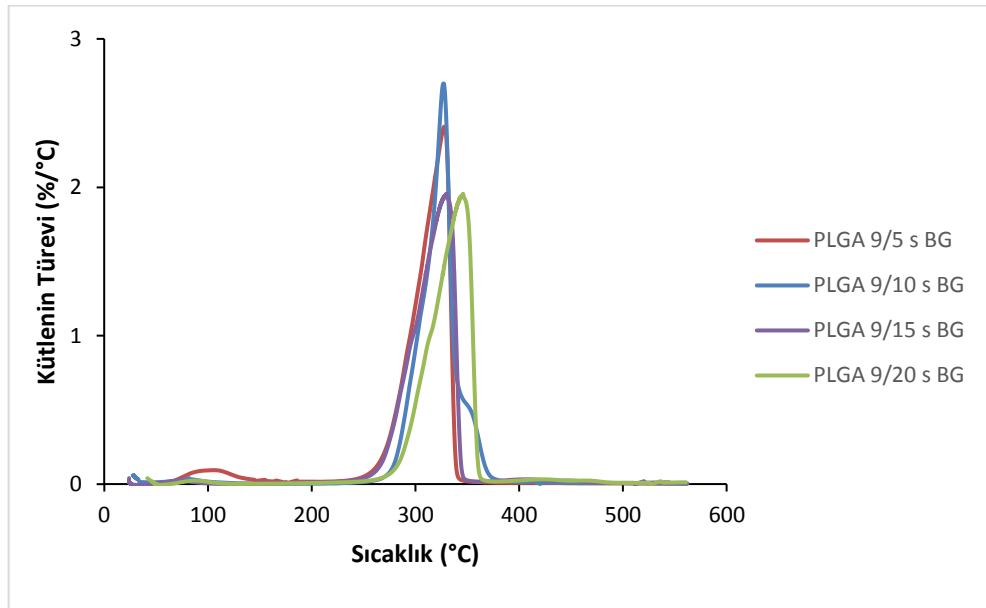


Şekil 9.17. PLGA 8 ve PLGA 9'a ait DTA termogramı

PLGA yapısına sBG eklenmesi ile genel olarak kompozitlerin T_{onset} ve T_{max} değerlerinde artış görülmüştür. Bozunma kompozit yüzeyindeki suyun uzaklaşmasıyla başlamıştır. Biyoaktif cama uygulanan modifikasyon, s-BG ile polimer yapısındaki C=O grupları arasında oluşan fiziksel bağlar sonucunda bozunma reaksiyonunu engelleyerek termal kararlılığı sağlamıştır (Larranaga vd., 2013).



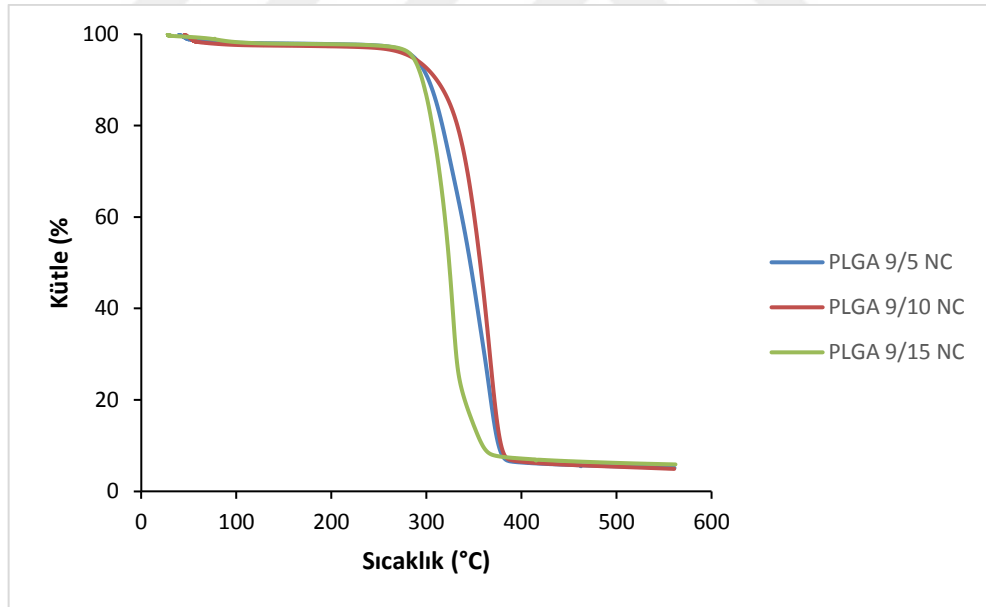
Şekil 9.18. PLGA 9/sBG numunelerinin TGA termogramı



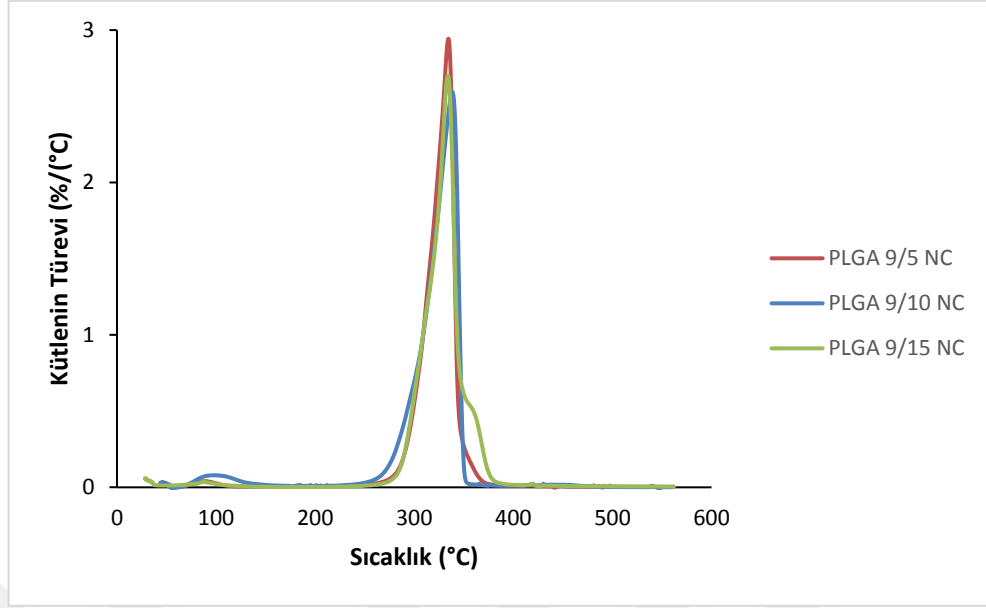
Şekil 9.19. PLGA 9/s BG doku iskelelerine ait DTA termogramı

PLGA'ya nanoselüloz eklenmesiyle her iki orandaki polimer içinde bozunmaya başlama sıcaklıklarında artış görülmüştür. Ancak yine yapıdaki glikolit oranının yüksek olması sebebiyle 80:20 PLGA'da bozunma sıcaklıklarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

NC'nin TGA bozunma eğrisini üç bölgeye ayırabiliriz. Birinci bölgedeki ilk kütle kaybı 25 °C'den yaklaşık 213 °C'ye kadar devam eder ve bunun başlıca nedeni selülozik numunelerden suyun buharlaşmasıdır. Büyük kütle kaybını kapsayan ikinci aşama ise 213 °C'de başlar ve yaklaşık 395 °C'ye kadar devam eder. Bu bölgede depolimerizasyon, dehidrasyon ve glikosil birimlerinin ayrışması nedeniyle kütle kaybı gözlenir. Uçucular ve ardından char oluşumu beklenir. Bölge II'den sonra selülozik numunelerin kütle kaybı oranı azalmıştır. Bu noktadan başlayarak 600 °C'lik son test sıcaklığına kadar olan TGA eğrisi, bölge III olarak tanımlanmıştır. Son bozunma oluşan charın oksidasyonunun ve daha düşük moleküler ağırlıklı gaz ürünlere parçalanmasının sonucudur (Celebi ve Kurt, 2015).

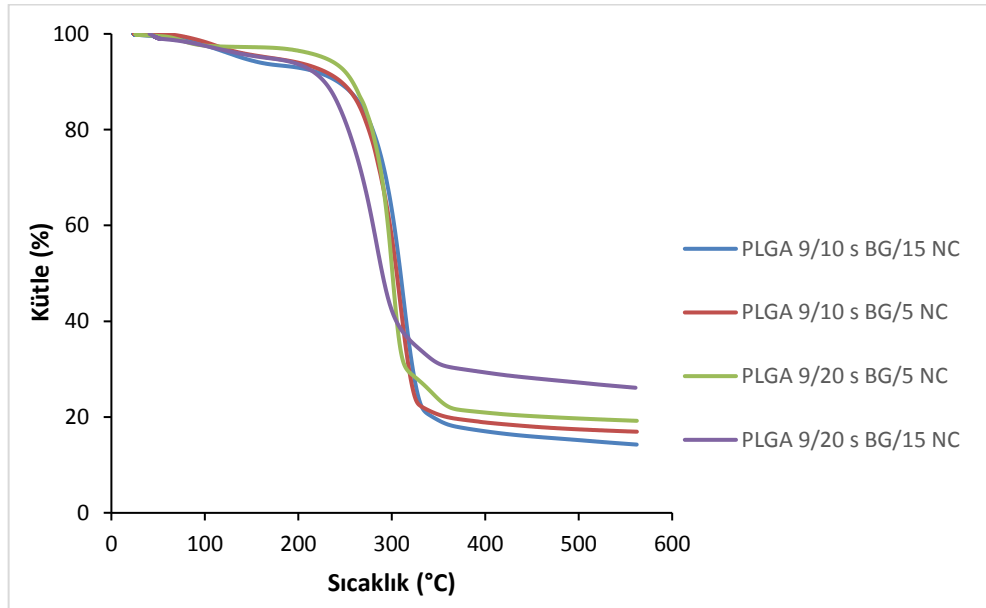


Şekil 9.20. PLGA 9/NC numunelerinin TGA termogramları

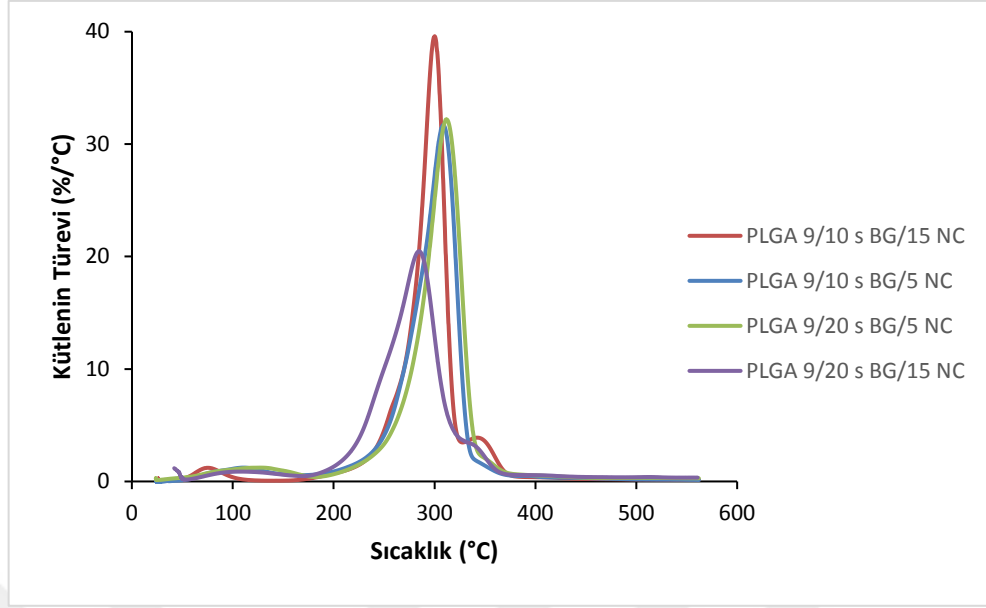


Şekil 9.21. PLGA 9/NC doku iskelelerine ait DTA termogramı

Üçlü doku iskelelerinin TGA ve DTA termogramlarına bakıldığında, ikili doku iskelelerinin T_{onset} ve T_{max} değerlerinde görülen artışın olmadığı, aksine bu değerlerde bir düşme meydana geldiği görülmüştür. Bunun nedeni olarak üretim esnasında katkı malzemelerinin sırayla ultrasonik işleme sokulması ve bu sırada sBG'nin fonksiyonel gruplarının NC tarafından kapatılması dolayısıyla da polimer ile etkileşimin azalması, bu durumda temel stabiliteyi olumsuz yönde etkilediği söylenebilir.



Şekil 9.22. PLGA 9/s BG/NC numunelerinin TGA termogramları



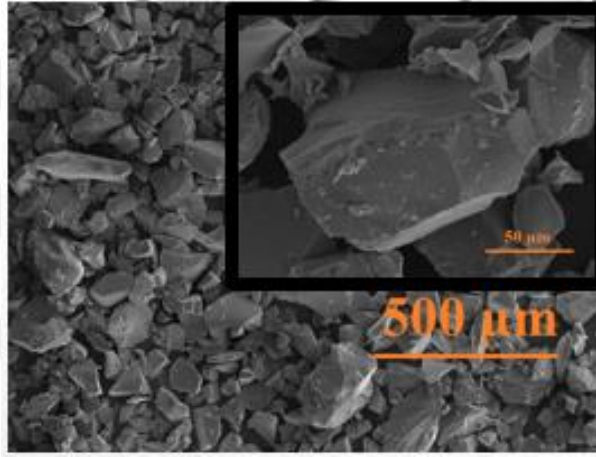
Şekil 9.23. PLGA 9/s BG/NC numunelerinin DTA termogramları

Tablo 9.9. Doku iskelelerinin T_{onset} ve T_{max} değerleri

	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)
PLGA 8	256	310
PLGA 9	244	312
PLGA 9/5 sBG	250	329
PLGA 9/10 sBG	251	327
PLGA 9/15 sBG	253	340
PLGA 9/20 sBG	260	345
PLGA 9/5 NC	250	335
PLGA 9/10 NC	251	336
PLGA 9/15 NC	254	335
PLGA 9/10 s BG/15 NC	223	301
PLGA 9/10 s BG/5 NC	225	316
PLGA 9/20 s BG/5 NC	220	312
PLGA 9/20 s BG/15 NC	206	288

9.7. SEM Analizi

Mekanik özelliklerin iyileştirilmesi, BG'lerin yüzeyinde küresel HCA tabakasının oluşumunu teşvik etmek, kollajen salınımının kinetiğini ve yüzey pürüzlülüğünü arttırmak için biyoaktif cam yüzeyine modifikasyon işlemi yapılmıştır (Boccaccini, 2018). Bu işlem için özellikle APTES tercih edilmesinin nedeni, yapısında bulunan $-NH_2$ gruplarının, diğer fonksiyonel gruplara kıyasla daha çok protein adsorbsiyonuna sahip olmasıdır ve bu da hücre çalışmalarında etkili rol oynamaktadır. APTES'in eklenmesi ile BG partiküllerinin silanol grubu ile kovalent olarak bağlanması ve stabilize olması beklenir. Şekil 9.24'te silanlı biyoaktif cama ait farklı büyütme ölçeklerindeki SEM mikrografı verilmiştir.

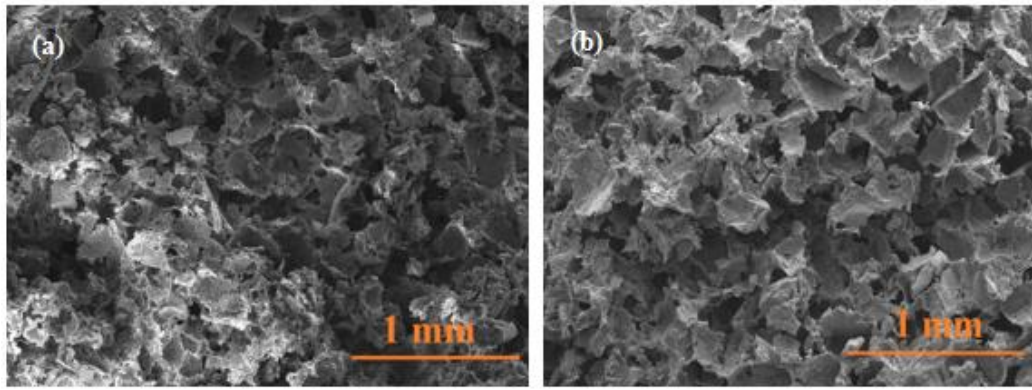


Şekil 9.24. s-Biyoaktif cama ait SEM mikrografı (200X ve 1000X)

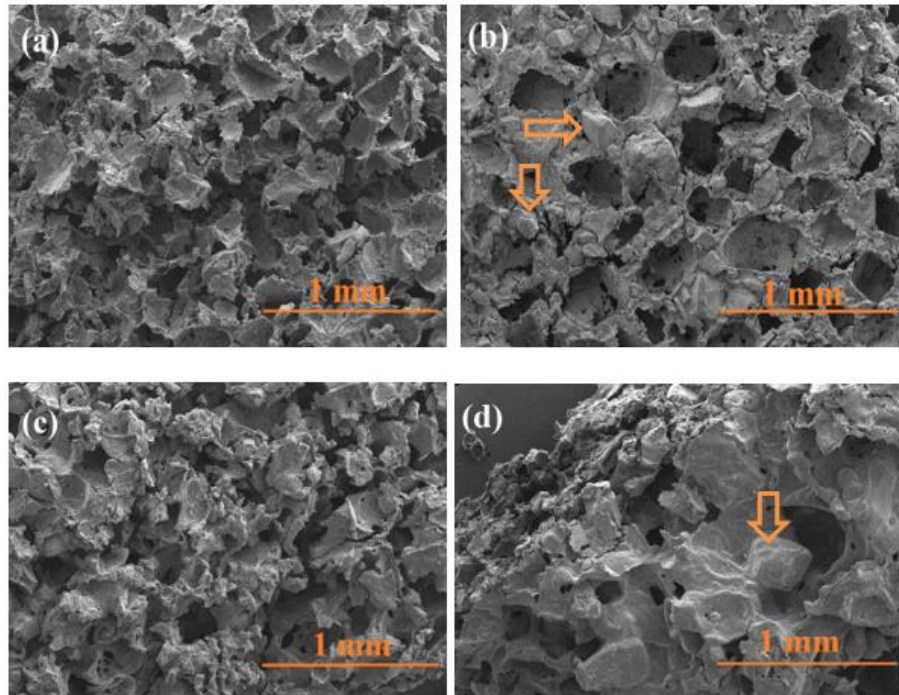
Şekil 9.25a'da PLGA 8 ve Şekil 9.25b'de PLGA 9; Şekil 9.26 ve 9.27'de farklı oranlarda sBG içeren doku iskelelerinin SEM mikrografları verilmiştir. Çözücü döküm/partikül uzaklaştırma yöntemiyle üretilen doku iskelelerinde yüksek gözenekli yapılar elde edilmiştir. Doku iskelesinin SEM mikrografları, iskele yüzeyinde pürüzlülük göstermiştir. Ayrıca biyoaktif cam parçacıkları da belirgindir. Cam parçacıklarının kümelenmemesi ve birbiri üzerine binmemesi BG modifikasyonunun iyi dağıldığını göstermektedir (Li ve Zu, 2003).

Bir neşter ile enine yapılan kesit, polimer BG yapısındaki ara yüzey bağlantılarını doğrulamıştır. Burada porojen olarak tuz kullanımı tercih edilmiştir (polimer:porojen oranı=1:9). Genel olarak araştırmalar, tuz miktarının artırılmasının ardından karıştırma süresinin uzatılmasının hem gözenekliliği hem de yüzey pürüzlülüğünü artırdığını göstermektedir (Kim vd.,2017).

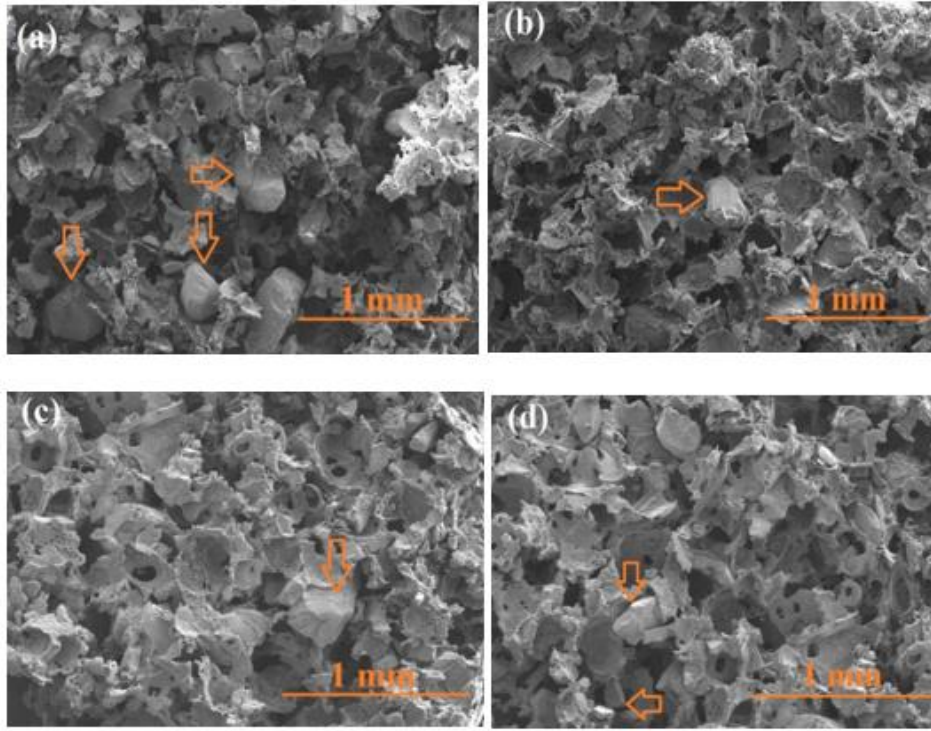
Tuz oranı, PLGA polimerlerinin çapraz bağlanmasında da büyük öneme sahiptir. PLGA'nın su bazlı yapısından kaynaklı, sodyum klorürle çapraz bağ oluşturması doku iskelelerinin gözenekliliğini etkilemektedir (Dorati vd., 2010). Bununla birlikte iskelelerin ortalama gözenek boyutunun, eklenen sBG'nin oranının artırılmasıyla azaldığı görülmektedir. Burada PLGA zincirlerine tutunan sBG'nin iskele duvarında kalınlaşmaya ve dolayısıyla gözenekleri kapatmaya yol açtığı söylenebilir. Benzer bir çalışmada da BG içeriği arttıkça PLGA/BG doku iskelelerinin gözenekliliğinin azaldığı görülmüştür (Gögele vd., 2022).



Şekil 9.25. PLGA 8 (a) ve PLGA 9 doku iskeleleri (b) SEM mikrografları (100X)

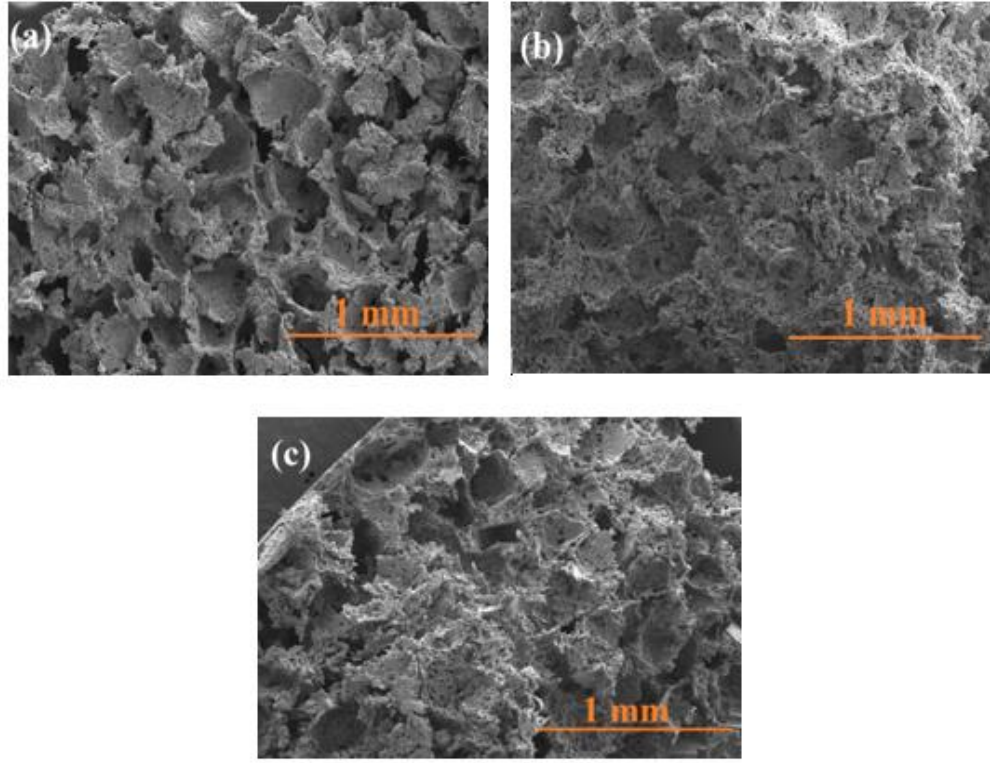


Şekil 9.26. PLGA 8/sBG SEM mikrografları (100X) (a) %5 sBG katkılı (b) %10 sBG katkılı (c) %15 sBG katkılı (d) %20 sBG katkılı

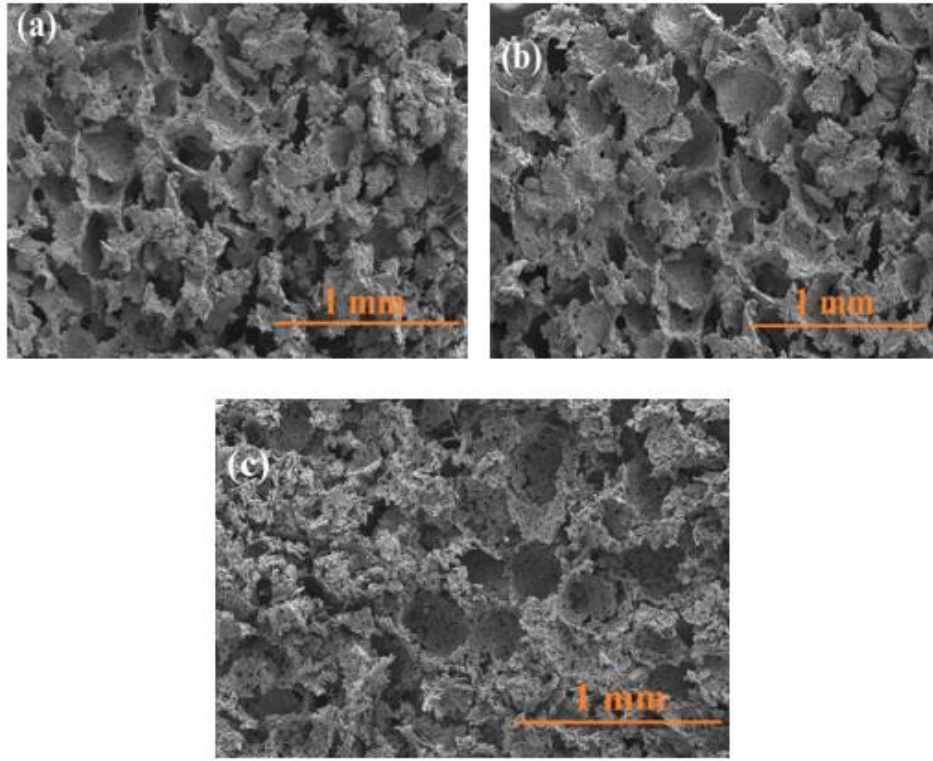


Şekil 9.27. PLGA 9/sBG SEM mikrografları (100X) (a) %5 sBG katkılı (b) %10 sBG katkılı (c) %15 sBG katkılı (d) %20 sBG katkılı

Farklı oranlarda NC içeren doku iskelelerinin Şekil 9.28’de PLGA 8/NC ve Şekil 9.29’da PLGA 9/NC SEM mikrografları verilmiştir. Çalışmada, doku iskelesi üretimi esnasında da nanoselülozün PLGA matrisi içinde dağılımının homojen bir şekilde sağlanmasına dikkat edilmiştir. Bunun için çözücü içerisinde eklenen nanoselüloz partikülleri tam bir homojenizasyon sağlanana dek ultrasonikasyon cihazında karıştırılmıştır. Ancak aglomerasyon tam olarak engellenememiştir. Burada PLGA’nın içeriğindeki yoğun laktit yüzdesinden dolayı hidrofobik olması nedeni ile çözücü içinde iyi dağılamayan nanoselüloz partikülleri aglomerasyona sebep olmaktadır (Raquez vd., 2013). NC partiküllerinin büyük ölçüde porları kapattığı ve poroziteyi düşürdüğü gözlenmiştir. SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar, NC’nin doku iskelelerindeki porları kapatması numunelere yapılan por çap dağılımı ve porozite hesaplamaları ile de doğrulanmaktadır.

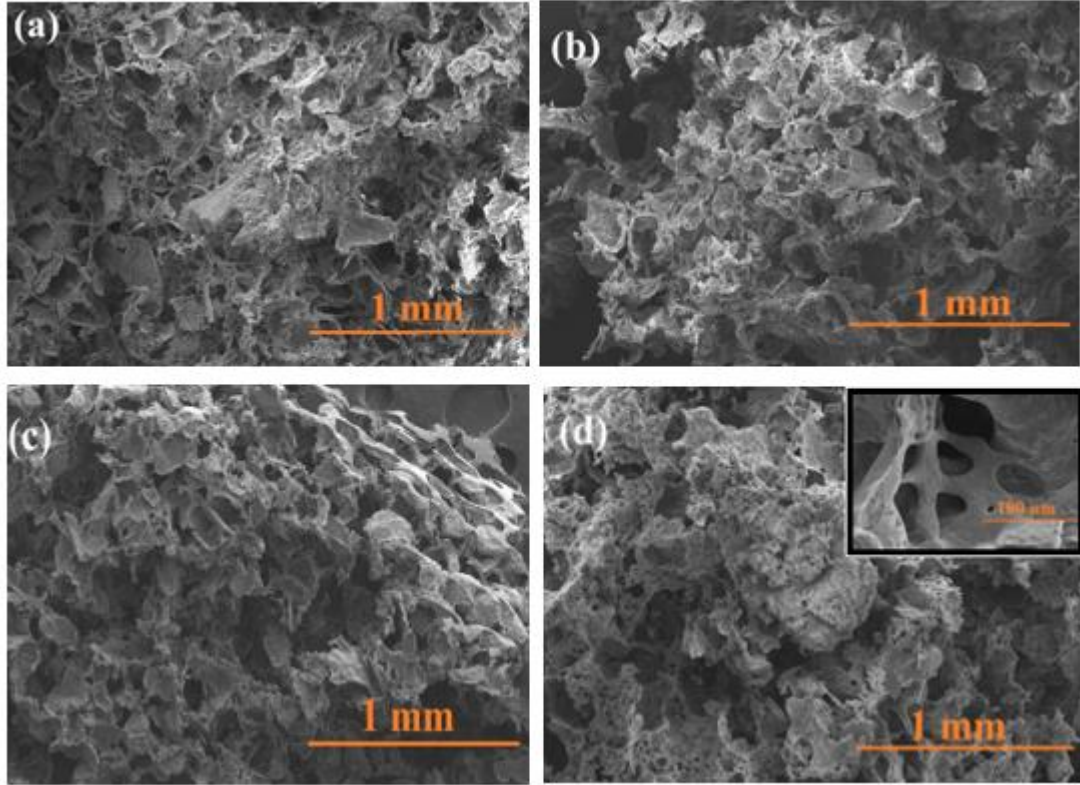


Şekil 9.28. *PLGA 8/NC SEM mikrografları (50X) (a) %5 NC katkı (b) %10 NC katkı (c) %15 NC katkı*



Şekil 9.29. *PLGA 9/NC SEM mikrografları (50X) (a) %5 NC katkı (b) %10 NC katkı (c) %15 NC katkı*

Şekil 9.30'da PLGA 9/sBG/NC üçlü doku iskelelerinin SEM mikrografları verilmiştir. PLGA 9/sBG/NC üçlü doku iskelelerinin SEM mikrograflarına bakıldığında ikili numunelerde açıkça görülen biyoaktif cam parçacıklarının net ayırt edilemediği tespit edilmiştir. Biyoaktif camın PLGA matrisinde gömülü olup, nanoselülozun daha küçük tane boyutuna sahip olması ve üretim esnasında aglomerasyona sebep olmasından dolayı kompozit yapıda hem gözenekleri kapattığı hem de biyoaktif cam yüzeyini kapladığı düşünülmektedir.



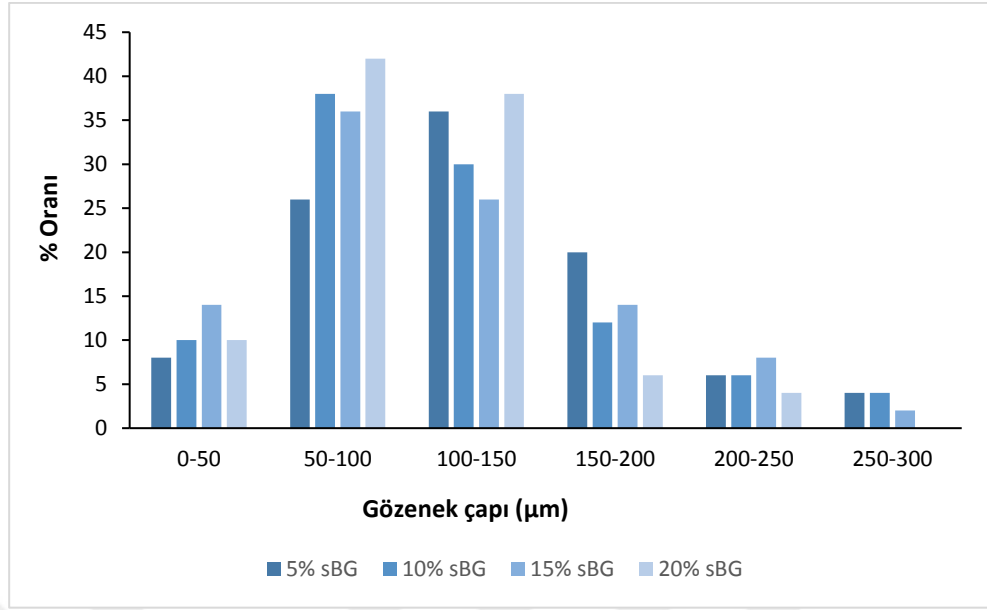
Şekil 9.30. Üçlü doku iskeleleri SEM mikrografları (50X) (a) PLGA 9/10 sBG/15 NC (b) PLGA 9/10 sBG/5 NC (c) PLGA 9/ 20 sBG/5 NC (d) PLGA 9/ 20 sBG/ 15 NC(50X ve 500X)

SEM görüntüleri elde edildikten sonra Image J programı kullanılarak her bir numunenin por çap dağılımları belirlenmiştir. Makro gözenekler hücre göçünü teşvik ettiğinden ve mikro gözenekler protein adsorpsiyonu ile hücre yapışmasını desteklediğinden, iskele gözenekliliği kemik dokusu mühendisliğinde önemli bir rol oynamaktadır (Jeyachandran vd., 2022).

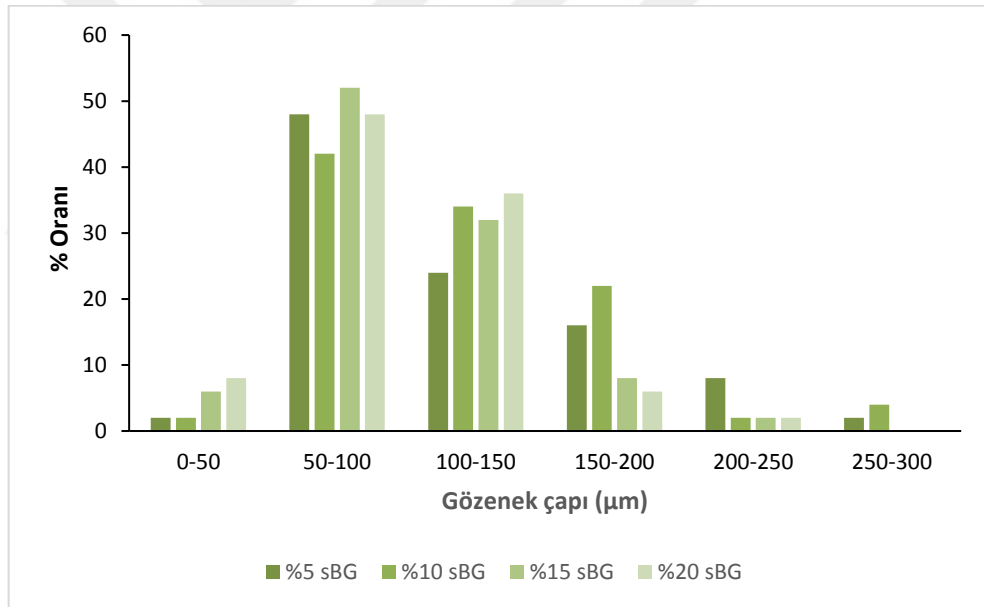
PLGA /sBG doku iskelelerinin % çap dağılım histogramları ekil 9.31 ve ekil 9.32’de; PLGA/NC doku iskelelerinin % çap dağılım histogramları ekil 9.33 ve ekil 9.34’te; PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin çap dağılım histogramı ekil 9.35’te gösterilmiştir. Histogramlara bakıldığında, PLGA 8/sBG için, 50-150  m arasındaki gözenek dağılımının daha yoğun olduğu görülmektedir.

200-300  m arasındaki makrogözenek oranı daha düşük çıkmıştır. PLGA 9/sBG için bakıldığında, yoğunlaşmanın benzer şekilde 50-150  m arasında olduğu görülmektedir. Ancak makropor oranında PLGA 8’e kıyasla düşüş gözlenmiştir. Bunun sebebi PLGA 8/sBG numunelerinin daha yüksek oranda glikolit içermesi, glikolitin hidrofilik yapıda olması ve liçing sırasında suda çözünüp daha büyük gözenekler oluşturması olabilir. İlave edilen sBG oranının artmasıyla sBG’nin yoğun bir şekilde PLGA zincirlerine tutunup iskele duvarını kalınlaştırarak gözenek çapının azalmasına neden olduğu söylenebilir (Laschke vd., 2006; Wu vd., 2013).

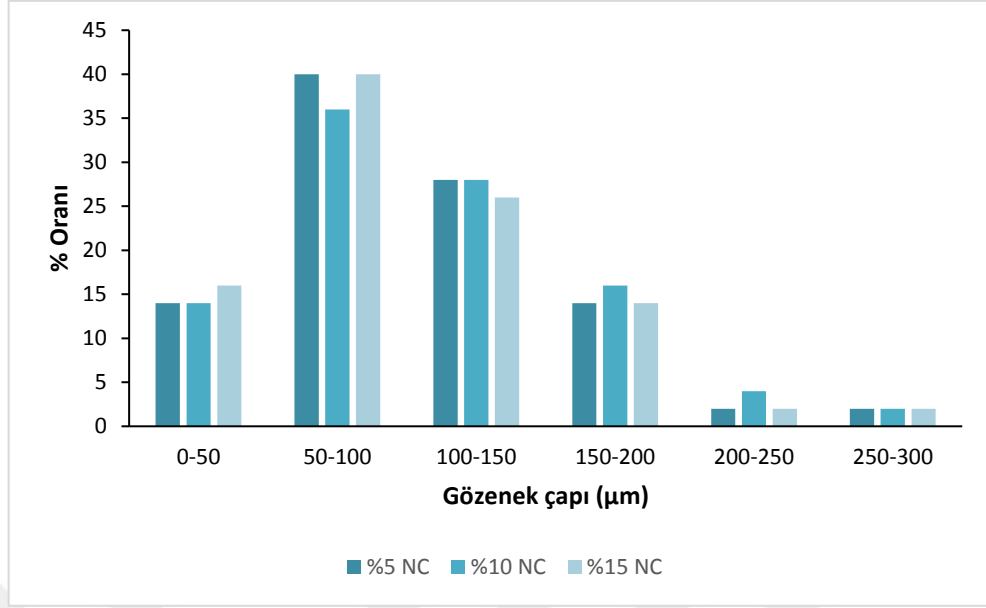
NC katkılı numunelerde de benzer sonuçlar gözükmektedir. ap dağılımı 50-100  m arasında daha yoğundur. Özellikle PLGA 9/NC numunelerinde mikropor yüzdesinin daha arttığı, makropor yüzdesinin oldukça düşüğü görülmektedir. Nanosel lozunda hidrofilik yapıya sahip olması sebebiyle makropor oranının daha yüksek çıkması beklenirken, üretim esnasında homojen bir dağılım gösterememesi daha çok mikropor oluşmasına sebep olmuştur. PLGA 9/ sBG/NC  l  doku iskelelerinin histogram sonuçlarına bakıldığında NC oranı yüksek olan numunelerde 200   ve üzeri por çapı oldukça düşük çıkmıştır. Ancak hem ikili hem de  l  numunelerde yüksek oranlarda makropor elde edilemese de sonuçlar bir doku iskelesi üretimi için yeterlidir. Gözeneklerin çok küçük olması, hücre etkileşimi, g  ve metabolizmasını sınırlandıracak ve doku iskelelerine bağlı hücrelerin ölümüne neden olacaktır. Diğer taraftan, gözenekler çok büyükse, hücre bağlanması için mevcut yüzey alanının azalmasına neden olacaktır bu da artan boşluk hacmi nedeniyle iskelenin mekanik gücünü yok edecektir (Nam vd., 2020). Ayrıca doğal kemik hücreleri olan osteoblastların gözenek çapı 10 ila 50   arasındadır. Ancak doku iskelesinin implantasyonu sonrası mineralize kemiği yenilemek için daha büyük gözenek çaplarına (100 ila 200  ) gereksinim duyulmaktadır (Abbasi, vd., 2020). Dolayısıyla üretilen doku iskelelerinin gözenek çaplarının bu uygulama için yeterli seviyede olduğu görülmektedir.



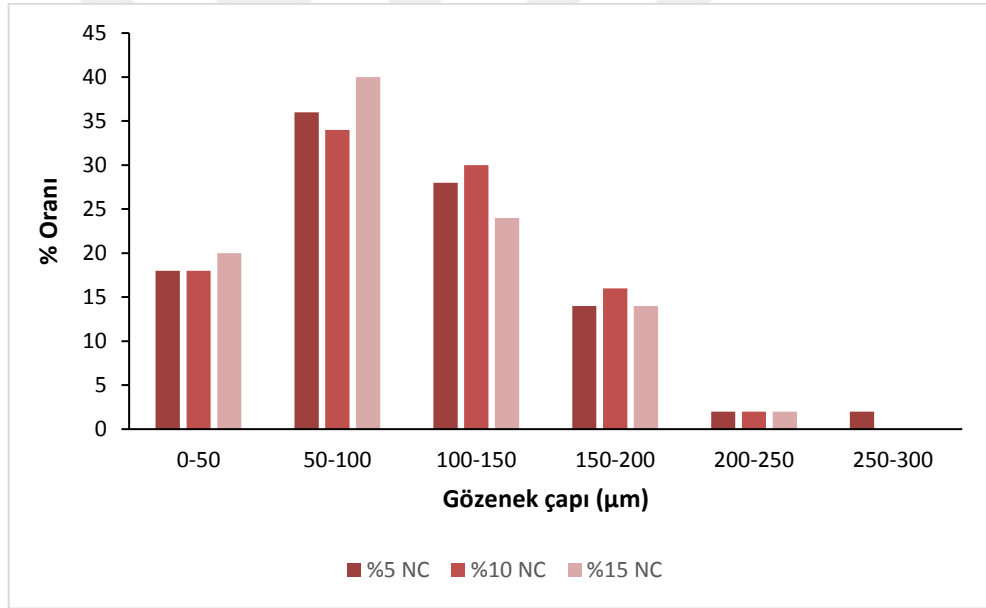
Şekil 9.31. PLGA 8/sBG doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı



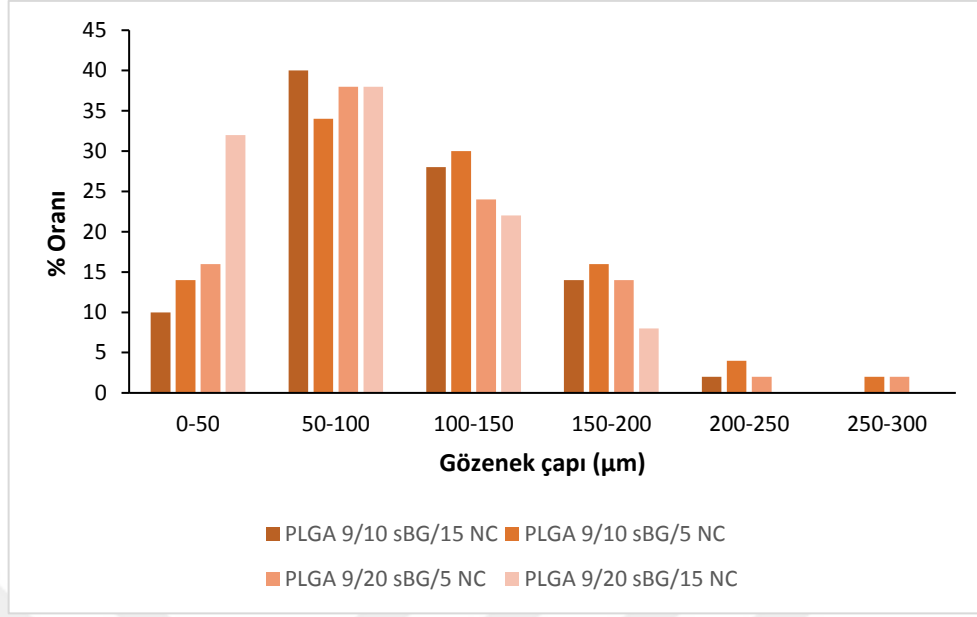
Şekil 9.32. PLGA 9/sBG doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı



Şekil 9.33. PLGA 8/NC doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı



Şekil 9.34. PLGA 9/NC doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı

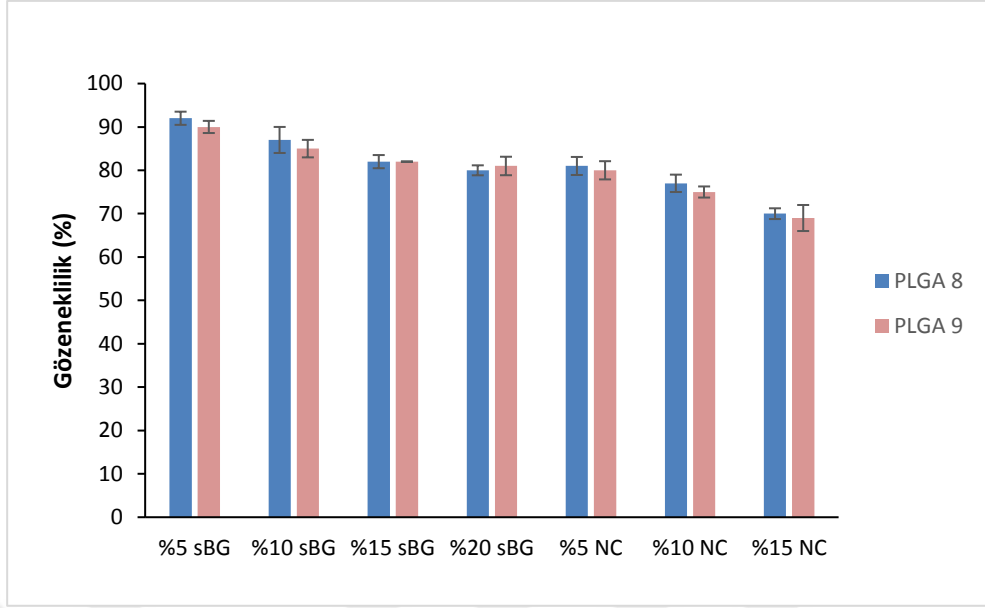


Şekil 9.35. PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin % çap dağılım histogramı

9.8. Gözeneklilik Hesaplaması

Arşimet prensibine göre yapılan gözeneklilik hesabı sonuçları ikili doku iskeleleri için Şekil 9.36 ve Tablo 9.10'da; üçlü doku iskeleleri için Şekil 9.37 ve Tablo 9.11'de gösterilmiştir. İkili doku iskeleleri için sonuçlara bakıldığında sBG oranı arttıkça gözenekliliğin düştüğü görülmüştür. NC katkılı iskelelere bakıldığında da benzer şekilde bir düşüş görülmüştür. Ancak sBG katkılı doku iskelelerinden daha düşük oranlar elde edilmiştir. Nanoselülozun kolaylıkla aglomere olması ve homojen bir şekilde dağılmamasının gözenekliliği düşürmüş olabileceği düşünülmektedir (Radakisnin vd.,2021).

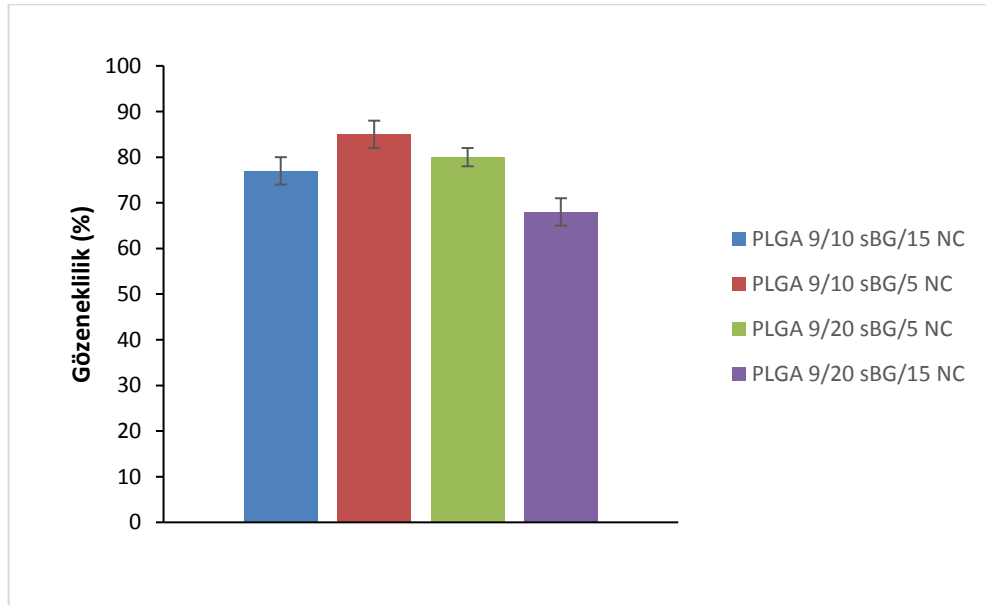
İkili doku iskelelerindeki sonuçlarla benzerlik gösteren üçlü PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinde de NC oranının artmasıyla birlikte gözeneklilikte düşüş gözlenmiştir. Ancak aynı zamanda sBG katkısının da olmasıyla PLGA 9/20 sBG/15 NC numunesinde en düşük gözeneklilik oranı olan % 68; PLGA 9/10 sBG/5 NC numunesinde en yüksek gözeneklilik oranı olan % 86 değerleri elde edilmiştir.



Şekil 9.36. İkili doku iskelelerinin % gözeneklilik değerleri

Tablo 9.10. İkili doku iskeleleri için % gözeneklilik değerleri

	%5 sBG	%10 sBG	%15 sBG	%20 sBG	%5 NC	%10 NC	%15 NC
PLGA 8	92 ±2,0	87±3,1	82±1,5	80±1,2	81±2,1	77±2,0	70±1,2
PLGA 9	90±1,4	85±2,02	82±1,5	81±2,1	80±2,1	75±1,2	69±2,0



Şekil 9.37. Üçlü doku iskelelerinin gözeneklilik değerleri

Tablo 9.11. Üçlü doku iskeleleri için % gözeneklilik değerleri

Gözeneklilik (%)	
PLGA 9/10 sBG/15 NC	77±3,60
PLGA 9/10 sBG/5 NC	85±3,05
PLGA 9/20 sBG/5 NC	80±2,51
PLGA 9/20 sBG/15 NC	68±3,05

9.9. Basma Testi

Doku iskelelerinin, iskeleler üzerinde ekili hücrelerin büyümesini ve doku rejeneratifini sürdürmek için yeterli güce sahip olması gerekmektedir (Tang vd., 2017).

Doku iskelelerine uygulanan basma testi ile numunelerin Young modülü hesaplamaları yapılmış ve doğal kemik doku ile karşılaştırması yapılmıştır. Basma testi öncesi ve sonrası numunelerin görüntüsü Görsel 9.1’de verilmiştir. PLGA/sBG doku iskelelerinin modül ve dayanım değerleri Şekil 9.38 ve Şekil 9.39’da; PLGA/NC doku iskelelerinin modül ve dayanım değerleri Şekil 9.40 ve Şekil 9.41’de gösterilmiştir. Doku iskelelerinin kimyasal yapısı, morfolojik özellikleri, gözeneklilikleri ve çap dağılımları iskelelerin mekanik performansını etkilediği için saf PLGA numunelerin katkılı numunelere göre daha zayıf mekanik özellik sergilediği görülmüştür.

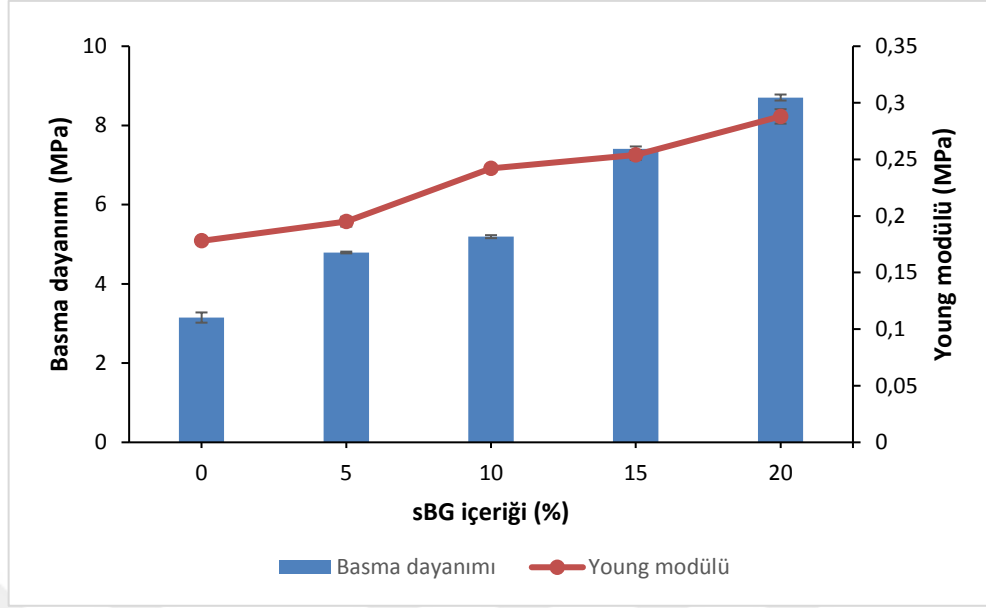
Basma testi deney sonuçlarına göre , PLGA /s BG doku iskeleleri için Young modülü ve dayanım değerleri Tablo 9.12’de ve PLGA/NC doku iskeleleri için Young modülü ve dayanım değerleri Tablo 9.13’te gösterilmiştir. Çıkan sonuçlarda PLGA 8 için Young modülü $0,178 \pm 0,002$ MPa ve basma dayanımı $3,15 \pm 0,129$ MPa; PLGA 9 için Young modülü $0,181 \pm 0,004$ MPa ve basma dayanımı $3,48 \pm 0,102$ MPa olarak bulunmuştur. İkili kompozitlerde katkı maddesinin artmasıyla Young modülü ve dayanımı artmıştır. Kompozit doku iskelelerinin Young modülünün ve dayanımının biyoaktif cam içeriğinin artışıyla iyileştirilmesi, PLGA moleküllerinin zincir hareketini engelleyen biyoaktif cam parçacıklarının varlığından kaynaklanmaktadır (Tian vd., 2019). Tian ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, PLGA’ ya ilave ettikleri mikro-nano biyoaktif camın modülü değerlerini arttırdığı görülmüştür (Tian vd., 2019). Bir başka çalışmada Shuai ve arkadaşları PLGA’ya ekledikleri nanohidroksiapatitin basma özelliklerinin benzer şekilde arttırdığını tespit etmişlerdir (Shuai vd., 2013).

Benzer şekilde yine Shuai ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada PLLA/PGA/HAP karışımı doku iskelelerinde basma dayanım ve modül değerleri PLLA/HAP iskelesi için, sırasıyla $16,6 \pm 0,9$ MPa ve $155,3 \pm 3,3$ MPa dayanım ve modülüs değeri elde edilmiştir. Diğer taraftan, PGA/HAP doku iskelesinin en düşük basma dayanımına ve modülü sahip olduğu görülmüştür. Mekanik özellikler, PGA içeriği arttıkça düşüş eğilimi sergilemiştir (Shuai vd., 2021).

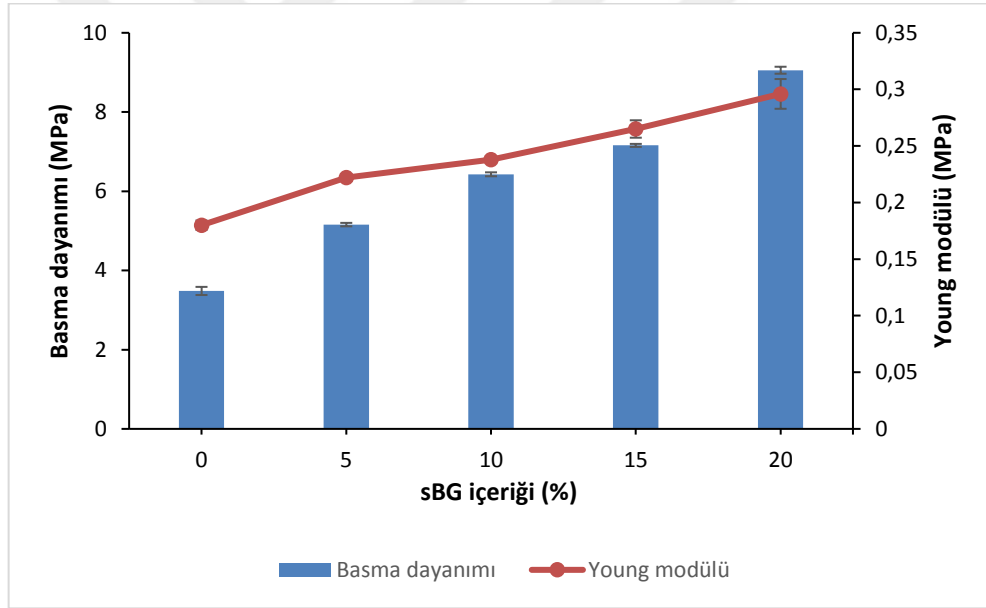
Nanoselüloz eklenmesiyle gözlenen mekanik özelliklerdeki iyileşmenin NC'lerin olağanüstü mekanik özellikleri ile ilişkili olduğu söylenebilir (Klemm vd., 2011). PLGA ve NC arasında oluşması muhtemel hidrojen bağı, polimer matrisinden NC'lere yük aktarımına sebep olur. Radakisnin ve arkadaşları, PLA polimerine ilave ettikleri selüloz nanofiberlerin doku iskelelerinin basma modüllerini ve dayanımlarını arttırdığını tespit etmişlerdir (Radakisnin vd., 2021). Nasri- Nasabadi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada nişasta/selüloz nanofiber doku iskelelerinde selüloz nanofiber katkısının basma özelliklerini iyileştirdiği görülmüştür (Nasri-Nasabadi vd., 2014).



Görsel 9.1. Doku iskelesinin basma testi uygulanmadan önceki ve sonraki görüntüsü



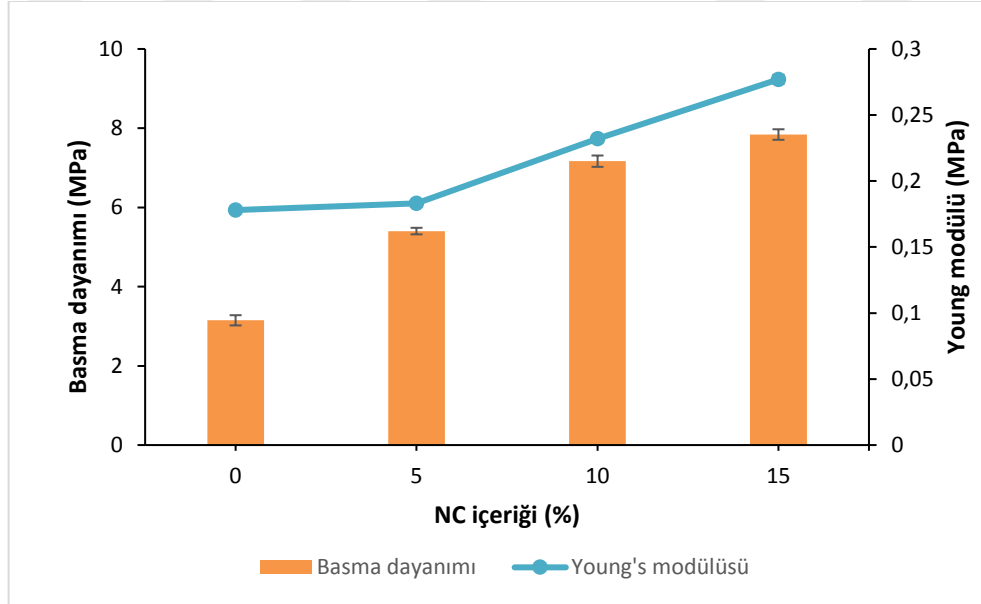
Şekil 9.38. PLGA 8/sBG katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülleri



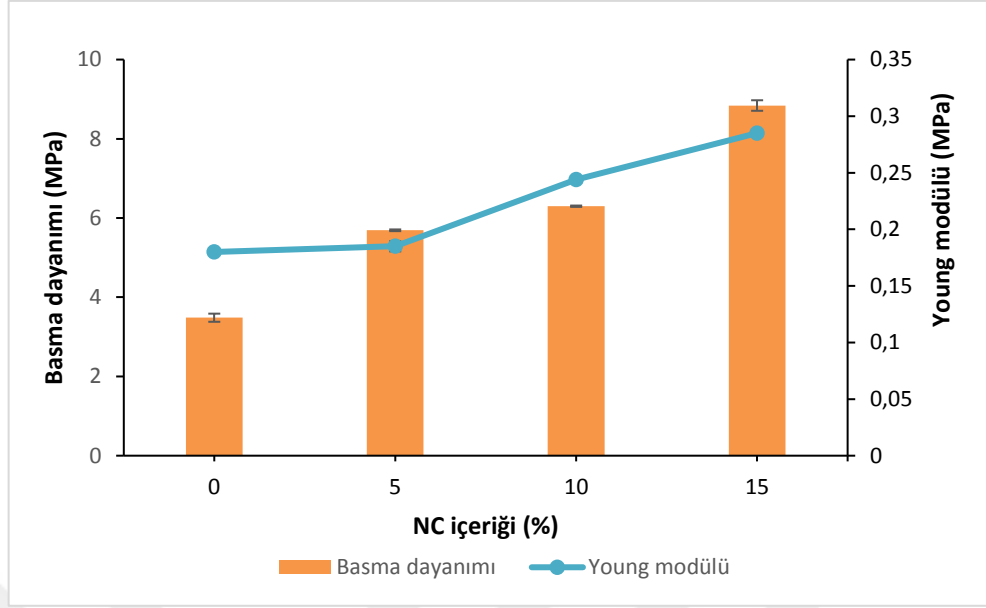
Şekil 9.39. PLGA 9/sBG katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülleri

Tablo 9.12. Biyoaktif cam katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülü değerleri

	Young modülü (MPa)	Basma dayanımı (MPa)
PLGA 8	0,17 ±0,002	3,15 ±0,129
PLGA 8/5 sBG	0,19 ±0,004	4,79 ±0,022
PLGA 8/10 sBG	0,23 ±0,002	5,19 ±0,037
PLGA 8/15 sBG	0,25 ±0,004	7,41 ±0,056
PLGA 8/20 sBG	0,28 ±0,006	8,70 ±0,075
PLGA 9	0,18 ±0,004	3,48 ±0,102
PLGA 9/5 sBG	0,19 ±0,002	5,15 ±0,043
PLGA 9/10 sBG	0,23 ±0,002	6,42 ±0,049
PLGA 9/15 sBG	0,26 ±0,007	7,15 ±0,037
PLGA 9/20 sBG	0,29 ±0,013	9,05 ±0,088



Şekil 9.40. PLGA 8/NC katkılı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülleri



Şekil 9.41. PLGA 9/NC katkı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülleri

Tablo 9.13. Nanoselüloz katkı doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülü değerleri

	Young modülü (MPa)	Basma dayanımı (MPa)
PLGA 8	0,17 ±0,002	3,15 ±0,129
PLGA 8/5 NC	0,18 ±0,002	5,40 ±0,082
PLGA 8/10 NC	0,22 ±0,002	7,16 ±0,143
PLGA 8/15 NC	0,27 ±0,003	7,84 ±0,132
PLGA 9	0,18 ±0,004	3,48 ±0,102
PLGA 9/5 NC	0,18 ±0,004	5,69 ±0,021
PLGA 9/10 NC	0,24 ±0,003	6,29 ±0,017
PLGA 9/15 NC	0,28 ±0,003	8,84 ±0,132

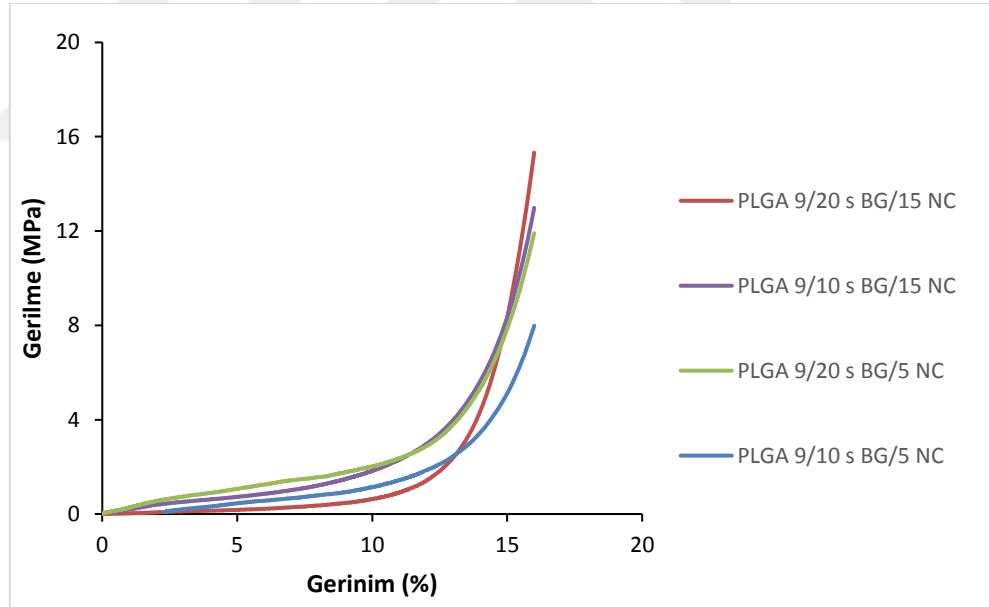
Sonuçlara bakıldığında sBG katkılı ve NC katkılı doku iskelelerinin modülüs ve dayanım değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Ancak sBG katkılılarda değerler biraz daha yüksektir. Bunun nedeni olarak BG'nin yapısının kemik dokuya daha yakın olup güçlü Ca,P içermesidir. Ayrıca yüksek gözenekliliğin mekanik dayanımı azalttığı bilgisinden hareketle doku iskelelerinin gözeneklilik oranının arttıkça mekanik özelliklerinin düştüğü gözlenmiştir.

Optimum oranlar seçilerek hazırlanan üçlü numuneler PBS solüsyonu içinde 37 °C sıcaklık ve 60 rpm çalkalama hızında 3 hafta boyunca inkübatörde bekletilerek bozunmaları değerlendirilmiş ve bu süre sonundaki mekanik özellikleri incelenmiştir. Görsel 9.2'de üçlü numunelerin haftalık çekilen fotoğrafları görülmektedir. Ayrıca Şekil 9.42'de PLGA 9/sBG/NC üçlü kompozit doku iskelelerinin gerilme-gerinim eğrisi ve Şekil 9.43'te bozunma öncesi ve bozunma sonrasına ait Young modülü ve dayanım grafiği verilmiştir. Numunelerin bozunma öncesi yapılan test sonuçlarında modül değerlerine bakıldığında en yüksek değer hem biyoaktif cam hem de nanoselüloz oranı en yüksek olan PLGA 9/20 s BG/15 NC numunesine ait $0,495 \pm 0,007$ MPa değeridir ve aynı zamanda bu numunenin basma dayanımı da en yüksek değere sahiptir ($15,062 \pm 0,057$ MPa). Üçlü doku iskelelerinde nanoselülozun etkisinin araştırıldığı bu çalışmada basma testi sonuçları nanoselüloz ilavesinin artışına bağlı olarak modül ve dayanım değeri üzerinde belirgin bir artış sağlanmıştır. İkili ve üçlü tüm numunelerdeki modül ve dayanım değerleri süngerimsi kemik dokuya ait değerlerle örtüşmektedir.

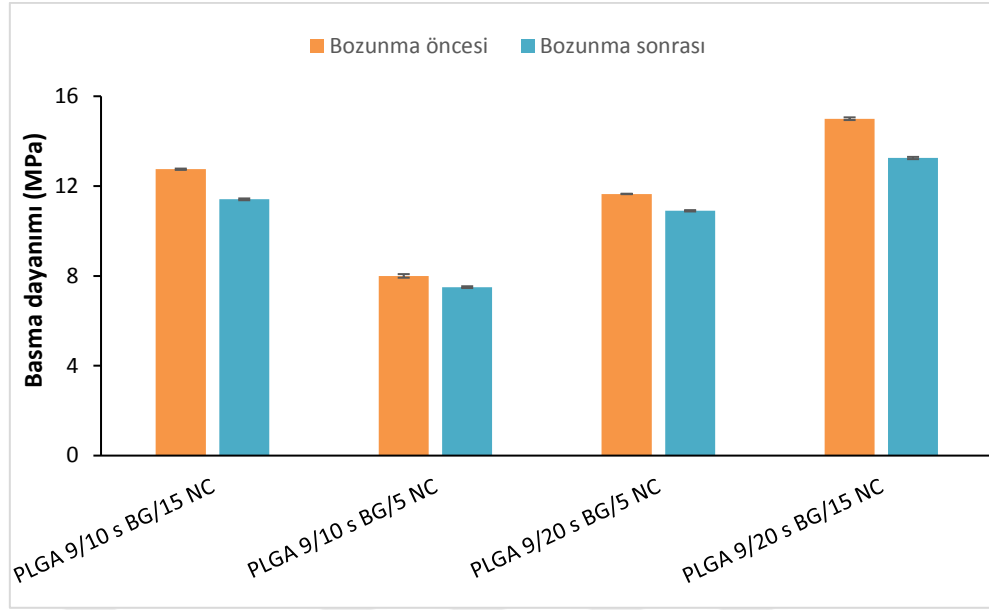
Numunelerin 3 haftalık bozunma sonuçlarına bakıldığında, PLGA 9/10 s BG/15 NC ve PLGA 9/20 s BG/15 NC doku iskelelerinde meydana gelen ağırlık kaybına bağlı olarak basma dayanım değerlerinde sırayla %10,5 ve %11,6 lık; Young modülü değerlerinde sırayla % 5,5 ve % 5,7 lik bir düşüş meydana gelmiştir. Bozunma sonrası mekanik değerlerde meydana gelen düşüş yüksek oranda çıkmamış, doku iskelesi dayanımını etkilememiştir. Bu da bozunma sürecine paralel olarak yeni doku oluşana kadar vücuttaki hasarlı bölgeye yeterli dayanımı sağlayacaktır.



Görsel 9.2. Üçlü doku iskelelerinin 3 hafta boyunca çekilen görüntüleri (a) PLGA 9/10 s BG/15 NC (b) PLGA 9/20 s BG/15 NC (c) PLGA 9/10 s BG/5 NC (d) PLGA 9/20 s BG/5 NC



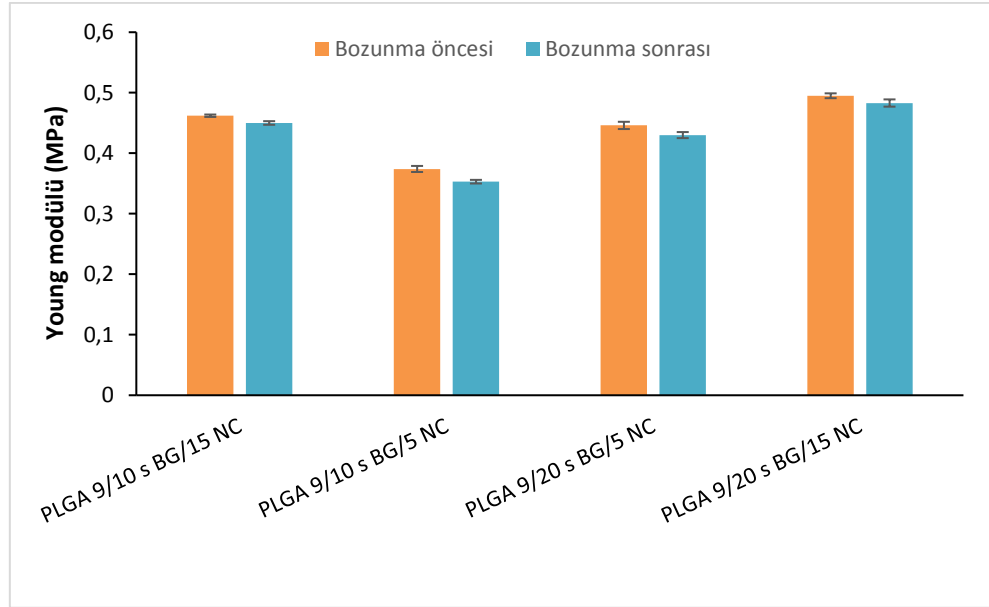
Şekil 9.42. Üçlü doku iskelelerinin gerilme-gerinim eğrisi



Şekil 9.43. Üçlü doku iskelelerinin bozunma öncesi ve sonrası basma dayanımları

Tablo 9.14 Üçlü doku iskelelerinin bozunma öncesi ve sonrası basma dayanım değerleri

	Bozunma öncesi basma dayanımı (MPa)	Bozunma sonrası basma dayanımı (MPa)
PLGA 9/10 s BG/15 NC	12,75±0,03	11,41±0,04
PLGA 9/10 s BG/5 NC	8,11±0,08	7,50±0,04
PLGA 9/20 s BG/5 NC	11,64±0,01	10,91±0,03
PLGA 9/20 s BG/15 NC	15,06±0,06	13,25±0,05



Şekil 9.44. Üçlü doku iskelelerinin bozunma öncesi ve sonrası Young modülleri

Tablo 9.15. Üçlü doku iskelelerinin bozunma öncesi ve sonrası Young modülü değerleri

	Bozunma öncesi Young modülü (MPa)	Bozunma sonrası Young modülü (MPa)
PLGA 9/10 s BG/15 NC	0,46±0,006	0,45±0,005
PLGA 9/10 s BG/5 NC	0,37±0,004	0,35±0,004
PLGA 9/20 s BG/5 NC	0,44±0,004	0,43±0,004
PLGA 9/20 s BG/15 NC	0,49±0,007	0,48±0,006

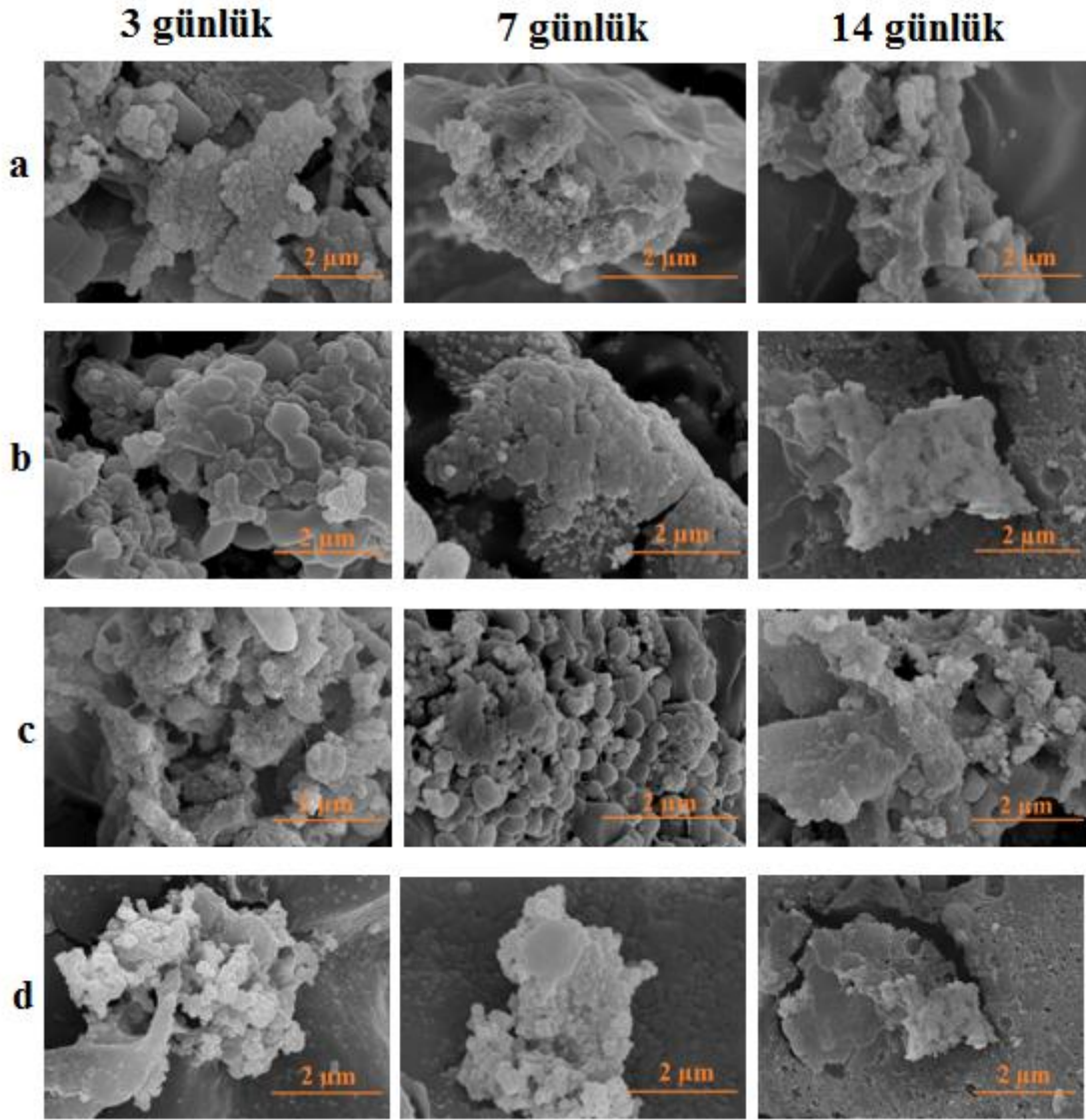
9.10. Apatit Oluşumu

Kemik rejenerasyonu için doku iskelesi, vücutta implantasyon sonrası canlı kemik dokusuna bağlanmak için yüzeyinde bir apatit tabakası oluşturma yeteneğine sahip olmalıdır (Kaur vd., 2014). Yapılan deneylerde numunelerin normal fizyolojik koşullar altında 14 güne kadar SBF solüsyonunda bekletilmesiyle kompozit doku iskelelerinin apatit tabakası oluşturma yeteneği değerlendirilmiştir. SEM sonuçlarına göre doku iskelelerinin yüzeyinde biriken çok sayıda küresel parçacık apatit oluşumunu göstermektedir ve bu küresel yapılar birleşerek yoğun bir parçacık tabakası oluşturmuştur. Şekil 9.45'te PLGA 8/sBG doku iskelelerinin, Şekil 9.46'da ise PLGA 9/sBG doku iskelelerinin SEM mikrografları görülmektedir.

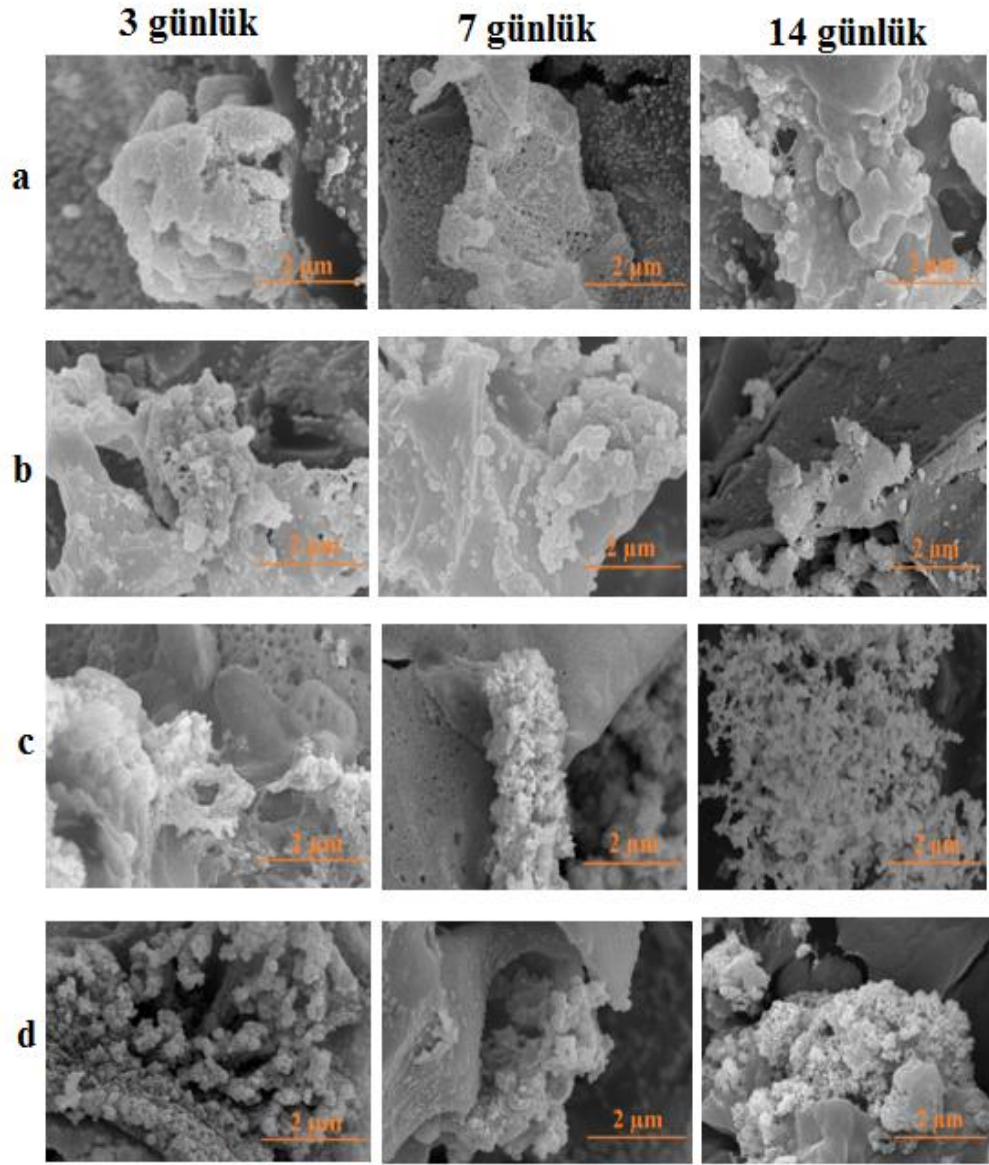
Simüle vücut sıvısı (SBF) içindeki doku iskelelerinde PLGA'dan kaynaklanan oksijen ve karbon ile biyoaktif camdan kaynaklanan kalsiyum Ca ve P iyonları yoğunlaşır. Burada mikrogözenekler daha küçük çaplı olduklarından daha hızlı bir şekilde apatit ile kaplanır. Biyoaktif camın SBF ile biyoaktivite mekanizmasına bakacak olursak; başlangıçta BG yapısındaki Ca^{+2} ve Na^{+} iyonları ile SBF içindeki H^{-} iyonları yer değiştirerek BG yüzeyinde Si-OH (silanol) grupları oluşturur. Bu gruplar apatit oluşumunun çekirdeklenme merkezi olarak kabul edilir. BG yüzeyinde kolloidal bir tabaka oluşur. SBF'deki Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonları bu tabaka üzerinde apatit katmanını oluşturur.

DeneySEL sonuçlara bakıldığında, 3. gün itibariyle kompozit yüzeylerde birikme olduğu ve genellikle Ca/P oranının başlangıçtan 14. güne kadar azaldığı ve istenilen dengeye ulaştığı görülmektedir. Burada hedeflenen, kemik dokusunun sahip olduğu Ca/P oranı olan 1,67'ye (Xu, Neoh, Kinsen, 2010) yaklaşabilmektir. sBG katkılı doku iskelelerinde 7 ve 14 günlük görüntülerde bu orana yaklaşılmıştır. Özellikle 14. günün sonunda %20 sBG katkılı doku iskelesinde Ca/P oranı 1,60 bulunarak ulaşılmak istenen değere en yakın sonuç olmuştur. Burada en yoğun sBG katkılı yapı % 20 oranındaki doku iskelesi olduğu için daha yoğun mikrogözeneğe sahip olmasının etkili olduğu söylenebilir. sBG derişiminin artması ve mineralizasyon süresinin uzaması da apatit oluşumu, mekanik özellikler ve hücre proliferasyonu ile farklılaşmasını iyileştirmede etkili faktörlerdir (Tian vd., 2019). Şekil 9.47'de PLGA 8/15 NC ve PLGA 9/15 NC doku iskelelerinin mikrografları gösterilmiştir. Ancak görselden de anlaşıldığı gibi nanoselüloz katkılı doku iskelelerinde apatit oluşumuna rastlanılmamıştır.

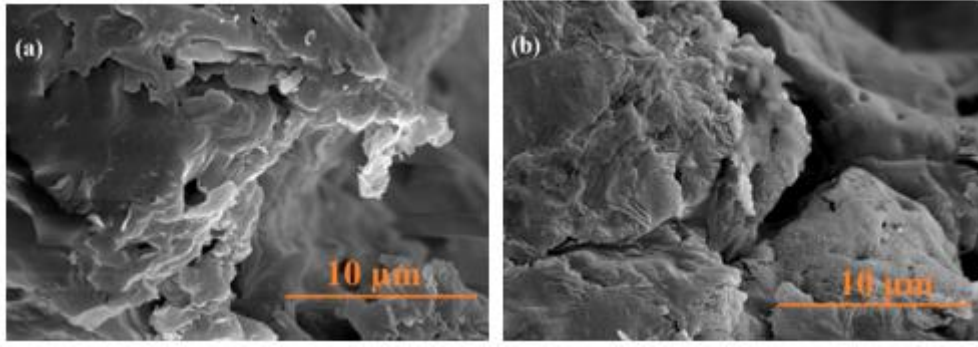
Bunun nedeni olarak nanoselülozun organik yapısından kaynaklı vücut sıvısındaki iyonlarla bir etkileşim içinde olmayışı gösterilebilir. Buna bağlı olarak yapılan çalışmalar selülozun birincil hidroksil grubunun, kalsiyum fosfat kristallerinin büyümesini uyarmak için yeterince reaktif olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, selüloz yüzeylerinde apatit oluşumunu iyileştirmek için bir yüzey modifikasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (Cañas-Gutiérrez vd., 2020).



Şekil 9.45. İkili doku iskelelerinin 3, 7 ve 14 günlük SEM mikrografları (20000)X (a) PLGA8/5 sBG (b) PLGA 8/10s BG (c) PLGA 8/15 sBG (d) PLGA 8/20 sBG

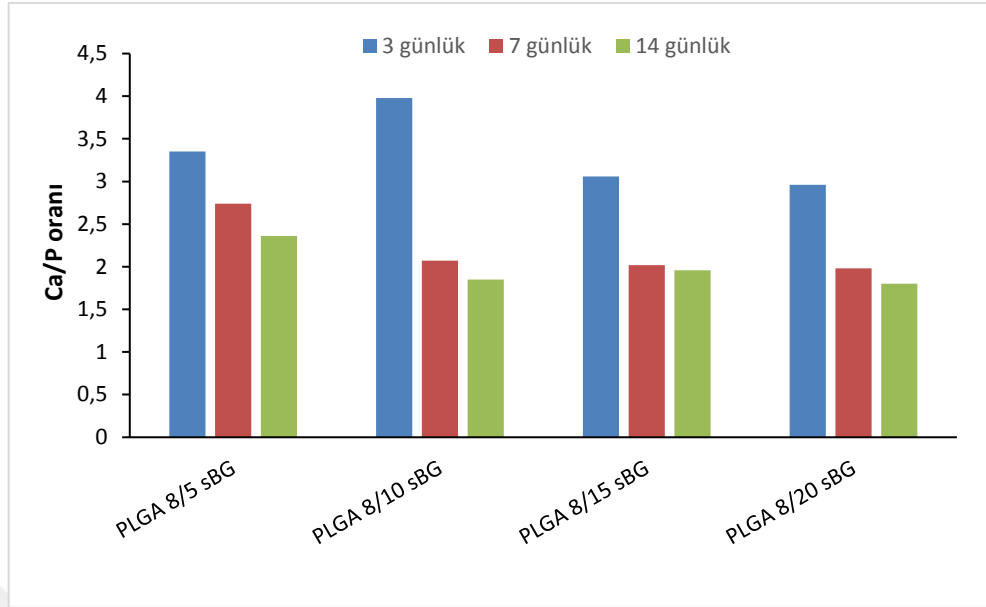


Şekil 9.46. İkili doku iskelelerinin 3, 7 ve 14 günlük SEM mikrografları (20000)X (a) PLGA 9/5 sBG (b) PLGA 9/10s BG (c) PLGA 9/15 sBG (d) PLGA 8/20 sBG

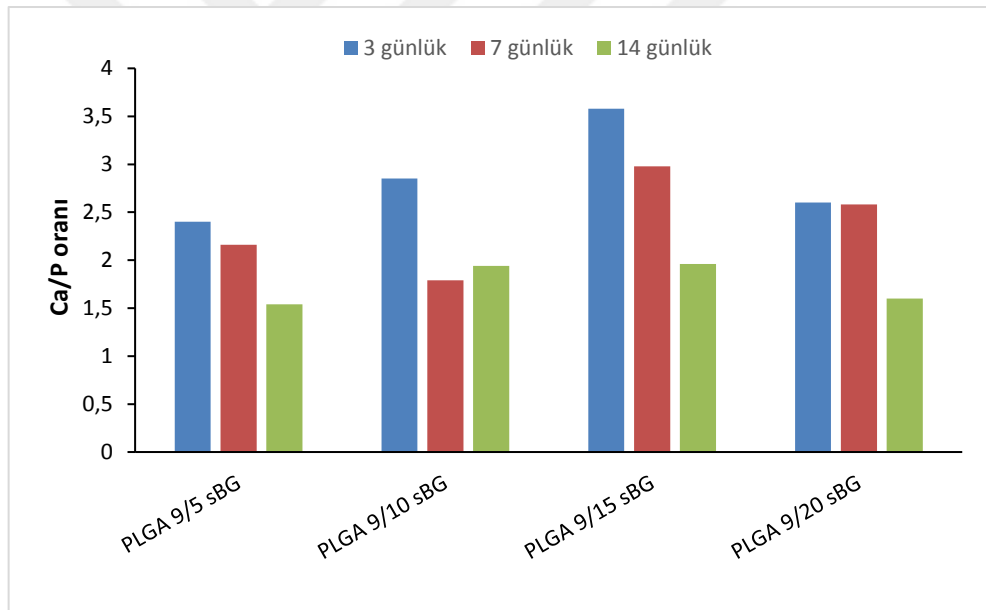


Şekil 9.47. *PLGA/NC doku iskelelerinin 14 günlük SEM mikrografları (5000)X (a) PLGA 8/15 NC (b)PLGA 9/15 NC*

PLGA 8/s BG ve PLGA 9/s BG doku iskelelerinin Ca/P oran (EDS sonuçlarına bakılarak hesaplanan) grafikleri Şekil 9.48 ve Şekil 9.49’da verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, apatit oluşumu sırasında 3 gün sonunda oranların yüksek çıktığı, devam eden günlerde ise düştüğü görülmüştür. İskelede SBF ve sBG'nin teması nedeniyle SBF'deki H^+ yer değiştirmiş ve sBG'nin yüzeyinde çözünür Si-OH oluşturmuştur (Martínez vd., 2000; Hesarakı vd., 2010). Ek olarak, H^+ ve Ca^{2+} iyonlarının karşılıklı yer değiştirmesi, Si-OH oluşumunu ve sBG'de silika ağının depolimerizasyonunu hızlandırmıştır. Bu süreçte, Ca iyonları büyük ölçüde sBG yüzeyinden çözülmüş ve bu da SBF'deki Ca iyonlarının konsantrasyonunda bir artışa neden olmuştur. Mineralizasyon süresi uzadıkça oluşan apatit miktarı artmaya devam ederken Ca ve P tüketimi de artmış olacağından dolayı doku iskelelerindeki Ca/P oranları sürekli bir düşüş eğilimi göstermiştir.



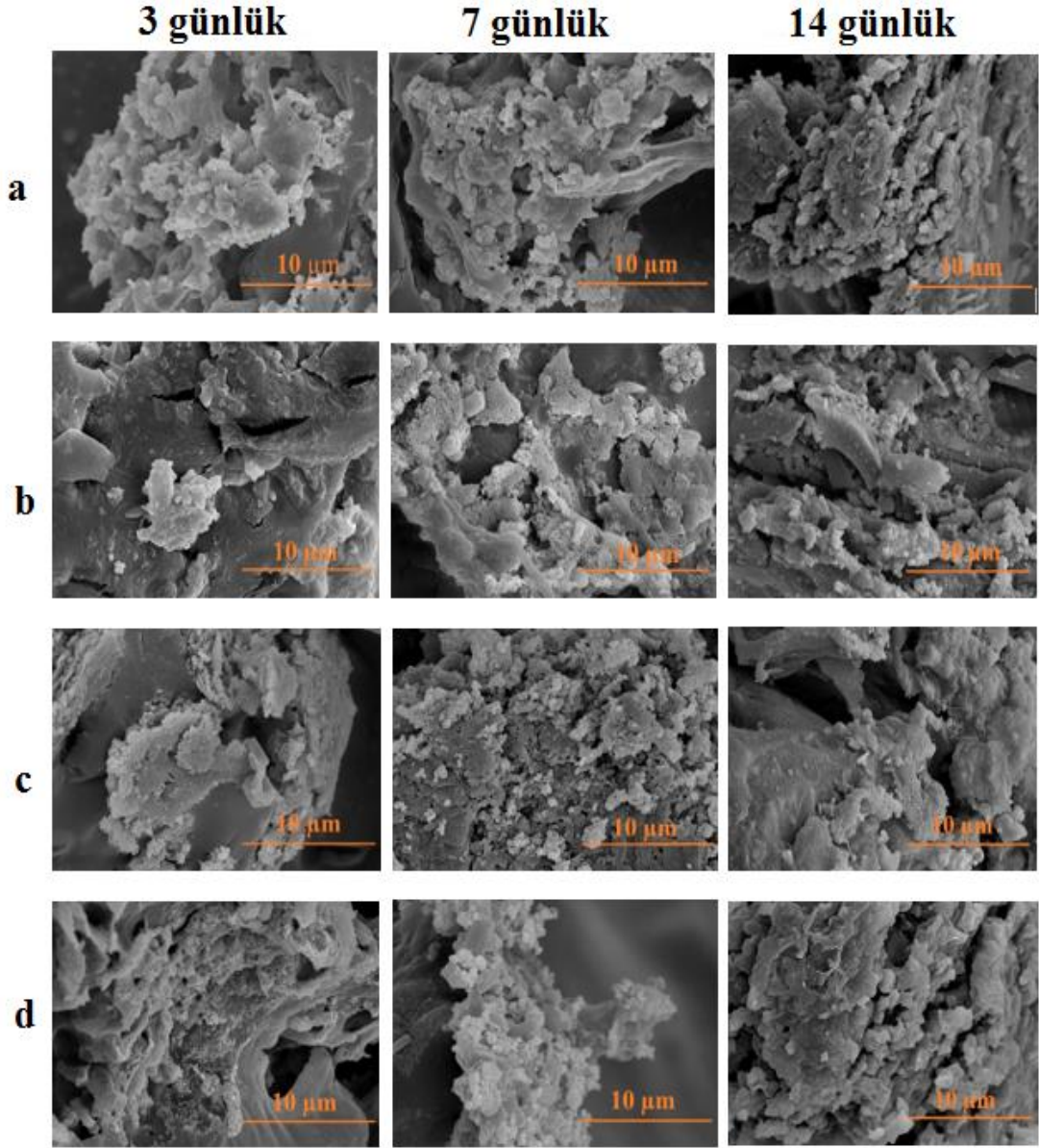
Şekil 9.48. PLGA 8/sBG doku iskelelerinin Ca/P oranları



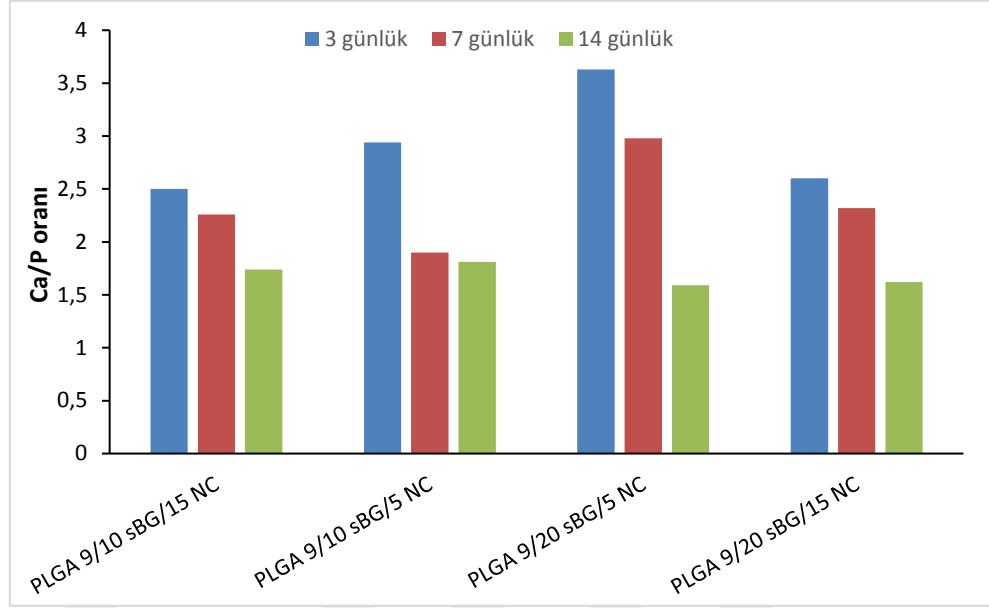
Şekil 9.49. PLGA 9/sBG doku iskelelerinin Ca/P oranları

Şekil 9.50’de PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin SEM mikrografları Şekil 9.51’de Ca/P oranlarının grafiği görülmektedir. Üçlü yapıdaki doku iskeleleri de benzer şekilde SBF içinde bekletilmiş, SEM görüntüleri alınmış ve EDS ile Ca/P oranlarına bakılmıştır. Sonuçlara göre Ca/P oranı 1,67’ye en yakın değer % 20 BG katkılı numunelerde görülmüştür. Buna göre PLGA 9/20 sBG/5 NC için 1.59; PLGA 9/20 BG/15 NC için 1,62 değerleri tespit edilmiştir.

Üçlü doku iskelelerinde apatit oluşumunu biyoaktif cam katkısı sağlamıştır ve ikili doku iskelelerinde olduğu gibi yüksek sBG içerikli iskelelerde hedeflenen orana yaklaşılmıştır.



Şekil 9.50. Üçlü doku iskelelerinin 3, 7 ve 14 günlük SEM mikrografları (20000)X (a) PLGA9/10 sBG/15 NC (b) PLGA 9/10s BG/5 NC (c) PLGA 9/20 sBG/5 NC (d) PLGA 9/20 sBG/ 15NC



Şekil 9.51. Üçlü doku iskelelerinin Ca/P oranları

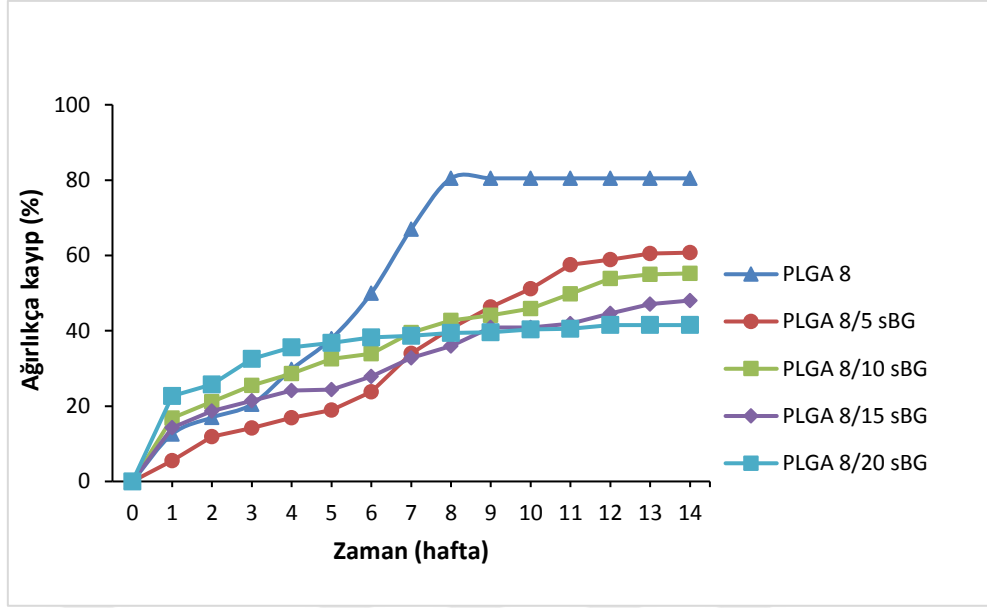
9.11. Hidrolitik Bozunma

Doku iskeleleri yapı itibarıyla sentetik bir hücre dışı matris (ECM) görevi görür ve canlı hücrelerin bağlanmasına, göç etmesine, çoğalmasına ve farklılaşmasına izin verir. Bununla birlikte, bu yapılar kalıcı değildir ve bozunma ile vücut tarafından oluşturulan gerçek ECM ile değiştirilmelidir (Alizadeh vd., 2013). Bu nedenle oluşturulan doku iskelelerinin biyolojik olarak parçalanabilir davranışı büyük önem taşımaktadır. Bu özellikleri sayesinde hücrelerin ürünlerini salgılayabildikleri ve hasarları yenileyebildikleri yeni ECM'nin oluşumunu sağlamakta, kolaylaştırmaktadır (O'brien, 2011). İdeal olarak doku iskelesinin bozunma hızı, yeni doku oluşum hızıyla paralel bir şekilde ilerlemelidir.

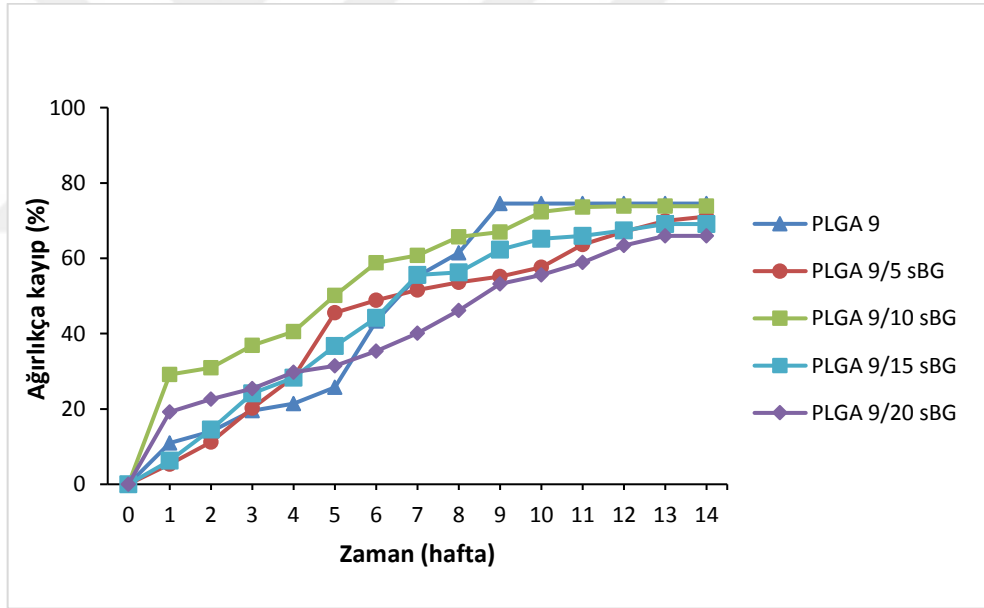
Yapılan deneyler neticesinde elde edilen zamanla bozunma grafikleri PLGA 9/sBG numuneleri için Şekil 9.52 ve Şekil 9.53'te; PLGA 9/NC numuneleri için Şekil 9.54 ve Şekil 9.55'te gösterilmektedir. Numunelere 37 °C sıcaklık ve pH 7,4'te PBS içerisinde 14 haftalık bir bozunma testi uygulanmıştır. Laktik asit ve glikolik asit, PLGA'nın biyolojik ayrışmasının iki ana ürünüdür ve H₂O, CO₂ olarak vücuttan atılır (Park ve Bronzino, 2002). Laktit zincirine dahil edilen glikolit sadece L zincirinin düzenliliğini ve simetrisini değiştirmekle kalmayıp, aynı zamanda L zincirinin kristalleşme sürecini de kesintiye uğratarak amorf PLGA kopolimeri oluşturmaktadır.

Amorf yapının, su ve enzimin ester bağına saldırması için elverişli olması (Pattaro vd., 2020) ve glikolitin hidrofilik yapısından dolayı PLGA 8 doku iskelesinin 8. hafta itibariyle % 80 ağırlık kaybı yaşadığı, saf PLGA 9 doku iskelesinin ise 10. hafta itibariyle % 74 ağırlık kaybı yaşadığı görülmüştür. İkili doku iskelelerinde genel olarak, gözenekli yapılarının ciddi şekilde çökmesi nedeniyle ilk 3 haftalık hidrolizin başlangıcında ilk yapılarını kaybettikleri tespit edilmiştir (Haaparanta vd., 2015). sBG katkılı doku iskelelerinin bozunma grafiklerine göre, sBG katkısı arttıkça bozunma hızı düşmüş ve doku iskelelerinde ağırlık kaybı oluşmuştur. Aynı zamanda daha yüksek yüzey alanı daha iyi bir bozunma oranı sağlayacağından gözeneklilik oranı ve gözenek çapı düşük olan doku iskelelerinde de benzer sonuçlar çıkmıştır. Sonuçlara göre en yüksek ağırlık kaybı PLGA 8/5 sBG için % 60 ve PLGA 9/5 sBG için % 71 olarak görülmüştür. En düşük ağırlık kayıpları ise PLGA 8/20 sBG için % 41 ve PLGA 9/20 sBG için % 65 olarak tespit edilmiştir. Bu davranışın, daha yüksek miktarlarda sBG içeren iskelenin daha yüksek apatit oluşturma kabiliyeti ve dolayısıyla gözenekleri kapatması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Nazemi vd., 2014).

Ayrıca PLGA'nın asidik bozunma ürünlerinin BG'den salgılanan alkali gruplar tarafından nötralize edilmesi de bozunma oranını azaltmaktadır (Jia, Zhang, Luo, 2010). Boccaccini ve Maquet'in yapmış oldukları çalışma kapsamında sudaki H⁺ iyonlarının biyoaktif cam yapısındaki alkali yapılar ile hızlı bir şekilde yer değiştirmesi ve bunun da polimer yüzeyinde bir pH tamponlama etkisi sağlaması ve böylece polimer bozunmasının hızlanmasını önlediği öne sürülmüştür (Boccaccini ve Maquet, 2003).



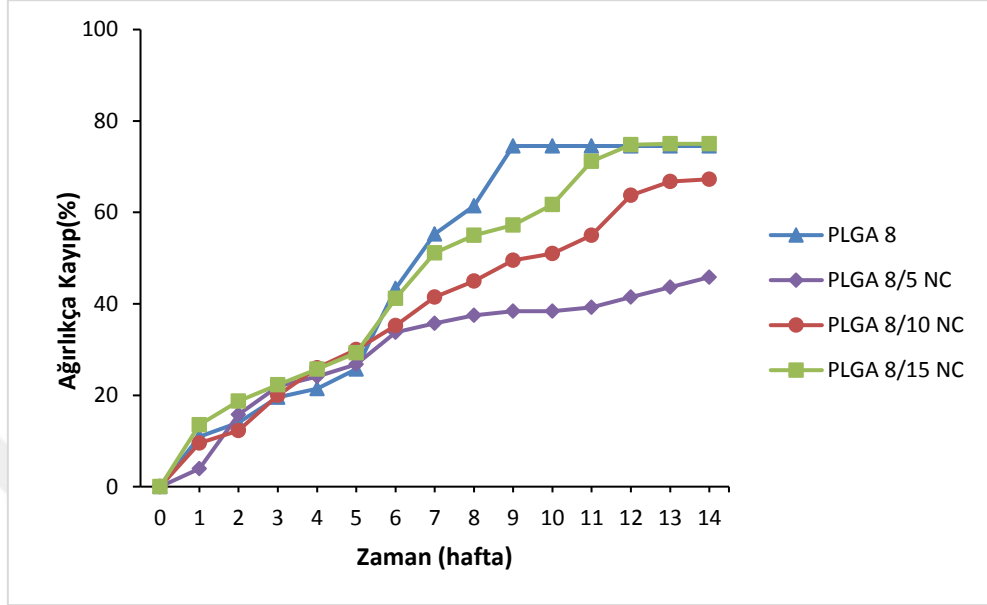
Şekil 9.52. PLGA 8/sBG doku iskelelerinin bozunurluk grafiği



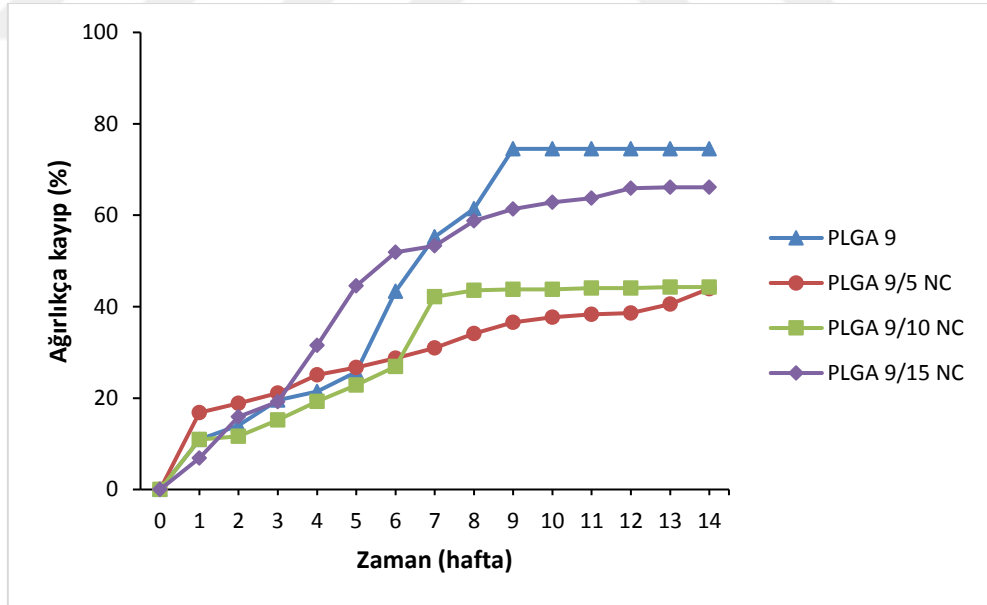
Şekil 9.53. PLGA 9/sBG doku iskelelerinin bozunurluk grafiği

NC katkılı doku iskelelerinin bozunma grafiklerine göre, NC oranının artmasıyla bozunma hızının ve ağırlık kaybının arttığı gözlenmiştir. Ancak her iki orandaki saf PLGA'lar kompozitlere göre son haftalarda daha hızlı bir bozunma davranışı sergilemiştir. Yan ve arkadaşları da PLA'ya NC katkısının ikili yapılarda bozunmayı hızlandırdığı sonucuna varmışlardır (Yan vd., 2015). Sonuçlara göre her iki orandaki polimer için en yüksek ağırlık kayıpları 11. haftanın sonu itibariyle % 15 NC katkılı numuneler için sırayla % 75 ve % 66 olarak bulunmuştur.

Bu duruma sebep olarak, nanoselülozun hidroksil grupları (-OH) içermesi, hidrofilik davranış göstermesi ve su molekülleri ile etkileşimi sırasında zincirlerinin hızlı bir şekilde hidroliz olması gösterilmektedir (Jong vd., 2001).



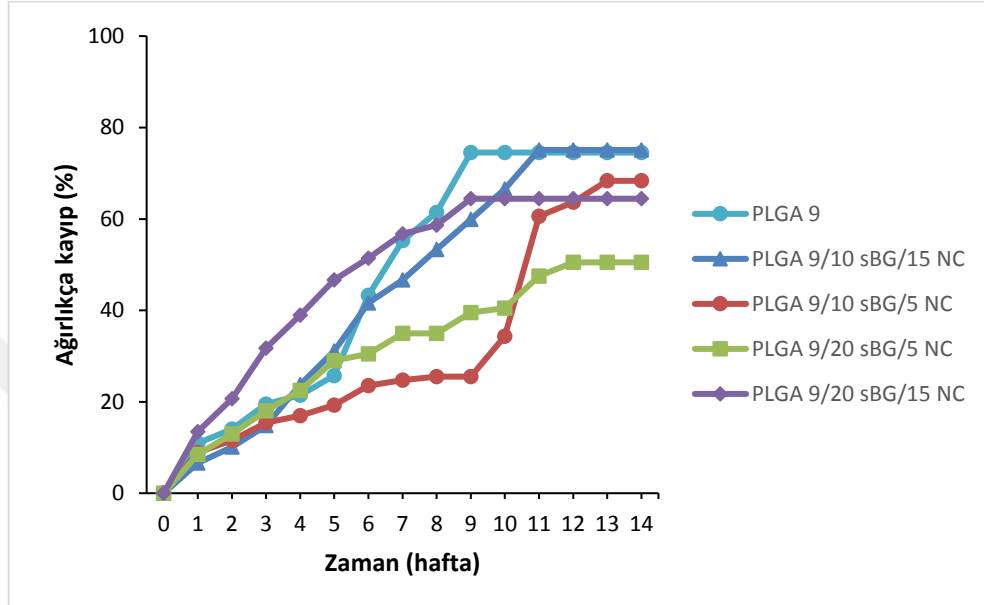
Şekil 9.54. PLGA 8/NC doku iskelelerinin bozunurluk grafiği



Şekil 9.55. PLGA 9/NC doku iskelelerinin bozunurluk grafiği

PLGA 9/sBG/NC üçlü doku iskelelerinin bozunma grafiği Şekil 9.56'da gösterilmiştir. PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin bozunma grafiklerine bakıldığında, en yüksek ağırlık kaybının 11.hafta itibarıyla % 75 olarak, en düşük sBG ve en yüksek NC katkılı olan numunede olduğu (PLGA 9/10 sBG/15 NC) tespit edilmiştir.

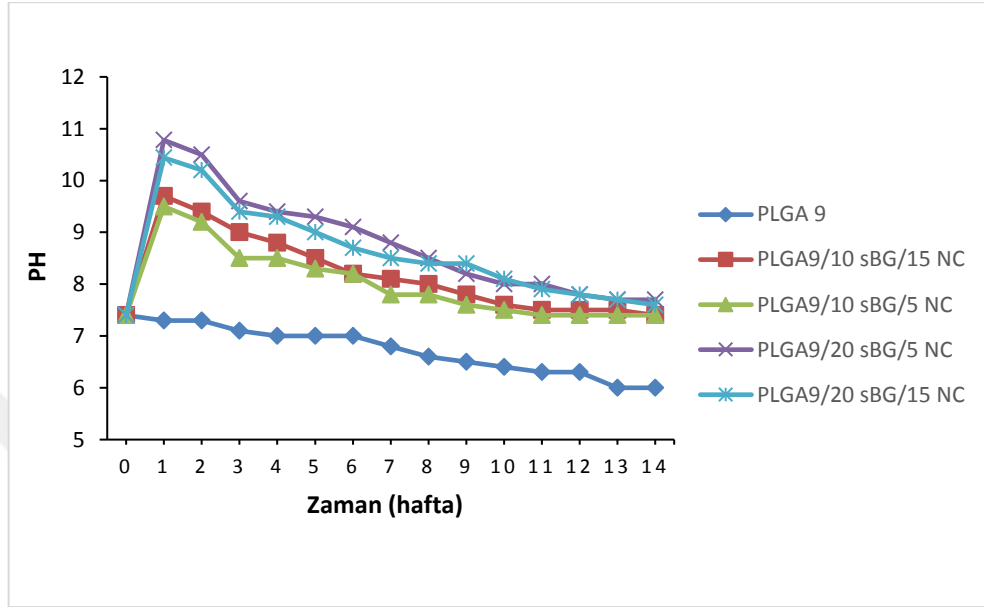
PLGA 9 ile karşılaştırıldığında, PLGA 9'un bozunmasının daha erken haftalarda gerçekleştiği, üçlü yapılarıdaki bozunmanın katkı maddelerinin etkisiyle daha geç gerçekleştiği görülmüştür. Burada elde edilen sonuçlar, ikili kompozit yapılarda elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir.



Şekil 9.56. PLGA 9 ve PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin bozunurluk grafiği

Üçlü doku iskelelerine ait bozunma süreci boyunca pH değişim grafiği Şekil 9.57'de verilmiştir. Çalışma vücut koşulları esas alınarak gerçekleştirildiği için sıcaklık kadar pH değişimi de önem teşkil etmektedir. Saf PLGA için bakıldığında pH değerlerinde ilk haftalarda önemli bir değişiklik görülmemiştir ancak devam eden haftalarda pH değerlerinde yavaş bir düşme meydana gelmiştir. Buradaki pH düşmesi asidik malzemelerin (laktik asit ve glikolik asit) polimer matrsten salındığını ve bu bozunma ürünlerinin çözelti içinde tutulduğunu doğrulamaktadır (Darestani vd., 2005). Üçlü doku iskeleleri için pH değişim sonuçlarına bakıldığında belirleyici etkinin biyoaktif cam varlığı olduğu görülmektedir. Buna göre, sBG'nin alkali bozunma ürünleri, hızla bozunan PLGA'nın karboksil uç gruplarını nötralize ederek otokatalitik etkiyi büyük ölçüde azaltmaktadır (Dziadek vd., 2023). Başlangıçta BG bozunma ürünlerinin varlığı daha belirgin bir şekilde olup pH değerini yükseltmiştir. Burada en yüksek artışlar sBG oranı yüksek olan numunelerde meydana gelmiştir.

Devam eden süreçte solüsyonun ayda bir değiştirilmesinin (başlangıçta bozunma ürünlerinin solüsyon içine salınmasından kaynaklı pH kontrolünü sağlayabilmek için) de etkisiyle pH değeri düşmeye başlamış ve yaklaşık olarak fizyolojik seviyeye gelmiştir.



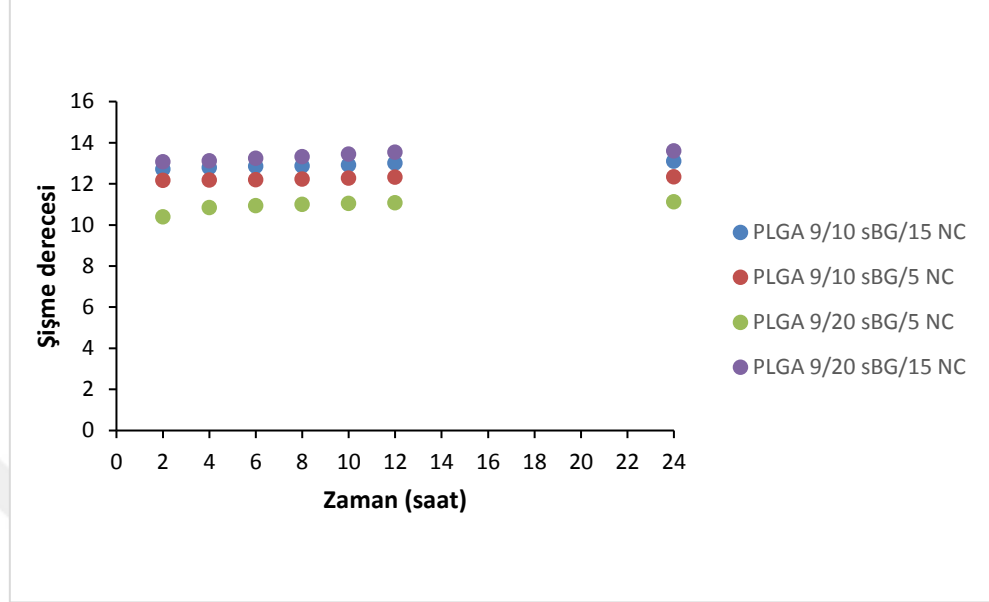
Şekil 9.57. PLGA 9 ve üçlü doku iskelelerin pH değişim grafiği

9.12. Şişme Testi

Şişme testi, besinlerin hücre içine alınması ve atık ürünlerin uzaklaştırılması gibi hücresel süreçlerin desteklenmesinde önemli bir rol oynar. Şekil 9.58’de PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerine uygulanan PBS içerisinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında doku iskelelerinin zamanın bir fonksiyonu olarak şişme dereceleri gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre başlangıçtan itibaren ilk 2 saatlik sürede şişme derecelerinin hızlı bir şekilde arttığı ve ardından 24 saatlik sürenin sonuna kadar az da olsa bir artış olduğu görülmüştür.

Başlangıçtaki bu hızlı artışın temel nedeni olarak iskelelerin gözenekli yapısı gösterilebilir (Ghorbani, Nojehdehian, Zamanian, 2016). Çünkü gözeneklilik PBS solüsyonunun iskelelerin içine hızla sızmasına izin verir. Doku iskelelerinin yapısındaki katkı maddesi oranlarının şişme üzerindeki etkisine bakılacak olursa; düşük sBG içeriğinin, kompozit iskelelerin PBS emiliminin artmasına neden olduğu, tam tersi etki olarak ise yüksek NC içeriğinin emilimin artmasına neden olduğu görülmektedir.

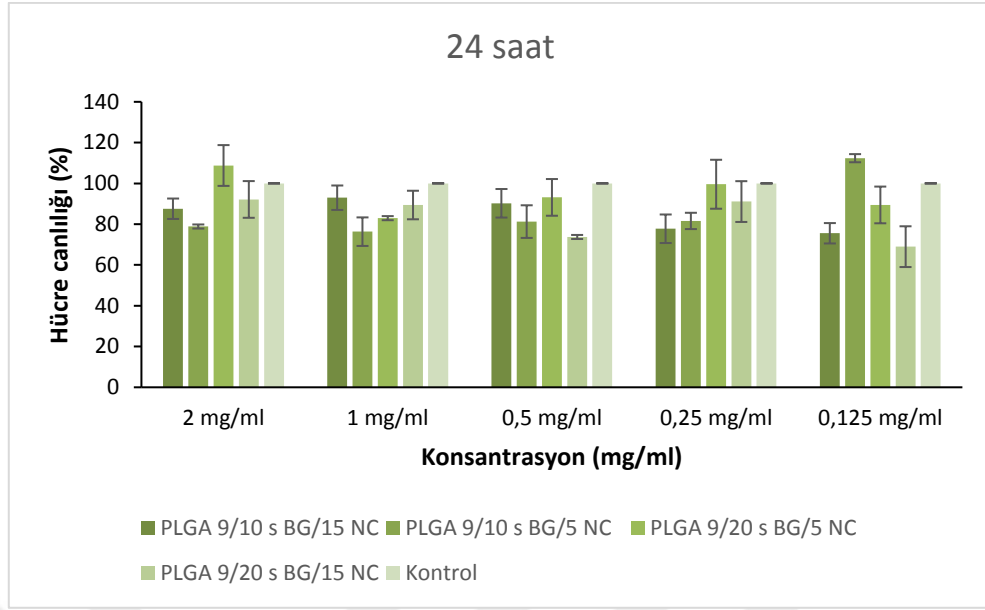
Burada daha yüksek miktarlarda NC'nin hidrofilik olması sebebiyle yapının ıslanabilirliğini arttırdığı, absorpsiyon davranışını etkilediği ve su tutma kapasitesini artırdığı görülmektedir (Meng vd., 2010).



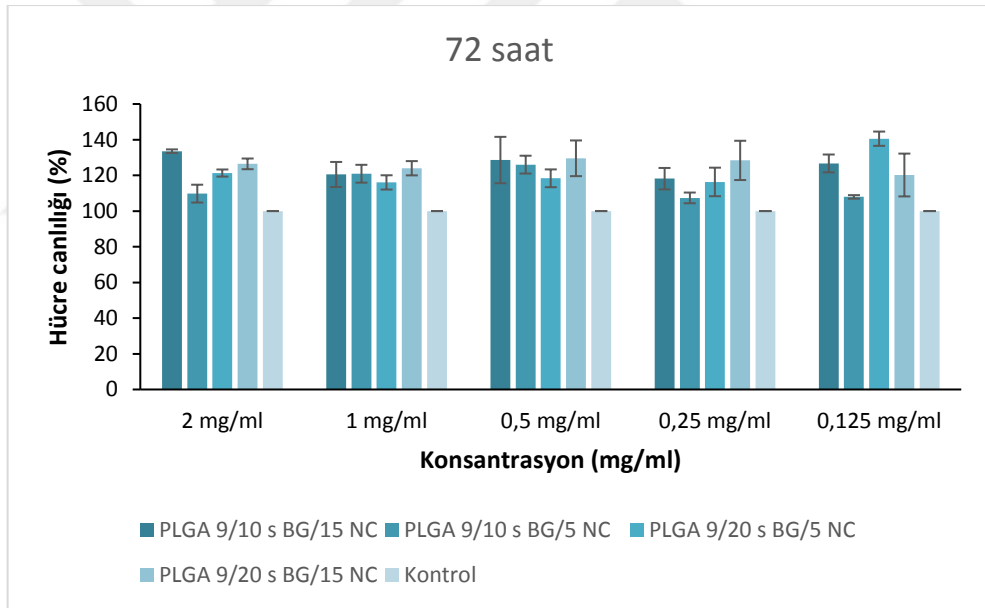
Şekil 9.58. PLGA 9/sBG/NC doku iskelelerinin şişme derecesi grafiği

9.13. Sitotoksosite ve hücre canlılığı analizi sonuçları

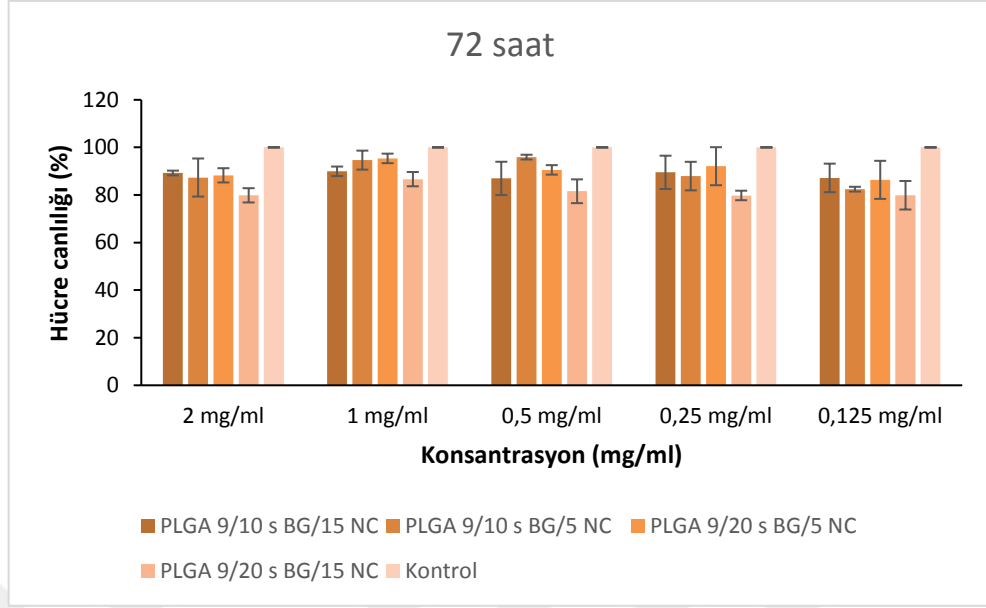
WTS-8 sitotoksosite testi yapılarak numunelerin 5 farklı konsantrasyonda 24 saat ve 72 saatlik süreler sonunda herhangi bir toksik etki içerip içermediğine ve dolayısıyla da bu numunelerdeki hücre canlılığına bakılmıştır. Bu test deneysel çalışmanın son aşamasında optimum oranlar seçilerek üretilen üçlü numunelere uygulanmıştır ve hFOB 1.19 ile L929 olmak üzere iki ayrı hücre hattı kullanılmıştır. ISO-10993 standardına göre, hücre canlılığı % 70'in altında bulunduğu malzemeler toksik olarak nitelendirilebilir (Wallin ve Arscott, 1998). Analiz sonuçlarına göre kontrol grubuyla kıyaslandığında (Şekil 9.59, Şekil 9.60 ve Şekil 9.61) tüm numuneler için en yüksek konsantrasyonda (2 mg/ml) elde edilen hücre canlılıkları % 70'in üzerinde çıkmıştır ve bu da üretilen doku iskelelerinin toksik bir etki içermediğini göstermektedir. Ayrıca doku iskelelerinin hücre canlılığı 72 saat sonra % 100'ün üzerinde değerler göstermiştir. Bu sonuç kullanılan katkılara bağlı olarak artan proliferasyonla ilişkilendirilebilir. Nanoselüloz oranının yüksek olduğu biyoaktif cam içeren numuneler için osteoblast hücrelerinin proliferasyonu üzerinde indüktif bir etkiye sahip olduğunu kanıtlanmıştır (Diaz vd., 2017).



Şekil 9.59. Üçlü doku iskelelerinin *h.FOB 1.19* hücre hattı ile 24 saatlik süre sonundaki sitotoksosite sonucu hücre canlılıkları

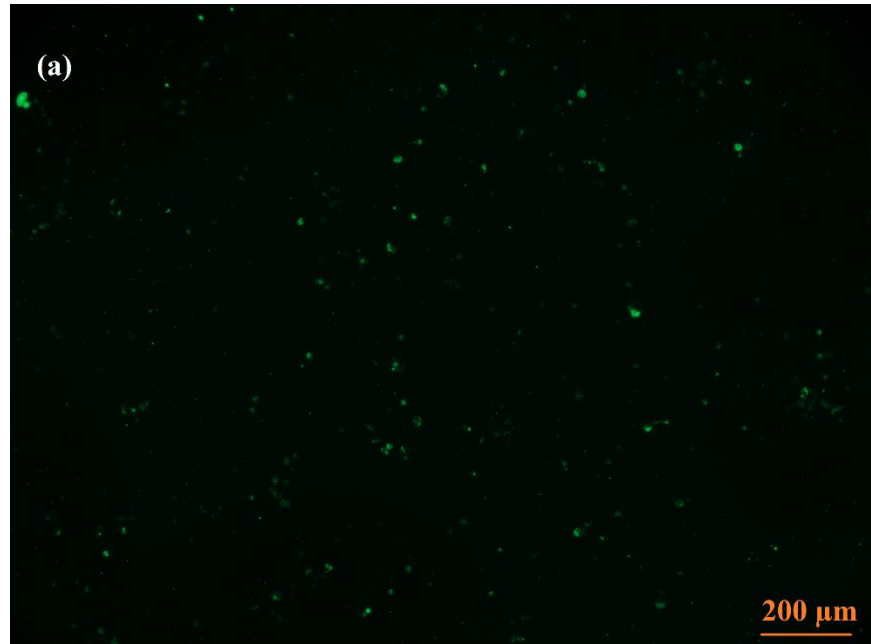


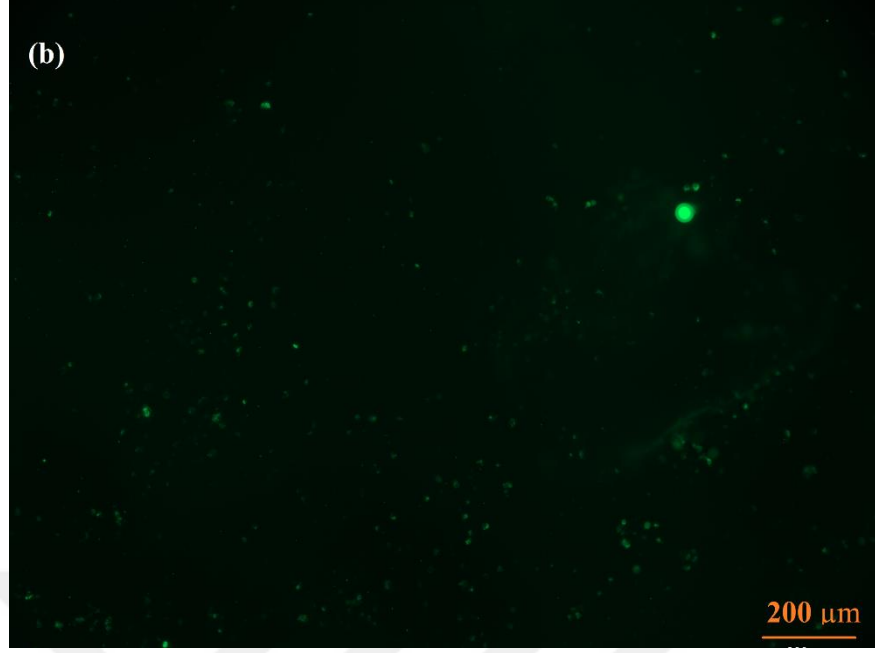
Şekil 9.60. Üçlü doku iskelelerinin *h.FOB 1.19* hücre hattı ile 72 saatlik süre sonundaki sitotoksosite sonucu hücre canlılıkları



Şekil 9.61. Üçlü doku iskelelerinin L929 hücre hattı ile 72 saatlik süre sonundaki sitotoksikite sonucu hücre canlılıkları

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde selüloz esaslı malzemelerin in vivo organ ve hayvan deneylerinde hem hücresel hem de genetik düzeyde önemli bir etkisi veya hasarı olduğuna dair hiçbir kanıt bulunmamaktadır. Ancak, yüksek oranda nanoselüloz alımının, solunmasının, nanoselülozun canlı vücudunda kolayca kendi kendine topaklanması ve bozunmaması nedeniyle pulmoner inflamasyona neden olabileceği bildirilmiştir (Khalil vd., 2020). Şekil 9.62’de floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir.





Şekil 9.62. Numunelerin floresan mikroskop görüntüleri (a) PLGA 9/10 sBG/15 NC (b) PLGA 9/20 sBG/15 NC

Floresan mikroskopla görüntülenen numunelerin nanoselüloz oranı yüksek olanlarında canlı hücrelerin daha fazla olduğu görülmüştür, ancak canlılık oranı beklenen düzeyden daha az çıkmıştır.

Bunun nedeni olarak kullanılan hücre hattının fetal osteoblast olması gösterilebilir. Kemik oluşumu, kondrojenik ve osteojenik öncü hücrelerin çoğalmasıyla başlayan ve ardından farklılaşarak nihayetinde hücre dışı matris (ECM) olgunlaşması ve mineralizasyona yol açan karmaşık ancak düzenli bir dizi olaydan oluşur. Normal şartlar altında bu süreç, endokrin sistem ve lokal olarak etki eden büyüme faktörlerinin bir kombinasyonu tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu nedenle ortama osteoblastların tutunması ile ilgili ekstra faktörlerin eklenmesi gerekebilir. Ayrıca osteosarkoma (kanser hücresi) ve mezenkimal kök hücre denemeleri de yapılabilir. Yapılan bazı çalışmalarda çeşitli mezenkimal kök hücreler biyomateryallerin osteogenez üzerindeki etkinliğini değerlendirmek için uygulanmış ve hatta mezenkimal kök hücre tedavileri kemik rejenerasyonu için klinik çalışmalarda büyük başarı göstermiştir (Gomez vd., 2022).

10. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, vücutta hasar görmüş bir kemik dokunun kendi kendisini yenileyinceye kadarki sürede biyolojik ve mekanik destek sağlayacak olan polimerik bir doku iskelesi üretimi hedeflenmiştir. Bunun için polimer bir matris içerisine farklı katkı malzemeleri (sBG ve/veya NC) ilave edilerek çözücü döküm/partikül uzaklaştırma yöntemi ile doku iskelesi üretilmiştir.

Öncelikle laktit ve glikolit dimerleri kullanılarak PLGA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez sonrası yapılan karakterizasyonda polimerin kimyasal yapısını doğrulamak amaçlı FTIR ve NMR analizleri gerçekleştirilmiştir. FTIR analizinde, laktit ve glikolit dimerlerinde bulunan karbonil (C=O) gruplarının gerilmesinden dolayı sırayla 1727 ve 1760 cm^{-1} 'de güçlü pikler gözlemlenmiştir. 3542 ve 3450 cm^{-1} piklerinde sırayla laktit ve glikolit için O-H gerilmesi görülmüştür. 2923 cm^{-1} piki laktit için $-\text{CH}_3$ gerilmesini; 2967 cm^{-1} piki glikolit için $-\text{CH}_2$ gerilmesini temsil etmektedir. Karbonil asimetric esneme titreşimleri (C=O) PLGA 8 için 1749 cm^{-1} 'de; PLGA 9 için 1745 cm^{-1} 'de görülmüştür. PLGA 8 için 1179 cm^{-1} 'de ve 1450 cm^{-1} 'de görünen pikler ve PLGA 9 için 1181 ve 1447 cm^{-1} 'de sırasıyla C-O gerilme ve O-H bükülme titreşimlerine karşılık gelmektedir. İkili ve üçlü doku iskelelerinin spektrumuna bakıldığında saf PLGA'nın karakteristik pik noktası olan 1745 cm^{-1} 'deki C=O tepe noktasının katkı maddesi ilaveleriyle polimerin saf haline kıyasla daha zayıf bir pik vermesi polimer-katkı maddesi arasındaki etkileşimi doğrulamaktadır.

^1H NMR sonuçlarına bakıldığında PLGA 8 polimerinde laktiti temsil eden H atomuna ait karakteristik pik grubu 5,17-5,26 ppm bölgesinde bulunmaktadır. Ayrıca 1,60 ppm pik grubu da yine laktata ait hidroksil uç gruplarına bağlanmış metil grupları $-\text{CH}_3$ bulunmaktadır. 4,69-4,93 ppm bölgesinde glikoliti temsil eden $-\text{CH}_2$ grubu bulunmaktadır. Diğer taraftan PLGA 9 polimerinde laktat dimerini temsilen 5,15-5,27 ppm pik aralığı $-\text{CH}'_1$, 1,25-1,75 ppm pik aralığı $-\text{CH}_3$ 'ü göstermektedir ve ayrıca glikolit dimerini temsilen 4,71-4,88 ppm pik aralığı da $-\text{CH}_2$ 'yi göstermektedir. Bu polimerde laktit oranının yüksek olması nedeni ile NMR spektrumundaki laktiti işaret eden pik şiddeti de daha yüksek görünmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen PLGA kopolimerlerinin ^1H NMR spektrumlarının, literatürle uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

GPC analizine bakıldığında, PLGA 8 için molekül ağırlığı 200,14 kDa; PLGA 9 için molekül ağırlığı 207,99 kDa bulunmuştur. Elde edilen yüksek molekül ağırlıkları sentezin uygulama alanına göre başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Termal analizlere bakıldığında; TGA sonucuna göre PLGA 8 için bozunmaya başlama sıcaklığı 256 °C, PLGA 9 için 244 °C olarak bulunmuştur. PLGA kopolimerleri, 240 °C'ye kadar termal olarak kararlılık göstermiş ve artan glikolit içeriği ile termal bozunmaya karşı daha fazla direnç göstermişlerdir. Daha yüksek molekül ağırlığına ve daha düşük heterojenlik indeksine (H.I.) sahip polimerler, daha yüksek termal kararlılık sunmaktadır. GPC sonuçlarında da görüldüğü gibi PLGA 9'un molekül ağırlığı PLGA 8'den daha yüksek olup, H.I. değeri daha düşüktür. PLGA 8 içeriğindeki glikolit oranının daha yüksek olması PLGA 8'in daha geç bozunmasına sebep olmuştur. PLGA yapısına sBG eklenmesi ile genel olarak kompozitlerin T_{onset} ve T_{max} sıcaklıklarında artış görülmüştür. sBG'nin termal kararlılığının yüksek olması doku iskelesinin de termal kararlılığını iyileştirmiştir. PLGA'ya nanoselüloz eklenmesiyle her iki orandaki polimer içinde bozunmaya başlama sıcaklıklarında artış görülmüştür. Ancak yine yapıdaki glikolit oranının yüksek olması sebebiyle PLGA 8'de sıcaklık artışlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çekme testi sonucuna göre, Young modülü 3,2 GPa; çekme dayanımları ise PLGA 8 için 26,7 MPa ve PLGA 9 için 37,6 MPa olarak bulunmuştur. PLGA 9 için daha yüksek dayanım sonucu elde edilmesi içeriğindeki laktit oranının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

Doku iskelesi SEM analizinde beklenen gözenekli yapılar tüm numunelerde gözlenmiştir. İkili yapılarda biyoaktif cam ve nanoselüloz net bir şekilde görülürken; üçlü yapılarda nanoselülozun biyoaktif cam yüzeyini kapladığı için açıkça gözükmemektedir. BG ilaveli doku iskeleleri numune yüzeylerinde açıkça görülmektedir. NC partiküllerinin büyük ölçüde porları kapattığı ve poroziteyi düşürdüğü gözlenmiştir. SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar, NC'nin doku iskelelerindeki porları kapatması numunelere yapılan por çap dağılımı ve porozite hesaplamaları ile de doğrulanmaktadır. Porozite değerlerine bakıldığında numunelerdeki katkı maddesi oranı arttıkça, bu değerlerin düştüğü görülmüştür. En yüksek değerler %5 katkılı numunelerde görülmüştür. Ayrıca tüm numunelerde gözenek çap dağılımlarına bakıldığında 50-200 µm arasında yoğunluk olduğu ve bunun da doku iskelesi için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Basma testi sonuçlarına göre; her iki katkı maddesi için de oran arttıkça basma modülü ve dayanımının arttığı, saf polimerik doku iskelesi ile karşılaştırıldığında yüksek bir artış olduğu görülmektedir. En yüksek değerler üçlü doku iskelesi PLGA 9/20 sBG/15 NC numunesi için Young modülü $0,495 \pm 0,007$ MPa, basma dayanımı ise $15,06 \pm 0,057$ MPa olarak bulunmuştur. Bu değerlerle hedeflenen süngerimsi kemik dokuya ulaşılmıştır. Ayrıca üçlü doku iskelelerine 3 haftalık bir bozunma analizi yapılmış ve bozunma öncesi/sonrası modül ve dayanım değerlerine bakılmıştır. Bozunma sonrası bu değerlerde yüksek bir kayıp olmadığı ve doku iskelesi dayanımını etkilemediği görülmüştür.

Kemik doku için kritik önem sahip apatit oluşum deneyinde numuneler Simüle vücut sıvısına (SBF) daldırılmış ve 14 güne kadar inkübatör ortamında bekletilmiştir. Biyoaktif cam ile solüsyon arasında meydana gelen iyon değişim reaksiyonları neticesinde, kemik dokunun sahip olduğu $Ca/P=1,67$ oranına en yakın değere % 20 BG katkılı numunede ulaşılmıştır ($Ca/P=1,60$). Üçlü numunelerde de bu değere en yakın sonuç PLGA 9/20 sBG/15 NC numunesinde ulaşılmıştır ($Ca/P=1,62$). Burada önemli etki biyoaktif cam miktarı ve mineralizasyon süresi olup, tüm numunelerde en yüksek BG katkılı olanlarda daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Hidrolitik bozunma deneyleri, numunelerin PBS solüsyonu içinde inkübatör ortamında bekletilip haftalık ağırlık kayıpları ölçülerek yapılmıştır. Sonuçlara göre, saf polimerlerin (PLGA 8 ve PLGA 9) katkılı olanlara kıyasla daha hızlı bozunduğu ve daha yüksek ağırlık kaybına uğradığı tespit edilmiştir. Hidrofilik yapısından kaynaklı olarak nanoselüloz katkılı numunelerde daha yüksek oranda bir ağırlık kaybı gözlenirken; s-biyoaktif cam katkılılar daha geç bozunmuştur. Üçlü numunelere bakıldığında da benzer bir sonuç elde edilmiş ve en iyi bozunma PLGA/ 10 sBG/ 15 NC numunesinde gözlenmiştir. Üçlü doku iskelelerinde bozunma süreci boyunca ayrıca pH değişimine de bakılmıştır. Saf PLGA'nın pH değişim grafiği asidik bozunma ürünleri olan laktit ve glikolite bağlı olarak bir düşüş eğilimi göstermiştir. Üçlü doku iskelelerinde pH değişiminde belirleyici etken sBG katkısı olup, başlangıçta biyoaktif camın alkali yapısından kaynaklı pH değerinde bir yükselme meydana gelmiş, ancak ilerleyen haftalarda bu yükselme yerini düşüşe bırakmış ve fizyolojik seviyeye ulaşmıştır.

Üçlü doku iskelelerine 24 saatlik bir şişme testi uygulanmıştır. Doku iskelelerindeki düşük sBG içeriğinin, kompozit iskelelerin PBS emiliminin artmasına neden olduğu, tam tersi etki olarak ise yüksek NC içeriğinin emilimin artmasına neden olduğu görülmektedir. Burada daha yüksek miktarlarda NC'nin hidrofilik olması sebebiyle yapının ıslanabilirliğini arttırdığı, absorpsiyon davranışını etkilediği ve su tutma kapasitesini artırdığı görülmektedir.

Hücre deneylerinde, hFOB 1.19 insan benzeri osteoblast hücre hattı ile L929 fibroblast hücre hattı kullanılmıştır ve hücreler belirli bir süre besi ortamında bekletildikten sonra sitotoksikite testine tabi tutulmuştur. 24 saat ve 72 saatlik sürelerin sonunda numunelerin hepsinde hücre canlılıkları ISO-10993 standardına uygun olarak %70'in üzerinde bulunmuştur. Ayrıca 72 saatlik süre sonunda hücre proliferasyonunun artmış olması, nanoselüloz oranının yüksek olduğu numunelerde ve tüm numuneler için biyoaktif cam varlığının osteoblast hücrelerinin proliferasyonu üzerinde indüktif bir etkiye sahip olduğunu kanıtlanmıştır. Floresan mikroskop görüntülerine bakıldığında da nanoselüloz oranı yüksek numunelerde canlı hücrelerin oranı yüksek çıkmıştır.

Deneysel çalışmalar neticesinde üretilen doku iskelelerinin vücutla uyumlu ve biyobozunur olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca sahip olduğu yapısal ve mekanik özellikleri ile ideal bir doku iskelesi için yeterli olduğu da deneysel olarak ispatlanmıştır. Tüm bu özellikler göz önüne alındığında üçlü numuneler içerisinde nanoselüloz oranı yüksek olan PLGA 9/10 sBG/15 NC ve PLGA 9/20 sBG/15 NC daha ön plana çıkmaktadır. Deneysel çalışmada kullanılan katkı maddelerinden biri olan nanoselülozun apatit oluşum deneylerinde zayıf özellikler sergilemesi nedeniyle yüzeyine uygulanacak bir modifikasyon işlemi ile bu özellik güçlendirilebilir. Ayrıca doku iskelelerinin gözenekliliğini iyileştirmek adına kullanılan porojenin (tuz, şeker vs.) boyutu değiştirilerek denemeler yapılabilir. Deneyin hücre kültür çalışmalarında kullanılan hücre grubunun önce osteosarkom (kanser hücresi) daha sonra mezenkimal kök hücresi olarak denenmesi, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi çalışmalar üzerinde daha fazla deneysel çalışma yapılabilir ve geline son noktada doku iskelelerinin insan vücuduna implantasyonu öncesi son aşama olan in vivo hayvan deneyleri ile çalışmalar sürdürülebilir.

KAYNAKÇA

- Abbasi, N., Hamlet, S., Love, R. M., & Nguyen, N. T. (2020). Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of science: advanced materials and devices*, 5(1), 1-9.
- Alemдар, A., ve Sain, M. (2008). Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues—Wheat straw and soy hulls. *Bioresource technology*, 99(6), 1664-1671.
- Alimohammadi, S., Salehi, R., Amini, N., Davaran, S. (2012). Synthesis and physicochemical characterization of biodegradable PLGA-based magnetic nanoparticles containing amoxicilin. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(10), 3225-3232.
- Alizadeh, M., Abbasi, F., Khoshfetrat, A. B., Ghaleh, H. (2013). Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Materials Science and Engineering: C*, 33(7), 3958-3967.
- Ambone, T., Torris, A., ve Shanmuganathan, K. (2020). Enhancing the mechanical properties of 3D printed polylactic acid using nanocellulose. *Polymer Engineering & Science*, 60(8), 1842-1855.
- Atkinson, J.L. ve Vyazovkin, S. (2012). Thermal Properties and Degradation Behavior of Linear and Branched Poly(L-Lactide)s and Poly(L-Lactide-co-Glycolide)s. *Macromol. Chem. Phys.*, 213: 924-936.
- Ayyoob, M., ve Kim, Y. J. (2018). Effect of chemical composition variant and oxygen plasma treatments on the wettability of PLGA thin films, synthesized by direct copolycondensation. *Polymers*, 10(10), 1132.
- Bäckdahl, H., Esguerra, M., Delbro, D., Risberg, B., Gatenholm, P. (2008). Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(6), 320-330.
- Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B. R., Risberg, B., & Gatenholm, P. (2006). Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27(9), 2141-2149.
- Bai, W., Holbery, J., Li, K. A. (2009). Technique for production of nanocrystalline cellulose with a narrow size distribution. *Cellulose*, 16, 455–465.
- Balasubramanian, P., Buettner, T., Pacheco, V. M., Boccaccini, A. R. (2018). Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering. *Journal of the European ceramic society*, 38(3), 855-869.
- Bardet, R., Reverdy, C., Belgacem, N., Leirset, I., Syverud, K., Bardet, M., Bras, J. (2015). Substitution of nanoclay in high gas barrier films of cellulose nanofibrils with cellulose nanocrystals and thermal treatment. *Cellulose*, 22, 1227-1241.

- Berti, F. V., Rambo, C. R., Dias, P. F., ve Porto, L. M. (2013). Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. *Materials Science and Engineering: C*, 33(8), 4684-4691.
- Betriu, N., ve Semino, C. E. (2019). Cartilage Tissue Engineering Using Self-Assembling Peptides Composite Scaffolds. In *Cartilage Tissue Engineering and Regeneration Techniques*.
- Bhardwaj, T. R., Kanwar, M., Lal, R., ve Gupta, A. (2000). Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. *Drug development and industrial pharmacy*, 26(10), 1025-1038.
- Biga, L. M., Bronson, S., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., ... & Runyeon, J. (2019). 5.4 diseases, disorders, and injuries of the integumentary system. *Anatomy & physiology*.
- Blum, M. M. ve John, H. (2012). Historical perspective and modern applications of attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). *Drug testing and analysis*, 4(3-4), 298-302.
- Boccaccini, A. R., ve Maquet, V. (2003). Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. *Composites Science and Technology*, 63(16), 2417-2429.
- Bonassar, L. J. ve Vacanti, C. A. (1998). Tissue engineering: the first decade and beyond. *Journal of cellular biochemistry*, 72 (S30–31), 297-303.
- Bonewald, L. F. (2021). Osteocytes. In *Marcus and Feldman's Osteoporosis*, pp.135-163.
- Bonucci, E. (2020). Role of collagen fibrils in calcification. In *Calcification in biological systems*, pp. 19-39.
- Bras, J., Viet, D., Bruzzese, C., Dufresne, A. (2011). Correlation between stiffness of sheets prepared from cellulose whiskers and nanoparticles dimensions. *Carbohydr. Polym.* 84, 211–215.
- Brauner, B., Schuster, C., Wirth, M., Gabor, F. (2020). Trimethoprim-Loaded Microspheres Prepared from Low-Molecular-Weight PLGA as a Potential Drug Delivery System for the Treatment of Urinary Tract Infections. *ACS Omega*, 5(15) 9013-9022.
- Byrn, S. R., Zografi, G., ve Chen, X. S. (2017). Solid-state properties of pharmaceutical materials.
- Cai, X., Ten Hoopen, S., Zhang, W., Yi, C., Yang, W., Yang, F., ... & Yelick, P. C. (2017). Influence of highly porous electrospun PLGA/PCL/nHA fibrous scaffolds on the differentiation of tooth bud cells in vitro. *Journal of biomedical materials research Part A*, 105(9), 2597-2607.
- Can, N. ve Ersoy, M. S. (2014). Nanolif yapıları polimerik doku iskeleleri. *Journal of Textiles & Engineers/Tekstil ve Mühendis*, 21(95).
- Cañas-Gutiérrez, A., Martínez-Correa, E., Suárez-Avendaño, D., Arboleda-Toro, D., & Castro-Herazo, C. (2020). Influence of bacterial nanocellulose surface modification on calcium phosphates precipitation for bone tissue engineering. *Cellulose*, 27, 10747-10763.

- Celebi, H. ve Kurt, A. (2015). Effects of processing on the properties of chitosan/cellulose nanocrystal films. *Carbohydrate polymers*, 133, 284-293.
- Chaignaud, B. E., Langer, R. ve Vacanti, J. P. (1997). The history of tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds and cells. In *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*, pp. 1-14.
- Chakraborty, A., Sain, M. ve Kortschot, M. (2005). Cellulose microfibrils: a novel method of preparation using high shear refining and cryocrushing.
- Chandramohan, D. ve Marimuthu, K. (2011). A review on natural fibers. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, 8(2), 194-206.
- Chang, J. ve Zhou, Y. L. (2018). Surface modification of bioactive glasses. In *Bioactive Glasses*, pp. 119-143.
- Chatham, J. C., ve Blackband, S. J. (2001). Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging in animal research. *ILAR Journal*, 42(3), 189-208.
- Chauhan, V. S. ve Chakrabarti, S. K. (2012). Use of nanotechnology for high performance cellulosic and papermaking products. *Cellulose chemistry and technology*, 46(5), 389.
- Chen, J., Fan, X., Zhou, Z., Zou, J., Ruan, J. (2010). The preparation and properties of bioactive composites based on modification bioactive glass and poly (lactide-co-glycolide). *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 49(11), 1155-1162.
- Chen, Y., Chen, L., Wang, Y., Lin, K., Liu, J. (2022). Lithium-containing bioactive glasses enhanced 3D-printed PLGA scaffolds for bone regeneration in diabetes. *Composites Part B: Engineering*, 109550.
- Chimerad, M., Barazesh, A., Zandi, M., Zarkesh, I., Moghaddam, A., Borjian, P., ... & Bagher, Z. (2022). Tissue engineered scaffold fabrication methods for medical applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-25.
- Choi, S. H. ve Park, T. G. (2002). Synthesis and characterization of elastic PLGA/PCL/PLGA tri-block copolymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 13(10), 1163-1173.
- Chua, C. K., Wong, C. H. ve Yeong, W. Y. (2017). Standards, quality control, and measurement sciences in 3D printing and additive manufacturing.
- Conoscenti, G., Carrubba, V. ve Brucato, V. (2017). A versatile technique to produce porous polymeric scaffolds: The thermally induced phase separation (TIPS) method. *Arch. Chem. Res*, 1(2), 1-3.
- Creecy, A., Damrath, J. G. ve Wallace, J. M. (2021). Control of bone matrix properties by osteocytes. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 578477.
- Çelebi, M. ve Karagöz, İ. (2019). Biyobozunur polimerler ve özellikleri; nişasta, poli (glikolik asit), poli(laktik asit) ve poli(ε kaprolakton), *Mühendislik Alanında Yeni Ufuklar*, pp.273-292.

- Darestani, F. T., Abtahi, M., Entezami, A. A., Mobedi, H. (2005). Degradation of Poly (D, L-Lactide-CO-Glycolide) 50: 50 Implant in Aqueous Medium.
- Das, M. P., Pandey, G., Neppolian, B., Das, J. (2021). Design of poly-l-glutamic acid embedded mesoporous bioactive glass nanospheres for pH-stimulated chemotherapeutic drug delivery and antibacterial susceptibility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 202, 111700.
- De Jong, S. J., Arias, E. R., Rijkers, D. T. S., Van Nostrum, C. F., Kettenes-Van den Bosch, J. J., Hennink, W. E. (2001). New insights into the hydrolytic degradation of poly (lactic acid): participation of the alcohol terminus. *Polymer*, 42(7), 2795-2802.
- Del Fattore, A., Teti, A. ve Rucci, N. (2012). Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 4(6), 2302-2321.
- Derman S., Kızılbey K. ve Akdeste Z. M. (2013). Polymeric nanoparticles. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31(1), 107-120.
- Díaz, E., Puerto, I., Ribeiro, S., Lanceros-Mendez, S., Barandiarán, J. M. (2017). The influence of copolymer composition on PLGA/nHA scaffolds' cytotoxicity and in vitro degradation. *Nanomaterials*, 7(7), 173.
- Dixon, D. T. ve Gomillion, C. T. (2021). Conductive scaffolds for bone tissue engineering: current state and future outlook. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(1), 1.
- Dorati, R., Colonna, C., Genta, I., Modena, T., Conti, B. (2010). Effect of porogen on the physico-chemical properties and degradation performance of PLGA scaffolds. *Polymer Degradation Stability*.95, 694-701.
- Drzeżdżon, J., Jacewicz, D., Sielicka, A., Chmurzyński, L. (2019). Characterization of polymers based on differential scanning calorimetry based techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, 51-56.
- Duance, V. C., Restall, D. J., Beard, H., Bourne, F. J., Bailey, A. J. (1977). The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS letters*, 79(2), 248-252.
- Dufresne, A. (2013). Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Materials today*, 16(6), 220-227.
- Duygu, D., Baykal, T., Açıkgöz, İ., Yildiz, K. (2009). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies. *Gazi University Journal of Science*, 22(3), 117-121.
- Dziadek, M., Dziadek, K., Checinska, K., Salagierski, S., Choinska, E., Szatkowski, P., ... & Cholewa-Kowalska, K. (2023). Polyphenolic compounds affect the long-term degradation behaviour of polymer and composite materials based on PCL, PLGA, and bioactive glass. *Sustainable Materials and Technologies*, e00568.
- Eltom, A., Zhong, G. ve Muhammad, A. (2019). Scaffold techniques and designs in tissue engineering functions and purposes: a review. *Advances in materials science and engineering*, 2019.

- Ensoylu, M., Deliormanlı, A.M. v Atmaca, H. (2021). Tungsten disulfide nanoparticle-containing PCL and PLGA-coated bioactive glass composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci*, 56, 18650–18667.
- Erbetta C., Alves R. J., Resende J. M., Freitas, R. F., Sousa R.G. (2012). Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnolog.*, 3, 208-225.
- Esa, F., Tasirin, S. M. ve Abd Rahman, N. (2014). Overview of bacterial cellulose production and application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113-119.
- Escalante, J., Chen, W. H., Tabatabaei, M., Hoang, A. T., Kwon, E. E., Lin, K. Y. A., Saravanakumar, A. (2022). Pyrolysis of lignocellulosic, algal, plastic, and other biomass wastes for biofuel production and circular bioeconomy: A review of thermogravimetric analysis (TGA) approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 169, 112914.
- Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V., Ciardelli, G. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia*, 8(9), 3191-3200.
- Filippi, M., Born, G., Chaaban, M., Scherberich, A. (2020). Natural polymeric scaffolds in bone regeneration. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 474.
- Fiume, E., Barberi, J., Verné, E., Baino, F. (2018). Bioactive glasses: from parent 45S5 composition to scaffold-assisted tissue-healing therapies. *Journal of functional biomaterials*, 9(1), 24.
- Fratzl, P. (2003). Cellulose and collagen: from fibres to tissues. *Current opinion in colloid & interface science*, 8(1), 32-39.
- Gangurde, H., Chordiya, M., Patil, P., Baste, N. (2011). Whey protein. *Scholars' Research Journal*, 1(2).
- Gao T. J., Aro H. T., Ylanen H., Vuorio E. (2001). Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts *in vitro*. *Biomaterials* , 22, 1475–1483.
- Gao, Y., ve Chang, J. (2009). Surface modification of bioactive glasses and preparation of PDLA/bioactive glass composite films. *Journal of biomaterials applications*, 24(2), 119-138.
- Garg, T., Singh, O., Arora, S., Murthy, R. S. R. (2012). Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 29(1).
- Gatenholm, P. ve Klemm, D. (2010). Bacterial nanocellulose as a renewable material for biomedical applications. *MRS bulletin*, 35(3), 208-213.
- Gelse, K., Pöschl, E. ve Aigner, T. (2003). Collagens structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1531-1546.

- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., Hatton, P. V. (2014). An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3640-3659.
- Gerhardt, L. C. ve Boccaccini, A. R. (2010). Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 3(7), 3867-3910.
- Ghalia, M. A. ve Dahman, Y. (2016). Advanced nanobiomaterials in tissue engineering: Synthesis, properties, and applications. In *Nanobiomaterials in soft tissue engineering*, pp. 141-172.
- Ghanbarzadeh, B. ve Almasi, H. (2013). Biodegradable polymers. *Biodegradation-life of science*, 141-185.
- Ghorbani, F., Nojehdehian, H. ve Zamanian, A. (2016). Physicochemical and mechanical properties of freeze cast hydroxyapatite-gelatin scaffolds with dexamethasone loaded PLGA microspheres for hard tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 208-220.
- Gilding, D. K. ve Reed, A. M. (1979). Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/poly (actic acid) homo-and copolymers. *Polymer*, 20(12), 1459-1464.
- Gómez-Barrena, E., Padilla-Eguiluz, N. G., López-Marfil, M., de la Reina, R. R., & REBORNE Consortium. (2022). Volume and location of bone regeneration after autologous expanded mesenchymal stromal cells in hip osteonecrosis: a pilot study. *Bone & Joint Research*, 11(12), 881-889.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. A., Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.
- Gong, T., Xie, J., Liao, J., Zhang, T., Lin, S., Lin, Y. (2015). Nanomaterials and bone regeneration. *Bone research*, 3(1), 1-7.
- Gorski, J. P. (2011). Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 16, 2598.
- Gögele, C., Müller, S., Belov, S., Pradel, A., Wiltzsch, S., Lenhart, A., ... & Schulze-Tanzil, G. (2022). Biodegradable Poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA)-Infiltrated Bioactive Glass (CAR12N) Scaffolds Maintain Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis for Cartilage Tissue Engineering. *Cells*, 11(9), 1577.
- Göktürk, E. ve Erdal, H. (2017). Biomedical applications of polyglycolic acid (PGA). *Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21 (6), 1237-1244.
- Grigore, M. E., Grigorescu, R. M., Iancu, L., Ion, R. M., Zaharia, C., Andrei, E. R. (2019). Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(9), 695-712.

- Gupta, B., Revagade, N. ve Hilborn, J. (2007). Poly (lactic acid) fiber: An overview. *Progress in polymer science*, 32(4), 455-482.
- Habibi, Y., Goffin, A. L., Schiltz, N., Duquesne, E., Dubois, P., & Dufresne, A. (2008). Bionanocomposites based on poly (ϵ -caprolactone)-grafted cellulose nanocrystals by ring-opening polymerization. *Journal of Materials Chemistry*, 18(41), 5002-5010.
- Habibi, Y., Lucia, L. A. ve Rojas, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical reviews*, 110(6), 3479-3500.
- Hausberger, A. G. ve DeLuca, P. P. (1995). Characterization of biodegradable poly (D, L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 13(6), 747-760.
- Hench, L. L. (2013). Chronology of bioactive glass development and clinical applications.
- Hodge, J. ve Quint, C. (2019). The improvement of cell infiltration in an electrospun scaffold with multiple synthetic biodegradable polymers using sacrificial PEO microparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(9), 1954-1964.
- Hoeng, F., Denneulin, A. ve Bras, J. (2016). Use of nanocellulose in printed electronics: A review. *Nanoscale*, 8, 13131–13154.
- Howarter J. A. ve Youngblood J. P. (2006). Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, 22, 11142–11147.
- Huang, Y. X., Ren, J., Chen, C., Ren, T. B., Zhou, X. Y. (2008). Preparation and properties of poly (lactide-co-glycolide)(PLGA)/nano-hydroxyapatite (NHA) scaffolds by thermally induced phase separation and rabbit MSCs culture on scaffolds. *Journal of biomaterials applications*, 22(5), 409-432.
- Huang, Y., Zhu, C., Yang, J., Nie, Y., Chen, C., Sun, D. (2014). Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*, 21(1), 1-30.
- Hum J. ve Boccaccini A. (2018). Collagen as coating material for 45S5 bioactive glass-based scaffolds for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 1807.
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24), 2529-2543.
- Ismail, N., Mohamad, H., ve Ahmad, N. (2020). Fabrication and characterization of 45S5 bioactive glass microspheres. *In AIP Conference Proceedings* .Vol. 2267, No. 1, p. 020041.
- Jeyachandran, D., Li, L., Fairag, R., Haglund, L., Cerruti, M. (2022). Simple Fabrication and Enhanced Bioactivity of Bioglass-Poly (lactic-co-glycolic acid) Composite Scaffolds with Matrix Microporosity. *Macromolecular Materials and Engineering*, 307(7), 2100863.

- Jia, W. T., Zhang, X., Luo, S. H., Liu, X., Huang, W. H., Rahaman, M. N., ... & Wang, J. Q. (2010). Novel borate glass/chitosan composite as a delivery vehicle for teicoplanin in the treatment of chronic osteomyelitis. *Acta biomaterialia*, 6(3), 812-819.
- Jiang, F. ve Hsieh, Y. L. (2013). Chemically and mechanically isolated nanocellulose and their self-assembled structures. *Carbohydrate polymers*, 95(1), 32-40.
- Jones, J. R. (2013). Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta biomaterialia*, 9(1), 4457-4486.
- Jorfi, M., ve Foster, E. J. (2015). Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(14).
- Kaboorani, A. ve Riedl, B. (2015). Mechanical performance of polyvinyl acetate (PVA)-based biocomposites. In *Biocomposites*, pp. 347-364.
- Karl, D., Jastram, B., Kamm, P. H., Schwandt, H., Gurlo, A., Schmidt, F. (2019). Evaluating porous polylactide-co-glycolide/bioactive glass composite microsphere powders for laser sintering of scaffolds. *Powder Technology*, 354, 289-300.
- Karp, J. M., Dalton, P. D. ve Shoichet, M. S. (2003). Scaffolds for tissue engineering. *MRS bulletin*, 28(4), 301-306.
- Kaur, G., Pandey, O. P., Singh, K., Homa, D., Scott, B., Pickrell, G. (2014). A review of bioactive glasses: their structure, properties, fabrication and apatite formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 102(1).
- Kaur, G., Pickrell, G., Sriranganathan, N., Kumar, V., Homa, D. (2016). Review and the state of the art: sol-gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(6), 1248-1275.
- Kaur, P., Sharma, N., Munagala, M., Rajkhowa, R., Aallardyce, B., Shastri, Y., Agrawal, R. (2021). Nanocellulose: resources, physio-chemical properties, current uses and future applications. *Frontiers in Nanotechnology*, 3, 747329.
- Kapoor, D. N., Bhatia, A., Kaur, R., Sharma, R., Kaur, G., Dhawan, S. (2015). PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic delivery*, 6(1), 41-58.
- Khalil, H.P.S.A., Jummaat, F., Yahya, E.B., Olaiya, N.G., Adnan, A.S., Abdat, M. N. A. M., N. Halim, A.S., Kumar, U.S.U., Bairwan, R. vd.(2020). A Review on Micro-to Nanocellulose Biopolymer Scaffold Forming for Tissue Engineering Applications. *Polymers*, 12, 2043.
- Khoo, R. Z., Ismail, H. ve Chow, W. S. (2016). Thermal and morphological properties of poly (lactic acid)/nanocellulose nanocomposites. *Procedia Chemistry*, 19, 788-794.

- Kim, H.Y., Kim, H.N., Lee, S.J., Song, J.E., Kwon, S.Y., Chung, J.W., Lee, D., Khang, G. (2017). Effect of pore sizes of PLGA scaffolds on mechanical properties and cell behaviour for nucleus pulposus regeneration in vivo. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11, 44-57
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3Part1), 242-258.
- Kiremitçi-Gümüşderelioglu, M. ve Deniz, G. (1999). Synthesis, characterization and in vitro degradation of poly (D,L-lactide)/Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide). *Turkish Journal of Chemistry*, Vol. 23, No. 2, pp. 153-161.
- Klemm, D. ve Heublein, B. (2005). h.-P. Fink, A. Bohn. *Angew. Chem. Int. Ed*, 44, 3358-3393.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(24), 5438-5466.
- Ko, H. C., Milthorpe, B. K., ve McFarland, C. D. (2007). Engineering thick tissues-the vascularisation problem. *European Cells and Materials*.
- Kozanoğlu, G.S. (2006). Enstitüsü, Elektrospinning Yöntemiyle Nanolif Üretim Teknolojisi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Yüksek Lisans Tezi.
- Krok-borkowicz, M., Reczyńska, K., Rumian, L., Menaszek, E., Orzelski, M., Malisz, P., Silmanowicz, P., Dobrzyński, P., Pamuła, E. (2020). Surface-modified poly(l-lactide-co-glycolide) scaffolds for the treatment of osteochondral critical size defects—in vivo studies on rabbits, *nt. J. Mol. Sci.*, 21(20).
- Kroschwitz, J.I. (2004). Tissue Engineering (Ed.), Encyclopedia of Polymer Science and Technology (3rd Edition), *John Wiley & Sons, NJ*.
- Kumar, A., Negi, Y.S., Choudhary, V., Bhardwaj, N.K. (2016). Fabrication of poly (vinyl alcohol)/ovalbumin/cellulose nanocrystals/nanohydroxyapatite based biocomposite scaffolds. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 65, 191–201.
- Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.
- Kumar, V. ve Banker, G. S. (1993). Chemically-modified cellulosic polymers. *Drug development and industrial pharmacy*, 19(1-2), 1-31.
- Kunwong, N., Tangijt, N., Rattanapinyopituk, K., Dechkunakorn, S., Anuwongnukroh, N., Arayapisit, T., Sritanaudomchai, H. (2021). Optimization of poly (lactic-co-glycolic acid)-bioactive glass composite scaffold for bone tissue engineering using stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Archives of Oral Biology* Vol. 123, 2021, 105041.
- Kurakula, M., Rao, G. K. ve Yadav, K. S. (2021). Fabrication and characterization of polycaprolactone-based green materials for drug delivery. In *Applications of Advanced Green Materials*, pp. 395-423.

- Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. P., Atala, A. (Eds.). (2020). *Principles of tissue engineering*. Academic press.
- Larrañaga, A., Petisco, S. ve Sarasua, J. R. (2013). Improvement of thermal stability and mechanical properties of medical polyester composites by plasma surface modification of the bioactive glass particles. *Polymer degradation and stability*, 98(9), 1717-1723.
- Laschke, M. W., Harder, Y., Amon, M., Martin, I., Farhadi, J., Ring, A., vd. (2006). Angiogenesis in tissue engineering: Breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng.* 12, 2093–2104.
- Li, B., Xu, W., Kronlund, D., Määttänen, A., Liu, J., Smått, J. H., ... & Xu, C. (2015). Cellulose nanocrystals prepared via formic acid hydrolysis followed by TEMPO-mediated oxidation. *Carbohydrate polymers*, 133, 605-612.
- Li, H., Zhang, Q., Jiang, W., Pan, B. (2015). *U.S. Patent No. 9,062,159*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Li, W. (2015). 45S5 Bioactive Glass-Based Composite Scaffolds with Polymer Coatings for Bone Tissue Engineering Therapeutics, Doktora tezi, Nürnberg Friedrich-Alexander Üniversitesi, Teknik fakülte Erlangen.
- Li, Z. ve Zhu, Y. (2003). Surface-modification of SiO₂ nanoparticles with oleic acid. *Applied Surface Science*, 211(1–4), 315–320.
- Liu, H., Shi, S., Cao, J., Ji, L., He, Y., Xi, J. (2015). Preparation and evaluation of a novel bioactive glass/lysozyme/PLGA composite microsphere. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(3), 458-463.
- Liu, Y., Ahmed, S., Sameen, D. E., Wang, Y., Lu, R., Dai, J., ... & Qin, W. (2021). A review of cellulose and its derivatives in biopolymer-based for food packaging application. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 532-546.
- Lu, J., Sun, C., Yang, K., Wang, K., Jiang, Y., Tusiime, R., ... & Yu, M. (2019). Properties of polylactic acid reinforced by hydroxyapatite modified nanocellulose. *Polymers*, 11(6), 1009.
- Lu, J., Sun, C., Yang, K., Wang, K., Jiang, Y., Tusiime, R., Yang, Y., Fan, F., Sun, Z., Liu, Y., Zhang, H., Han, K., Yu, M. (2019). Properties of Polylactic Acid Reinforced by Hydroxyapatite Modified Nanocellulose. *Polymers*, 11(6), 1009.
- Lyons, F. G., Al-Munajjed, A. A., Kieran, S. M., Toner, M. E., Murphy, C. M., Duffy, G. P., O'Brien, F. J. (2010). The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials*, 31(35), 9232-9243.
- Ma, J., Chen, C. Z., Wang, D. G., Meng, X. G., Shi, J. Z. (2010). In vitro degradability and bioactivity of mesoporous CaO-MgO-P 2 O 5-SiO 2 glasses synthesized by sol-gel method. *Journal of sol-gel science and technology*, 54, 69-76.
- McKeen, L. W. (2021). The effect of heat aging on the properties of sustainable polymers. *Eff. Long Term Therm. Expo. Plast. Elastomers*, 313-332.

- Meng, Z. X., Wang, Y. S., Ma, C., Zheng, W., Li, L., Zheng, Y. F. (2010). Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 30(8), 1204-1210.
- Meyer, U. (2009). The history of tissue engineering and regenerative medicine in perspective. *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine*, pp. 5-12.
- Mhanna, R. ve Hasan, A. (2017). Introduction to tissue engineering. *Tissue engineering for artificial organs: regenerative medicine, smart diagnostics and personalized medicine*, 1, 1-34.
- Mirbagheri, M., Mohebbi-Kalhari, D. ve Jirofti, N. (2017). Evaluation of Mechanical Properties and Medical Applications of Polycaprolactone Small Diameter Artificial Blood Vessels.
- Missoum, K., Belgacem, M. N. ve Bras, J. (2013). Nanofibrillated cellulose surface modification: a review. *Materials*, 6(5), 1745-1766.
- Mlynárik, V. (2017). Introduction to nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry*, 529, 4-9.
- Mo, Y., Guo, R., Liu, J., Lan, Y., Zhang, Y., Xue, W., Zhang, Y. (2015). Preparation and properties of PLGA nanofiber membranes reinforced with cellulose nanocrystals. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 132, 177-184.
- Mohammed, A. ve Abdullah, A. (2018). Scanning electron microscopy (SEM): A review. In *Proceedings of the 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics—HERVEX, Băile Govora, Romania*, Vol. 2018, pp. 7-9.
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 3941-3994.
- Monárrez-Cordero, B. E., Rodríguez-González, C. A., Valencia-Gómez, L. E., Hernández-Paz, J. F., Martel-Estrada, S. A., Camacho-Montes, H., Olivas-Armendáriz, I. (2021). The effect of Allium cepa extract on the chitosan/PLGA scaffolds bioactivity. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 19, 2280800021989701.
- Mulchandani, N. ve Katiyar, V. (2019). Bioactive Glasses: Prospects in Bone Tissue Engineering. *Advances in Sustainable Polymers: Processing and Applications*, 67-83.
- Muñoz, F., Rocherullé, J., Ahmed, I., Hu, L. (2019). Phosphate Glasses. En Musgraves, J. D., Hu, J., Calvez, L.. Springer Handbook of Glass, pp. 553-594.
- Munoz-Canoves, P. ve Huch, M. (2018). Definitions for adult stem cells debated.
- Muppalaneni, S., ve Omidian, H. (2013). Polyvinyl alcohol in medicine and pharmacy: a perspective. *J. Dev. Drugs*, 2(3), 1-5.

- Murcia Valderrama, M. A., Van Putten, R. J. ve Gruter, G. J. M. (2020). PLGA barrier materials from CO₂. The influence of lactide co-monomer on glycolic acid polyesters. *ACS applied polymer materials*, 2(7), 2706-2718.
- Murphy, S.V. ve Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, vol. 32, no. 8, pp. 773–785.
- Murugan, S. ve Parcha, S.R. (2021). Fabrication techniques involved in developing the composite scaffolds PCL/HA nanoparticles for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci: Mater Med* 32, 93.
- Nam, J. H., Lee, S. Y., Khan, G., Park, E. S. (2020). Validation of the optimal scaffold pore size of nasal implants using the 3-dimensional culture technique. *Archives of Plastic Surgery*, 47(04), 310-316.
- Namini, M.S., Bayat, N., Tajerian, R., Ebrahimi-barough, S., Azami, M., Irani, S., Jangjoo, S., Shirian, S., Ai, F. (2018). A comparison study on the behavior of human endometrial stem cell-derived osteoblast cells on PLGA/HA nanocomposite scaffolds fabricated by electrospinning and freeze-drying methods. *Journal of orthopaedic surgery and research*, Vol. 13,63.
- Nasri-Nasrabadi, B., Mehrasa, M., Rafienia, M., Bonakdar, S., Behzad, T., Gavanji, S. (2014). Porous starch/cellulose nanofibers composite prepared by salt leaching technique for tissue engineering. *Carbohydrate polymers*, 108, 232-238.
- Nayak, P. L. (1999). Biodegradable polymers: opportunities and challenges.
- Nazemi, K., Moztaezadeh, F., Jalali, N., Asgari, S., Mozafari, M. (2014). Synthesis and characterization of poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles-loaded chitosan/bioactive glass scaffolds as a localized delivery system in the bone defects. *BioMed research international*.
- Nuhoğlu, A.İ. (2015). Yeni Başlatıcı Sistemleri İle E-Kaprolaktonun Halka Açılma Polimerizasyonu (Rop) Ve Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu İle Metil Metakrilat Esaslı Yeni Makroinimer, Yeni Makrobaşlatıcı Ve Yeni Biyoyumlu Blok Kopolimerlerin Sentezi Ve Karakterizasyonu , Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- O'brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14(3), 88-95.
- Ochi, M., Wan, B., Bao, Q., Burgess, D. J. (2021). Influence of PLGA molecular weight distribution on leuprolide release from microspheres. *International journal of pharmaceutics*, 599, 120450.
- Ogueri, K. S., Jafari, T., Escobar Ivirico, J. L., Laurencin, C. T. (2019). Polymeric biomaterials for scaffold-based bone regenerative engineering. *Regenerative engineering and translational medicine*, 5(2), 128-154.
- Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., ... & Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58(3-5), 77-116.

- Oonishi, H., Hench, L.L., Wilson, J., Sugihara, F., Tsuji, E., Matsuura, M., Kin, S., Yamamoto, T., Mizokawa, S.(2000). Quantitative comparison of bone growth behaviour in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 37–46.
- Park, J. B. ve Bronzino, J. D. (Eds.). (2002). *Biomaterials: principles and applications*.
- Pattaro, A. F., Bahú, J. O., Schiavon, M. I. R. B., Gabriel, L. P., Concha, V. O. C., Jardini, A. L., Maciel Filho, R. J. M. I. (2020). Poly (L-Lactide-co-Glycolide) (PLLGA) fast synthesis method for the production of tissue engineering scaffolds. *Materials International*, 2, 0286-0296.
- Pelaseyed, S.S., Hosseini, H.R.M., Nokhbedehghan, Z., Samadikuchaksaraei, A. (2021). PLGA/TiO₂ nanocomposite scaffolds for biomedical applications: fabrication, photocatalytic, and antibacterial properties. *BioImpacts*, 11(1), 45-52.
- Pereira, E. D., Cerruti, R., Fernandes, E., Peña, L., Saez, V., Pinto, J. C., ... & Souza Júnior, F. G. D. (2016). Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. *Polímeros*, 26, 137-143.
- Phanthong, P., Reubroycharoen, P., Hao, X., Xu, G., Abudula, A., Guan, G. (2018). Nanocellulose: Extraction and application. *Carbon Resources Conversion*, 1(1), 32-43.
- Piemonte, V. ve Gironi, F. (2013). Kinetics of hydrolytic degradation of PLA. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 313-318.
- Piras, C. C. ve Smith, D. K. (2020). Multicomponent polysaccharide alginate-based bioinks. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(36), 8171-8188.
- Poser, J. W., Esch, F. S., Ling, N. C., Price, P. A. (1980). Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *Journal of Biological Chemistry*, 255(18), 8685-8691.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K. ve Kapadia, J. R. (2015). Current Knowledge on Biodegradable Microspheres in Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 12, 1283–1299.
- Puppi, D., Federica, C., Dash, M. ve Chiellini, E. (2011). *Biodegradable Polymers for Biomedical Applications*. ss. 545-604.
- Qi, J., Zhang, T., Xiao, J., Zhanga, Q., Xiong, C.(2020). The effect of ethenyltrimethoxysilane modification of nano bioactive glass on the physiochemical and mechanical properties and in vitro bioactivity of poly(lactide-co-glycolide)/poly(trimethylene carbonate) composite. *New J. Chem.*, 44, 19227.
- Qi, J., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, Q., Xiong, C. (2020). Preparation and properties of a biodegradable poly (lactide-co-glycolide)/poly (trimethylene carbonate) porous composite scaffold for bone tissue engineering. *New Journal of Chemistry*, 44(34), 14632-14641.

- Radakisnin, R., Majid, M.S.A., Jamir, M.R.M., Tahir, M.F.M., Meng, C.E., Al Alshahrani, H. (2021). Physical, thermal, and mechanical properties of highly porous polylactic acid/cellulose nanofibre scaffolds prepared by salt leaching technique. *Nanotechnology Reviews*; 10: 1469–1483.
- Rahaman, M.N., Day, D.E., Sonny Bal, B., Fu, Q., Jung, S.B. (2011). Bonewald LF, et al. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7:2355-73.
- Rajinipriya, M., Nagalakshmaiah, M., Robert, M., Elkoun, S. (2018). Importance of agricultural and industrial waste in the field of nanocellulose and recent industrial developments of wood based nanocellulose: a review. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(3), 2807-2828.
- Raquez, J. M., Habibi, Y., Murariu, M., Dubois, P. (2013). Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Progress in Polymer Science*, 38(10-11), 1504-1542.
- Raza, Z. A., Riaz, S. ve Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Properties and chemical modification approaches for their functionalization. *Biotechnology Progress*, 34(1), 29-41.
- Renno, A. C. M., Van De Watering, F. C. J., Nejadnik, M. R., Crovace, M. C., Zanutto, E. D., Wolke, J. G. C., ... & van den Beucken, J. J. (2013). Incorporation of bioactive glass in calcium phosphate cement: An evaluation. *Acta biomaterialia*, 9(3), 5728-5739.
- Rezwan, K., Chena, Q.Z., Blakera, J.J., Boccaccini, A.B. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27, 3413–3431.
- Rimell, J. T. ve Marquis, P. M. (2000). Selective laser sintering of ultra high molecular weight polyethylene for clinical applications. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 53(4), 414-420.
- Roberto, W.D.S., Pereira, M.M ve Ribiero de Campos, T.P. (2003). Analysis of bioactive glasses obtained by sol–gel processing for radioactive implants. *Mater. Res.*, 6, 123–127.
- Roodman, G. D. (1996). Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocrine reviews*, 17(4), 308-332.
- Rosenberg, N., Rosenberg, O. ve Soudry, M. (2012). Osteoblasts in bone physiology—Mini review. *Rambam Maimonides medical journal*, 3(2).
- Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, vd. (2017). Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C*, 78:1246 – 62.
- Saito, M. ve Marumo, K. M. S. K. M. (2010). Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporosis international*, 21, 195-214.

- Salonius, E., Muhonen, V., Lehto, K., Järvinen, E., Pyhältö, T., Hannula, M., ... & Kiviranta, I. (2019). Gas-foamed poly (lactide-co-glycolide) and poly (lactide-co-glycolide) with bioactive glass fibres demonstrate insufficient bone repair in lapine osteochondral defects. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(3), 406-415.
- Sanz-Herrera, J. A., García-Aznar, J. M. ve Doblaré, M. (2009). On scaffold designing for bone regeneration: a computational multiscale approach. *Acta Biomaterialia*, 5(1), 219-229.
- Schardosim, M., Soulié, J., Poquillon, D., Cazalbou, S., Duployer, B., Tenailleau, C., Rey, C., Hübner, R., Combes, C. (2017). Freeze-casting for PLGA/carbonated apatite composite scaffolds: Structure and properties. *Materials Science and Engineering: C*, Pages 731-738.
- Seyednejad, H., Ghassemi, A. H., van Nostrum, C. F., Vermonden, T., Hennink, W. E. (2011). Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. *Journal of Controlled release*, 152(1), 168-176.
- Shadman, B., Asadi, A., Zahri, S., Barzegar, A., Marzban, A. (2021). Design of PLGA-based Scaffolds for Developing and Differentiating Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Biointerface Research in Applied Chemistry*, Volume 11, Issue 5, 12732 - 12742 .
- Shuai, C., Yang, B., Peng, S., Li, Z. (2013). Development of composite porous scaffolds based on poly(lactide-co-glycolide)/nano hydroxyapatite via selective laser sintering. *Int J Adv Manuf Technol.*, 69(1-4):51-7.
- Silva, M. F., Hechenleitner, A. A. W., Irache, J. M., Oliveira, A. J. A. D., Pineda, E. A. G. (2015). Study of thermal degradation of PLGA, PLGA nanospheres and PLGA/maghemite superparamagnetic nanospheres. *Materials Research*, 18, 1400-1406.
- Singh, G., Kaur, T., Kaur, R., Kaur, A. (2014). Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *Int J Pharmacol Pharm Sci*, 1(2), 30-42.
- Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S. ve Gokhale, D. V. (2019). Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *Journal of applied microbiology*, 127(6), 1612-1626.
- Sirohi, R., Gaur, V. K., Pandey, A. K., Sim, S. J., Kumar, S. (2021). Harnessing fruit waste for poly-3-hydroxybutyrate production: a review. *Bioresource technology*, 326, 124734.
- Sonia, S., Ana, C., Abilio, S., Rogerio, S. (2019). Poly (lactic acid)/cellulose films produced from composite spheres prepared by emulsion-solvent evaporation method. *Polymers*, 11, 66.
- Spirandeli, B. R., Ribas, R. G., Amaral, S. S., Martins, E. F., Esposito, E., Vasconcellos, L. M. R., ...& Trichês, E. S. (2021). Incorporation of 45S5 bioglass via sol-gel in β -TCP scaffolds: Bioactivity and antimicrobial activity evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, 131, 112453.

- Subhedar, A., Bhadauria, S., Ahankari, S., Kargarzadeh, H. (2021). Nanocellulose in biomedical and biosensing applications: A review. *International journal of biological macromolecules*, 166, 587-600.
- Sun, X., Xu, C., Wu, G., Ye, Q., Wang, C. (2017). Poly (lactic-co-glycolic acid): Applications and future prospects for periodontal tissue regeneration. *Polymers*, 9(6), 189.
- Swallowe, G. M. (Ed.). (1999). *Mechanical properties and testing of polymers: an A–Z reference* (Vol. 3).
- Tang, A., Li, J., Zhao, S., Liu, T., Wang, Q., Wang, J. (2017). Biodegradable tissue engineering scaffolds based on nanocellulose/PLGA nanocomposite for NIH 3T3 cell cultivation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(6), 3888-3895.
- Tayeb, A. H., Amini, E., Ghasemi, S., Tajvidi, M. (2018). Cellulose nanomaterials—Binding properties and applications: A review. *Molecules*, 23(10), 2684.
- Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L., Martin, G. R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 26(1), 99-105.
- Thomson, B.M. (1998). Bone Types, Composition and Structure. *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)*.
- Tian, T., Xie, W., Gao, W., Wang, G., Zeng, L., Miao, G., Chen, X. (2019). Micro-nano bioactive glass particles incorporated porous scaffold for promoting osteogenesis and angiogenesis in vitro. *Frontiers in chemistry*, 7, 186.
- Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., ... & Shu, W. (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive materials*, 3(3), 278-314.
- Tzaphlidou, M. (2008). Bone architecture: collagen structure and calcium/phosphorus maps. *Journal of biological physics*, 34(1), 39-49.
- Upton, S. J., Partridge, S. W., Tcacencu, I., Fulton, D. A., Corbett, I., German, M. J., Dalgarno, K. W. (2016). Development of a methacrylate-terminated PLGA copolymer for potential use in craniomaxillofacial fracture plates. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 470-477.
- Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M., Halleen, J. M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *Journal of cell science*, 113(3), 377-381.
- Vacanti, C. A. (2006). The history of tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine*.
- Valanezhad, A., Shahabi, S., Hashemian, A. vd. (2021). Preparation of a PLGA-coated porous bioactive glass scaffold with improved mechanical properties for bone tissue engineering approaches. *Regen. Eng. Transl. Med.* 7, 175–183.
- Vroman, I. ve Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307-344.

- Wallin, R. F. ve Arscott, E. (1998). A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity, *Medical Device and Diagnostic Industry*, 20, 96-98.
- Wang, N.; Wu, X.S.; Li, C.; Feng, M.F. (2000). Synthesis, Characterization, Biodegradation, and Drug Delivery Application of Biodegradable Lactic/Glycolic Acid Polymers: I. Synthesis and Characterization. *J. Biomater. Sci. Polym.*, 11, 301-318.
- Wu, C., Zhou, Y., Chang, J., Xiao, Y. (2013). Delivery of dimethyloxallyl glycine in mesoporous bioactive glass scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis of human bone marrow stromal cells. *Acta Biomater*, 9, 9159–9168.
- Xie, H., Du, H., Yang, X., Si, C. (2018). Recent strategies in preparation of cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils derived from raw cellulose materials. *International Journal of Polymer Science*, 2018.
- Xiong, Y. ve Xiong, Y. (2022). Applications of bone regeneration hydrogels in the treatment of bone defects: a review. *Journal of Materials Science*, 1-27.
- Xu, W., Zhao, R., Wu, T., Li, G., Wei, K., Wang, L. (2021). Biodegradable calcium carbonate/mesoporous silica/poly(lactic-glycolic acid) microspheres scaffolds with osteogenesis ability for bone regeneration. *Royal Society of Chemistry*, 11, 5055-5064.
- Xu, Z., Neoh, K. G. ve Kishen, A. (2010). A biomimetic strategy to form calcium phosphate crystals on type I collagen substrate. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* 30, 822–826.
- Yadroitsava, I., Du Plessis, A. ve Yadroitsev, I. (2019). Bone regeneration on implants of titanium alloys produced by laser powder bed fusion: A review. *Titanium for Consumer Applications*, 197-233.
- Yan, C., Wu, J., Zhang, J., He, J., Zhang, J. (2015). Hydrolytic degradation of cellulose-graft-poly (L-lactide) copolymers. *Polym. Degrad. Stabil.*, 118, 130-136.
- Yang, L., Liu, S., Fang, W., Chen, J., Chen, Y. (2019). Poly(lactic-co-glycolic acid)-bioactive glass composites as nanoporous scaffolds for bone tissue engineering: *in vitro* and *in vivo* studies. *Experimental and therapeutic medicine*, 18: 4874-4880.
- Yao, J., Radin, S., Leboy, P. S., Ducheyne, P. (2005). The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly (lactic-co-glycolic acid)/bioactive glass substrate for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(14), 1935-1943.
- Yu, H.Y., Zhang, H., Song, M.L., Zhou, Y., Yao, J.M., Ni, Q.Q. (2017). From cellulose nanospheres, nanorods to nanofibers: Various aspect ratio induced nucleation/reinforcing effects on polylactic acid for robust-barrier food packaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9, 43920–43938.
- Yücesan, D. (1994). *Polisilanların Katyonik Ve Serbest Radikal Mekanizmalarla Blok Kopolimer Sentezinde Kullanımı*, Yüksek Lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.

- Zhang, Q., Guo, N., Sun, Y., Li, X., Yang, H. (2017). Absolute quantification of poly (DL-lactide-co-glycolide) in microspheres using quantitative ^1H NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 273-278.
- Zhang, Z., Li, G. ve Shi, B. I. (2006). Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal-society of leather technologists and chemists*, 90(1), 23.
- Zhong, J. ve Greenspan, D. C. (2000). Processing and properties of sol-gel bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 53(6), 694-701.
- Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., Joy, D. (2007). Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, 1-40.
- Zhou, Z., Liu, L., Liu, Q., Yi, Q., Zeng, W., Zhao, Y. (2012). Effect of surface modification of bioactive glass on properties of poly-L-lactide composite materials. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 51(8), 1637-1646.
- Zinge, C. ve Kandasubramanian, B. (2020). Nanocellulose based biodegradable polymers. *European Polymer Journal*, 133, 109758.
- http-1:** <https://www.metalurjik.com/biyoaktif-cam> (Erişim tarihi: 11.11.2022)
- http-2:** <https://www.yesilaski.com/biyobozunur-plastik-ambalaj-malzemeleri.html> (Erişim tarihi: 10.11.2022)
- http-3:** <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320444> (Erişim tarihi: 07.12.2022)
- http-4:** <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/histology-of-bone> (Erişim tarihi: 7.12.2022)
- http-5:** <https://www.britannica.com/science/bone-anatomy> (Erişim tarihi: 11.11.2022)
- http-6:** <https://www.humbarahane.com/kesme-kuvveti-kayma-gerilmesi/> (Erişim tarihi: 10.11.2022)
- http -7:** <https://www.prescouter.com/2018/01/nanocellulose-applications/> (Erişim tarihi: 11.11.2022)